



21 DEC 1992

STEVIOSIDE AND STEVIOL NEPHROTOXICITY AND THEIR
RELATIONSHIP TO URINARY ENZYMES EXCRETION

WIMON DEECHAKAWAN

๑

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(TOXICOLOGY)

อธิการบดี

๑๓

วิมล เดชชากวน

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

1992

20926

ชื่อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ของการเกิดพิษที่ไตของสารสตีวิโอไซด์ และสตีวียอลกับปริมาณเอ็นไซม์ในน้ำปัสสาวะ
ผู้วิจัย	วิมล ตีจักรวาล
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พิษวิทยา)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	
	ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, ปร.ด.
	ธีระยุทธ กลิ่นสุคนธ์, Sc.D.
	วิจิตรา เลิศกมลกาญจน์, Ph.D.
วันที่สำเร็จการศึกษา	27 ตุลาคม พ.ศ. 2535

บทคัดย่อ

สตีวิโอไซด์ (Stevioside) เป็นสารหวานที่สำคัญและมีปริมาณสูงที่สกัดได้จากใบหญ้าหวาน (Stevia rebaudiana Bertoni) มีโครงสร้างทางเคมีเป็นสารประเภทไดเทอร์ปีน-ไกลโคไซด์ สตีวียอล (Steviol) ได้จากการเปลี่ยนแปลงสตีวิโอไซด์โดยเอ็นไซม์ การศึกษาถึงผลของสตีวิโอไซด์และสตีวียอลต่อการเกิดพิษที่ไต โดยการเปรียบเทียบถึงความสัมพันธ์ของปริมาณเอ็นไซม์สำคัญในน้ำปัสสาวะกับระดับบิยูเอ็น (BUN) และครีเอตินีนในเลือด รวมทั้งผลจากการศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์ในหนูพุกขาว (*in vivo*) ระดับบิยูเอ็นในเลือดที่เวลาต่าง ๆ กัน (0 ถึง 96 ชั่วโมง) มีค่าเพิ่มขึ้นใน 9 ชั่วโมงแรกแล้วค่อย ๆ ลดลงจนใกล้เคียงระดับปกติหลังจากฉีดสารละลายสตีวิโอไซด์ขนาด 1.5 g/kg BW เข้าในร่างกายหนูพุกขาวทางใต้ผิวหนัง ระดับบิยูเอ็นมีการเปลี่ยนแปลงให้ค่าสูงสุด (180.28 %) ที่ 9 ชั่วโมง หลังจากฉีดสารละลายสตีวิโอไซด์ นอกจากนี้เวลาที่ 9 ชั่วโมงยังพบว่าระดับครีเอตินีน, เอ็นไซม์ PGPT และ PGOT ในเลือดเพิ่มขึ้น 131.71 %, 58.69 % และ 161.69 % ตามลำดับ แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่าโปรตีนในเลือด สตีวิโอไซด์ยังมีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลในปัสสาวะถูกขับออกมากและปริมาณเอ็นไซม์บางตัวในปัสสาวะถูกขับออกมามากเช่นกันได้แก่ AP และ α -GTP แต่ปริมาณ

โปรตีนในปัสสาวะและเอ็นไซม์ NAG เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในขณะที่เอ็นไซม์ GSH-S-TF เอ็นไซม์ลดลงเล็กน้อยแต่ไม่ชัดเจน เมื่อตรวจสอบชิ้นเนื้อของไต ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาและแบบอิเล็กตรอน พบว่า หลังจากฉีดสารละลาย สตีวีโอไซด์ทางใต้ผิวหนังในหนูเพศชายเป็นเวลา 9 ชั่วโมง มีผลต่อการทำลาย เซลล์บุท่อไตส่วนต้น ในขณะที่เซลล์บุท่อไตส่วนปลายคงปกติ

นอกจากนี้ การศึกษาถึงผลของสตีวีโอไซด์ต่อการสะสมของสาร PAH ในชิ้นบาง ๆ ส่วนเปลือกไต (renal cortical slices) ของหนูเพศชาย โดยการฉีดสารละลายสตีวีโอไซด์ความเข้มข้น 1.5 g/kg BW เข้าทางใต้ผิวหนังใน หนูเพศชาย เป็นเวลา 9 ชั่วโมง แล้วทำการแยกเอาไตออกมาศึกษา พบว่า สตีวีโอไซด์ มีผลยับยั้งการสะสมของสาร PAH ในชิ้นบาง ๆ ส่วนเปลือกไต ถึง 63.42% (*in vivo*) ส่วนผลการยับยั้งการสะสมของสาร PAH ในชิ้น บาง ๆ ส่วนเปลือกไตโดยตรงเกิดขึ้นเช่นเดียวกัน (*in vitro*) เมื่อทำการเติม สารละลายสตีวีโอไซด์และสตีวีออลในความเข้มข้นตั้งแต่ $6.25-100.0 \mu\text{M}$ และ $1.5625-100.0 \mu\text{M}$ ตามลำดับ ลงในสารละลาย (medium) ที่มีสาร PAH ละลายอยู่นาน 30 นาที การยับยั้งการสะสมของสาร PAH จะมากขึ้นเมื่อความ เข้มข้นของสตีวีโอไซด์และสตีวีออลเพิ่มขึ้น และให้ผลยับยั้งสูงสุดจะเกิดขึ้นที่ความ เข้มข้น $25.0 \mu\text{M}$ และ $50.0 \mu\text{M}$ ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้บอกได้ว่า สตีวีออลให้ผลในการยับยั้งการสะสมของสาร PAH ในชิ้นบาง ๆ ส่วนเปลือกไตของ หนูเพศชายมากกว่าสตีวีโอไซด์ แต่สตีวีโอไซด์และสตีวีออล ไม่ทำให้เกิดขบวนการ ไลปิดเปอร์ออกซิเดชัน ทั้งในเลือดและในชิ้นบาง ๆ ส่วนเปลือกไตของหนูเพศชาย ดังนั้นการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สตีวีโอไซด์และสตีวีออลเมื่อให้ใน หนูเพศชาย (*in vivo*) และในหลอดทดลอง (*in vitro*) มีผลต่อการทำลาย เซลล์บุท่อไตส่วนต้น ซึ่งผลการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในเลือด, ปริมาณเอ็นไซม์ ในน้ำปัสสาวะ, ผลยับยั้งการสะสมของสาร PAH ในเซลล์บุท่อไต และผลทาง พยาธิวิทยาที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ทั้ง 2 ชนิด เป็นไปในทางเดียวกัน ซึ่งบอกได้ ว่าสตีวีโอไซด์และสตีวีออลมีผลทำลายเซลล์บุท่อไตส่วนต้นมากกว่าส่วนอื่น ๆ

(1.5 g/kg BW, S.C.) on the other plasma biochemical parameters and urinary enzymes levels simultaneous with the light and electron micrographs of the kidney were then determined. At 9 hours after S.C. injection of stevioside; plasma creatinine, plasma glutamic pyruvic transaminase (PGPT) and plasma glutamic oxaloacetic transaminase (PGOT) were significantly increased by 131.71 % ($p < 0.001$), 58.69 % ($p < 0.01$) and 161.69 % ($p < 0.01$), respectively. It is likely that stevioside is capable of inducing nephrotoxicity with evidences of the excretion of enzymes in urine. Stevioside caused a significantly increased in glucosuria, alkaline phosphatase (AP) and γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) but no significant change in proteinuria, N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) and glutathione-S-transferase (GSH-S-TF). The histopathological alterations of the kidney caused by stevioside (1.5 g/kg BW, S.C.) both in light microscope and electron microscope were the renal proximal tubular damage at 9 hours after administration. Most of the "degenerative" stage of renal proximal convoluted tubular cells were found whereas the distal convoluted tubular cells showed normal appearance.

The effects of stevioside and steviol on p-aminohippurate (PAH) accumulation were studied by using slices prepared from rat kidney cortex. Administration of stevioside (1.5 g/kg BW, S.C.) to rats significantly decreased the ability of the slices to accumulate PAH at 9 hours after administration. The degree of inhibition was 63.42% ($p < 0.001$). The addition of either stevioside

(6.25-100.0 μM) or steviol (1.5625-100.0 μM) in medium could inhibited PAH accumulation in the slices after 30 minutes incubation. This inhibitory effect was a dose-dependent manner. The inhibition on PAH accumulation of stevioside and steviol was plateau from 25.0 μM and 50.0 μM , respectively. Steviol is more potent than stevioside to inhibit PAH uptake in the slice.

There was no effect of stevioside on lipid peroxidation in the plasma and renal cortical slices at various time intervals after stevioside (1.5 g/kg BW, S.C.) administration in rats. The addition of either stevioside or steviol (both in 100.0 μM) to medium had also no effect on lipid peroxidation in rats renal cortical slices incubated at various time intervals.

Therefore, the results suggested that stevioside induced nephrotoxicity at the proximal convoluted tubules rather than glomerulus and other tubules as indicated by the changes in plasma biochemical parameters, urinary enzymes, PAH accumulation and histopathologic changes of the kidney. The mechanism by which stevioside induced nephrotoxicity did not via the lipid peroxidation.