

- 5 JUN 1999



**STEVIOSIDE AND STEVIOL : THE EFFECT ON Na⁺-K⁺ATPase
ACTIVITY AND THE CORRELATION WITH DISTRIBUTION
IN INTRACELLULAR AND EXTRACELLULAR
COMPARTMENTS OF RABBIT RENAL
PROXIMAL TUBULE**

VARAPORN PODPRASART

**With compliments
of**

วิภาดาพร วัฒนศิริ

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (TOXICOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

1998

ISBN 974-661-991-8

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

310230 e.d

3736497 GRTX/M : MAJOR : TOXICOLOGY ; M.Sc. (TOXICOLOGY)

KEY WORDS : STEVIOSIDE / STEVIOL / Na⁺-K⁺ATPase / RENAL PROXIMAL TUBULE

VARAPORN PODPRASART : STEVIOSIDE AND STEVIOL: THE EFFECT ON Na⁺-K⁺ATPase ACTIVITY AND THE CORRELATION WITH DISTRIBUTION IN INTRACELLULAR AND EXTERCELLULAR COMPARTMENTS OF RABBIT RENAL PROXIMAL TUBULE. THESIS ADVISORS: VARANUJ CHATSUDTHIPONG, Ph.D., CHAIVAT TOSKULKAO, D.V.M., Ph.D., PRAPIN WILAIRAT, Ph.D. 183P. ISBN 974-661-991-8.

In recent times, non-caloric sugar substitutes have come to play a crucial role in human dietary patterns. One of these sugar substitutes that is popular and well-known is named "Stevioside". Stevioside is a sweet glycoside, approximately 300 times sweeter than sucrose, and is abundant in the leaves of *Stevia rebaudiana*. The toxicity of stevioside has been extensively investigated to evaluate its safety for human consumption. Most of the investigations suggested that stevioside had no serious toxic effect. In contrast, some reports showed that stevioside could produce nephrotoxicity. Furthermore, **steviol**, a major metabolite of stevioside, induced a more potent toxic effect on kidney function than its parent compound. The exact mechanism(s), however, of stevioside- or steviol-induced nephrotoxicity remain in question. Most of the toxicants affect cell function by their presence in the cell. Therefore, this study was conducted to examine the distribution of stevioside and steviol, comparing the extra- and intracellular compartments of renal proximal tubule of rabbits, after 60 minutes exposure to these compounds. The result obtained from this study would explain how stevioside and steviol affect renal proximal tubular function and indicate the site of action of these compounds. It was found that highly purified stevioside (>95%) showed no effect on renal proximal Na⁺-K⁺ATPase activity, even at the high concentration (2.0 mM). Using HPLC analysis, it was found that stevioside could not pass into intracellular compartment of renal proximal tubule cells, whereas its metabolite, isosteviol, appeared significantly intracellularly when tubules were incubated with stevioside at concentration of 0.75 mM. Steviol had a dose-dependent inhibitory effect on renal proximal Na⁺-K⁺ATPase of about 10-18% when present at concentrations from 0.5 to 2.0 mM. Steviol was also found in significant amount in renal proximal tubule cells when steviol treatment was 2.0 mM. The data showed the positive correlation between the effect of steviol on renal proximal Na⁺-K⁺ATPase activity and steviol presence in the intracellular compartment. These findings suggested that since highly pure stevioside could not penetrate the membrane, normal function of renal proximal tubules was retained. Steviol, on the other hand, crosses the renal proximal tubules membrane into intracellular site, causing an inhibitory effect on renal proximal tubular function, as represented by the decrement in Na⁺-K⁺ATPase activity.

3736497 GRTX/M : สาขาวิชา : พืชวิทยา ; วท.ม. (พืชวิทยา)

รวาพร พจน์ประสาท : สตีวิโอไซด์และสตีวียอล : ความเกี่ยวพันระหว่างผลการทำงาน
ของเอ็่มไซม์โซเดียมโปแตสเซียมเอทีพีเอสและการกระจายตัวระหว่างของเหลวในเซลล์และนอก
เซลล์ที่ท่อไตส่วนต้นของกระต่าย (STEVIOSIDE AND STEVIOL: THE EFFECT ON $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$
ACTIVITY AND THE CORRELATION WITH DISTRIBUTION IN INTRACELLULAR AND
EXTRACELLULAR COMPARTMENTS OF RABBIT RENAL PROXIMAL TUBULE). คณะกรรมการ
ควบคุมวิทยานิพนธ์ : วรณช ฉัตรสุทธิพงษ์, Ph.D., ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, สพ.บ., Ph.D., ประพิน
วิไลรัตน์, Ph.D., 183 หน้า. ISBN 974-661-991-8

ในปัจจุบันสารทดแทนความหวานที่ให้พลังงานต่ำได้เข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวัน
มากขึ้น หนึ่งในสารทดแทนความหวานที่ได้รับความนิยมอยู่ในขณะนี้คือสตีวิโอไซด์ สตีวิโอ
ไซด์เป็นสารหลักที่มีอยู่มากในใบของต้นหญ้าหวานโดยจะให้ความหวานมากกว่าน้ำตาลซูโครส
ประมาณ 300 เท่า ความเป็นพิษของสตีวิโอไซด์ในด้านต่างๆ ได้รับการศึกษาอย่างละเอียดเพื่อความ
ปลอดภัยในการบริโภคและพบว่า สตีวิโอไซด์เป็นสารที่มีความปลอดภัยสูง แต่ทว่ามีบางรายงาน
ระบุว่า สตีวิโอไซด์สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษที่ไต ส่วนสตีวียอลซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของสตีว
ิโอไซด์ก็พบว่า สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษที่ไตได้รุนแรงกว่าสตีวิโอไซด์ กลไกที่แท้จริงที่ก่อ
ให้เกิดความเป็นพิษต่อไตของสารสตีวิโอไซด์และสตีวียอลยังคงไม่ทราบแน่ชัด สารพิษส่วนใหญ่
เกิดผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ก็ต่อเมื่อสารพิษเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้
จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกระจายของสตีวิโอไซด์และสตีวียอลระหว่างของเหลวนอกเซลล์
และในเซลล์ที่ไตส่วนต้นของกระต่ายหลังจากที่ให้สารทั้งสองและท่อไตส่วนต้นทำปฏิกิริยากัน
นาน 60 นาที ผลจากการศึกษาครั้งนี้จะช่วยในการอธิบายถึงกลไกและตำแหน่งในการออกฤทธิ์
ของสตีวิโอไซด์และสตีวียอลที่มีต่อการทำงานของท่อไตส่วนต้น การศึกษาพบว่า สตีวิโอไซด์ที่มีความ
บริสุทธิ์มากกว่า 95% ไม่มีผลต่อการทำงานของเอ็่มไซม์ $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ ที่ท่อไตส่วนต้นแม้จะใช้
ความเข้มข้นสูงถึง 2.0 mM การตรวจสอบด้วยเครื่องมือแยกและวิเคราะห์สารด้วยความดันสูง
(HPLC) พบว่า สตีวิโอไซด์ไม่สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ของท่อไตส่วนต้น ในขณะที่สตีวีย
อลซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของมันสามารถพบได้ชัดเจนภายในท่อไตส่วนต้นที่ความเข้มข้นของสตีว
ิโอไซด์ที่ใช้ 0.75 mM. สตีวียอลสามารถยับยั้งเอ็่มไซม์ $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ ได้โดยมีความสัมพันธ์ใน
ทางเดียวกันกับขนาดที่ใช้โดยจะสามารถยับยั้งเอ็่มไซม์ได้ประมาณ 10-18% ที่ความเข้มข้นระหว่าง
0.5-2.0 mM. สตีวียอลสามารถตรวจพบชัดเจนในเซลล์ที่ไตส่วนต้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของสตีว
ียอล 2.0 mM. ปริมาณของสตีวียอลที่ตรวจพบภายในท่อไตส่วนต้นมีความสัมพันธ์สอดคล้องกับ
ผลในการยับยั้งเอ็่มไซม์ $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่า สตีวิโอไซด์ที่มีความบริสุทธิ์สูงไม่
สามารถผ่านผนังเซลล์ของท่อไตทำให้การทำงานของท่อไตส่วนต้นปกติ ในทางตรงข้ามกับสตีว
ียอลซึ่งสามารถผ่านผนังเซลล์ของท่อไตส่วนต้นเข้าสู่ภายในเซลล์ จึงเกิดผลในการยับยั้งการทำงาน
ของท่อไตส่วนต้นซึ่งพบได้จากการทำงานของเอ็่มไซม์ $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ ลดลง