

ผลของสารออกฤทธิ์ต้านตัวรับแองจิโอเทนซิน (candesartan) ต่อความต้านทานของหลอดเลือดในไตของหนูขาว

เพทาย หิรัญพันธ์¹ จำนงค์ สุภัทราวิวัฒน์² และ ศิริพันธ์ หิรัญญะชาติธาดา³

Abstract

Hiranphun, P., Supatraviwat, J. and Hiranyachattada, S.

The effects of angiotensin II receptor antagonist (candesartan)
on rat renal vascular resistance

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26(4) : 485-496

The present study aimed to investigate the action of angiotensin II (AII) on renal perfusion pressure and renal vascular resistance using noncompetitive AT₁-receptor antagonist (candesartan or CV 11974). Experiments were performed in isolated kidney of adult male Wistar rats. Krebs's Henseleit solution was perfused into the renal artery at the rate of 3.5 ml/min. This flow rate was designed in order to maintain renal perfusion pressure between 80-120 mm Hg. Dose-response relationship between perfusion flow rate and AII concentration were studied. Renal perfusion pressure in response to 1, 10 and 100 nM AII were increased from basal perfusion pressure of 94±8 mm Hg to 127±6, 157±12 and 190±16 mm Hg, respectively. Administration of perfusate containing 11.4 µM candesartan for 30 min had no effect on the basal perfusion pressure. However, this significantly reduced renal perfusion pressure in the presence of AII (1, 10 and 100 nM) by 39%, 47% and 61%, (n=7, P<0.05) respectively. At the basal perfusion pressure, calculated renal

Department of Physiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand.

¹วท.ม.(วิทยาศาสตร์ชีวภาพ), นักวิทยาศาสตร์ ²วท.ม.(สรีรวิทยา), ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ³Ph.D.(Physiology), ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: paythai.h@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 2 ธันวาคม 2546 รับลงพิมพ์ 27 กุมภาพันธ์ 2547

vascular resistance was 27 ± 2 mm Hg \cdot min \cdot ml⁻¹. However, the vascular resistance were found to be 41 ± 1 , 45 ± 2 and 47 ± 2 mm Hg \cdot min \cdot ml⁻¹ when 1, 10 and 100 nM AII were added. Moreover, this dose of candesartan also showed a significant decrease in renal vascular resistance at the corresponding doses of AII by 38%, 48% and 43%, (n=7, P<0.05) respectively. The higher dose of candesartan (22.7 μ M) completely inhibited the action of 1, 10 and 100 nM AII on renal vasoconstriction. These results may indicate that the action of AII on renal vascular resistance is via AT₁-receptor, at least in rat isolated perfusion kidney.

Key words : AT₁-receptor antagonist, candesartan (CV 11974), renal perfusion pressure, renal vascular resistance

บทคัดย่อ

เพทาย หิรัญพันธุ์ จันทน์ สุภัทรววัฒน์ และ ศิริพันธุ์ หิรัญญะชาติธาดา

ผลของสารออกฤทธิ์ต้านตัวรับแองจิโอเทนซิน (candesartan)

ต่อความต้านทานของหลอดเลือดในไตของหนูขาว

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2547 26(4) : 485-496

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของฮอร์โมนแองจิโอเทนซิน II (AII) ต่อความดันภายในหลอดเลือดและความต้านทานของหลอดเลือดที่ไต โดยใช้สารออกฤทธิ์ต้านตัวรับ AII ที่จำเพาะเจาะจงต่อตัวรับประเภท AT₁ (candesartan หรือ CV-11974) ทำการทดลองในหนูขาวสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ ทำให้สลบแล้วตัดไตข้างซ้ายออกมาศึกษาโดยวิธี isolated perfused kidney ในการทดลองหาผลของ AII ต่อความดันภายในหลอดเลือดที่ไตจะใช้อัตราการไหลภายในหลอดเลือดที่ 3.5 มล/นาที จากนั้นจึงป้อนสารละลายเครปส์ (Kreb's Helseleit solution) ที่มี AII ขนาด 1, 10 และ 100 นาโนโมลาร์ที่ละขนาดตามลำดับเข้าทางหลอดเลือดแดงที่ไต พบว่า AII ทั้งสามขนาดทำให้ความดันภายในหลอดเลือดที่ไตเพิ่มขึ้นจากค่า basal perfusion pressure 94 ± 8 มม.ปรอท เป็น 127 ± 6 , 157 ± 12 , และ 190 ± 16 มม.ปรอท ตามลำดับ การทดลองโดยป้อนสารละลายเครปส์ผสม candesartan ความเข้มข้น 11.4 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที พบว่าไม่มีผลต่อค่า basal perfusion pressure แต่เมื่อทดสอบโดยให้ร่วมกับ AII ทั้งสามขนาดข้างต้น พบว่าความดันภายในหลอดเลือดที่ไตลดลง 39%, 47% และ 61% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (n=7, P<0.05) ตามลำดับ สำหรับการทดลองผลของ AII ต่อความต้านทานของหลอดเลือดที่ไต ทำโดยการป้อนสารละลายเครปส์ที่มีความเข้มข้นของ AII ขนาด 1, 10 และ 100 นาโนโมลาร์ที่ละขนาดตามลำดับด้วยอัตราการไหลภายในหลอดเลือดที่ทำให้ความดันภายในหลอดเลือดที่ไตมีค่าคงที่ระหว่าง 80-120 มม.ปรอท พบว่าขนาดของ AII ที่เพิ่มขึ้นทำให้ความต้านทานของหลอดเลือดที่ไตเพิ่มขึ้นจากค่า basal perfusion pressure 27 ± 2 มม.ปรอท นาที/มล เป็น 41 ± 1 , 45 ± 2 และ 47 ± 2 มม.ปรอท นาที/มล ตามลำดับ ในการทดลองที่ให้ candesartan ความเข้มข้น 11.4 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาทีก่อนให้ AII ที่ความเข้มข้นเดิมทั้งสามขนาด พบว่าความต้านทานของหลอดเลือดที่ไตที่เกิดจาก AII ของแต่ละความเข้มข้นลดลง 38%, 48% และ 43% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (n=7, P<0.05) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าให้ candesartan ความเข้มข้น 22.7 ไมโครโมลาร์ และทดลองเช่นเดียวกับข้างต้นสามารถยับยั้งผลของ AII ทั้งสามขนาดต่อการหดตัวของหลอดเลือดในไตได้อย่างสมบูรณ์ จากผลการทดลองครั้งนี้แสดงว่ากลไกการออกฤทธิ์ของ AII ที่ทำให้หลอดเลือดแดงหดตัวใน isolated perfused rat kidney ทำงานผ่านทางตัวรับประเภท AT₁

แองจิโอเทนซิน II (angiotensin II หรือ AII) เป็นฮอร์โมนที่ออกฤทธิ์ในระบบเรนิน-แองจิโอเทนซิน (renin-angiotensin หรือ RAS) โดยมีเรนินทำหน้าที่เป็นตัว

เปลี่ยนแองจิโอเทนซิโนเจน (angiotensinogen) ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนที่สร้างจากตับให้เป็นแองจิโอเทนซิน I (angiotensin I หรือ AI) ต่อมา AI จะถูกเปลี่ยนเป็น AII

โดย angiotensin converting enzyme (ACE) ที่ไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด สำหรับที่ไตนั้น AII สามารถออกฤทธิ์ต่อการไหลเวียนเลือดที่ไต โดยทำให้หลอดเลือดหดตัวเป็นผลให้อัตราการไหลเวียนเลือดภายในไต (renal blood flow หรือ RBF) ลดลงและมีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการกรองของไต (glomerular filtration rate หรือ GFR) โดยถ้า AII มีผลทำให้หลอดเลือดแดง afferent arteriole หดตัวจะมีผลลด GFR แต่หากมีผลทำให้ efferent arteriole หดตัวจะมีผลเพิ่ม GFR ได้ (Navar *et al.*, 1996)

การศึกษาการออกฤทธิ์ของ AII โดยใช้สารออกฤทธิ์ต้านตัวรับนั้น สามารถจำแนกสารดังกล่าวตามการทำงานผ่านตัวรับ (receptor) ของ AII ซึ่งปัจจุบันแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ตามลักษณะของยาหรือสารที่เฉพาะเจาะจงกับตัวรับนั้นๆ ตัวรับประเภทที่หนึ่งคือ AT₁ ซึ่งจะไวต่อสารพวก losartan, valsartan, eprosartan, irbesartan, telmisartan และ candesartan สำหรับตัวรับประเภทที่สองคือ AT₂ ซึ่งจะไวต่อสารพวก PD compound เช่น PD123177, PD123319, PD124125 และ CGP42112 (Chiu *et al.*, 1989; Timmermans *et al.*, 1993) สำหรับเนื้อเยื่อและอวัยวะที่พบว่ามีตัวรับชนิด AT₁ ได้แก่ กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด, หัวใจ, สมอง, ไตและต่อมหมวกไต ส่วนตัวรับชนิด AT₂ พบได้ที่สมอง, มดลูก และต่อมหมวกไต สำหรับที่ไตนั้น 90% ของตัวรับเป็นชนิด AT₁ และ

10% เป็นชนิด AT₂ (Timmermans *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993)

losartan เป็นสารออกฤทธิ์ต้านตัวรับชนิด AT₁ ตัวแรกที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง ต่อมาจึงได้พัฒนาเป็น candesartan cilexetil (TCV-116) และ candesartan (CV-11974) ซึ่งเป็นพวก non-peptide สำหรับ candesartan cilexetil เป็นสารออกฤทธิ์ต้านตัวรับชนิด AT₁ ชื่อทางเคมีคือ (±)-1-(cyclohexyloxycarbonyloxy)-ethyl 2-ethoxy-1-[[2-(1H-tetrazol-5-yl) biphenyl-4-yl] methyl]-1H-benzimidazole-7-carboxylate (Shibouta *et al.*, 1993; Nishikawa *et al.*, 1994) ใช้เป็นยาเกินเพื่อลดภาวะความดันเลือดสูงทั้งในคนและในสัตว์ทดลอง (Shibouta *et al.*, 1992; Kubo *et al.*, 1993; Inada *et al.*, 1994) ส่วน candesartan ชื่อทางเคมีคือ 2-ethoxy-1-[[2-(1H-tetrazol-5-yl) biphenyl-4-yl] methyl]-1H-benzimidazole-7-carboxylic acid (Noda *et al.*, 1993; Shibouta *et al.*, 1993) สามารถใช้ในการศึกษาแบบ in vivo โดยการฉีด และใช้ศึกษาแบบ in vitro โดยการละลายใน physiological fluid สูตรโครงสร้างของ candesartan ทั้งสองประเภท ดังแสดงใน Figure 1

ปัจจุบันการศึกษากการทำงานของ AII โดยใช้ candesartan เป็นไปอย่างกว้างขวาง ในการศึกษาฤทธิ์ของ AII ต่อหลอดเลือดแดงนั้นพบว่า candesartan มีฤทธิ์

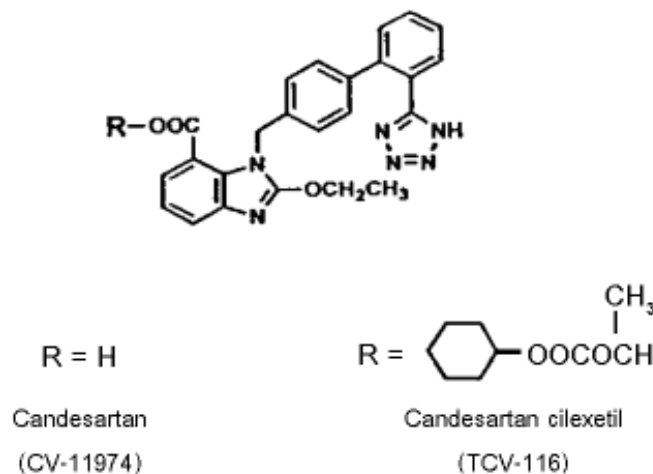


Figure 1. Structure of candesaratan (CV-11974) and candesaratan cilexetil (TCV-116)
(Adapted from: Shibouta *et al.*, 1993; Kondo *et al.*, 1996)

ทำให้หลอดเลือดแดงขยายตัว (vasodilation) ด้านการทำงานของ AII และลดความดันเลือดได้ในหนูปกติและหนู spontaneously hypertensive rats (SHR) (Kanagawa *et al.*, 1997) จากการศึกษาอื่นๆ พบว่า candesartan มีฤทธิ์ด้านการเพิ่มความดันเลือดแดงเฉื่อยที่ตอบสนองต่อ AII ในหนูขาวที่ศึกษาทั้งแบบ in vivo และ in vitro (Cervenka *et al.*, 1998; Champion *et al.*, 1998) และมีฤทธิ์ด้านการเพิ่มความดันภายในหลอดเลือดกล้ามเนื้อบริเวณขาหลังที่ตอบสนองต่อ AII ในหนูขาว (Champion *et al.*, 1998) และในหลอดเลือด mesenteric vascular beds ของแมว (Champion and Kadowitz, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่า candesartan ในขนาดที่ทำให้ความดันเลือดลดลงนั้น มีฤทธิ์ลด RBF และ GFR ลดการขับโซเดียมและลดการขับถ่ายปัสสาวะ แต่ candesartan ในขนาดที่ไม่ทำให้ความดันเลือดเปลี่ยนแปลงกลับมีผลทำให้มีการขับโซเดียมมากขึ้น ในขณะที่ RBF และ GFR ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างเด่นชัด (Cervenka *et al.*, 1997) ซึ่งการทดลองดังกล่าวทำให้ไม่ทราบแน่ชัดว่า candesartan มีผลอย่างไรในการควบคุม RBF เนื่องจากการเปลี่ยนแปลง renal hemodynamics จะมีผลกระทบต่อ RBF ก่อน นอกจากนี้ยังไม่มียางานการศึกษาถึงผลของ candesartan ต่อการควบคุม RBF จากการเปลี่ยนแปลงความต้านทานรวมของหลอดเลือดภายในไต โดยเฉพาะใน isolated perfused rat kidney

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ candesartan (CV-11974) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ต้านตัวรับแองจิโอเทนซิน II ต่อความต้านทานรวมของหลอดเลือดภายในไตเพื่อเป็นข้อมูลเพิ่มเติมความรู้เกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของ AII ต่อการควบคุมอัตราการไหลเวียนเลือดที่ไต

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

การทดลองใช้หนูขาว (Wistar rats) เพศผู้ น้ำหนักตัวระหว่าง 250-350 กรัม จากหน่วยเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หนูทั้งหมดเลี้ยงในสภาพที่เหมือนกันโดยการให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป

และน้ำประปาสะอาดอย่างไม่จำกัดปริมาณภายในห้องปรับอากาศ อุณหภูมิ 25°C และควบคุมปริมาณแสงให้มีสัดส่วนเวลามืดต่อสว่างเท่ากับ 12:12 ชั่วโมง

ยาและสารเคมี

1. physiological fluid เป็นสารละลายเครบส์ (Krebs' Henseleit solution; mM: NaCl, 118; KCl, 4.8; CaCl₂, 2.5; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄·7H₂O, 1.2; NaHCO₃, 25; D-glucose, 11)
2. Angiotensin II, Sigma, USA
3. candesartan, Astra, Sweden
4. Heparin, Leo, Denmark
5. Sodium pentobarbitone, Sigma, USA

การเตรียมสัตว์ทดลอง

สลบสัตว์ทดลองด้วย sodium pentobarbitone 50 มก/น้ำหนักตัว 1 กก โดยฉีดเข้าช่องท้อง ผ่านแนวกลางท้องเปิดหาไตข้างซ้าย สอดท่อ polyethylene (PE 50) เข้าในหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำของไตข้างซ้ายแล้วใช้ infusion pump (model 975A, Harvard, USA) บั๊มสารละลายเครบส์ที่ควบคุมอุณหภูมิ 37°C และผ่านการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่ไตทางหลอดเลือดแดงเพื่อชะล้างเลือดภายในไตจนเกือบหมดโดยสังเกตว่าไตจะดูใสเนื่องจากไม่มีเลือดค้างอยู่ และสอดท่อ PE10 เข้าในท่อไตเพื่อให้เป็นทางออกของปัสสาวะ ตัดแยกไตข้างซ้ายออกจากตัวสัตว์ทดลองใส่ใน tissue chamber ที่บรรจุด้วยสารละลายเครบส์ 37°C ที่มีฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ตลอดเวลา โดยวิธีการนี้จะได้ isolated perfused kidney ที่สามารถให้สารละลายที่ต้องการศึกษาโดยใช้ peristaltic perfusion pump ผ่านทางหลอดเลือดแดงที่ไตได้

แผนการทดลอง

การทดลองประกอบด้วยการศึกษาทั้งหมด 4 ตอน แต่ละตอนใช้สัตว์ทดลองกลุ่มละ 4-9 ตัว

1. การศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราการไหลเวียนในหลอดเลือดที่ไต โดยใช้เครื่อง peristaltic perfusion pump กับค่าความดันภายในหลอดเลือด

ในตอนแรกหาความสัมพันธ์ระหว่างความเร็ว

ของเครื่อง peristaltic perfusion pump กับอัตราการไหล ก่อน โดยเปิดเครื่อง peristaltic perfusion pump (model miniplus 3, Gilson, USA) เพื่อปั๊มสารละลาย Krebs ผ่านท่อ PE 50 ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับที่ใช้สอดเข้าไปในหลอดเลือดแดงที่ไต ด้วยความเร็วต่ำสุดของเครื่อง เริ่มที่ความเร็ว 2.0 หน่วย ใช้หลอดทดลองรองรับสารละลาย Krebs ที่ไหลออกมาจากปลายท่อเพื่อนำไปวัดหาปริมาตรของสารละลาย Krebs ที่ถูกปั๊มมายังปลายท่อ PE ด้วยความเร็วดังกล่าว จากนั้นปรับความเร็วเพิ่มขึ้นครั้งละ 0.5 หน่วย จนกระทั่งถึงความเร็วสูงสุดของเครื่องคือ 7.0 หน่วยเพื่อหาปริมาตรของสารละลาย Krebs ที่ปั๊มด้วยความเร็วที่แตกต่างกันก่อน แล้วจึงหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราการไหลที่คำนวณมาได้จากค่าความดันภายในหลอดเลือด หลังจากเตรียม isolated perfused kidney เรียบร้อยแล้ว จึงเริ่มบันทึกค่าความดันภายในหลอดเลือดที่ไตจากหลอดเลือดแดงที่ต่อกับ pressure transducer โดยแสดงผลบนเครื่องโพลีกราฟ (model 7, Grass, USA) เริ่มที่ความเร็ว 2.0 หน่วยเช่นกันจนได้การตอบสนองของความดันภายในหลอดเลือดที่ไตที่ แล้วปรับความเร็วของเครื่อง peristaltic perfusion pump เพิ่มขึ้นทีละ 0.5 หน่วยเช่นเดิมที่จะทำให้ได้ค่าความดันภายในหลอดเลือดที่ไตขนาดต่างๆ กัน จากนั้นนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราการไหลกับค่าความดันภายในหลอดเลือดที่ไต (Tublin *et al.*, 1999)

2. การศึกษาเพื่อหาค่า equilibration time และ time control experiment

หลังจากเตรียม isolated perfused kidney เรียบร้อยแล้ว ทำการทดลองโดยใช้อัตราการไหล 3.5 มล/นาที่ (Woodman *et al.*, 1980) ที่ทำให้ความดันภายในหลอดเลือดเท่ากับความดันเลือดปกติเข้าทางหลอดเลือดแดงที่ไต บันทึกการเปลี่ยนแปลงความดันภายในหลอดเลือดเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมงเพื่อหาช่วงเวลาที่ความดันภายในหลอดเลือดเริ่มคงที่ (equilibration time) ซึ่งค่านี้จะนำไปใช้ในการทดลองอื่นๆ ต่อไป โดยจะเริ่มการทดลองหลังจากผ่านช่วงเวลา equilibration time ไปแล้ว ส่วนค่าความดันภายในหลอดเลือดในช่วงเวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมงจะนำมาเปรียบเทียบเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงว่าเป็นอย่างไร (time control experiment)

3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงความดันภายในหลอดเลือดต่อการตอบสนองของหลอดเลือดภายในไตต่อ AII โดยใช้ candesartan

หลังจากเตรียม isolated perfused kidney เรียบร้อยแล้ว เริ่มการทดลองโดยปั๊มสารละลาย Krebs ด้วยอัตราการไหล 3.5 มล/นาที่เป็นเวลา 15 นาที (equilibration time) พร้อมกับบันทึกค่าความดันภายในหลอดเลือดตลอดการทดลอง แล้วจึงปั๊มสารละลาย Krebs ที่มี AII ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 นาโนโมลาร์ ทีละขนาดโดยการปั๊มสารละลาย Krebs ที่มี AII ความเข้มข้นต่ำสุดก่อน จนเกิดการหดตัวของหลอดเลือดสูงสุด แล้วจึงปั๊มสารละลาย Krebs ต่ออีกเป็นเวลา 5 นาที จนกระทั่งการหดตัวของหลอดเลือดกลับคืนสู่ภาวะปกติ ทำการทดลองซ้ำโดยใช้สารละลาย Krebs ที่มี AII ความเข้มข้น 10 และ 100 นาโนโมลาร์ตามลำดับโดยวิธีการเดียวกัน จากนั้นปั๊มสารละลาย Krebs ผสม candesartan ที่ความเข้มข้น 11.4 และ 22.7 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้จับกับตัวรับของ AII (Ojima *et al.*, 1997) ก่อนบันทึกการเปลี่ยนแปลงความดันภายในหลอดเลือดใหม่อีกครั้งขณะปั๊มสารละลาย Krebs ผสม candesartan และมี AII ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 นาโนโมลาร์ ตามลำดับโดยวิธีการเดียวกัน นำค่าความดันภายในหลอดเลือดที่ได้มาหาค่าการตอบสนองสูงสุดเพื่อคำนวณค่า EC_{50} และหาค่า % ของการยับยั้งฤทธิ์ของ AII (% inhibition) ภายหลังจากให้ candesartan โดยคำนวณดังนี้

ค่า % ของการยับยั้งฤทธิ์ของ AII = $(\text{ความดันภายในหลอดเลือดก่อนให้สารยับยั้ง} - \text{ความดันภายในหลอดเลือดหลังให้สารยับยั้ง}) / \text{ความดันภายในหลอดเลือดก่อนให้สารยับยั้ง} \times 100$

4. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงความต้านทานของหลอดเลือดภายในไตที่ตอบสนองต่อ AII ก่อนและหลังการให้ candesartan จากค่าความดันภายในหลอดเลือดที่เปลี่ยนไปเมื่อใช้อัตราการไหลต่างๆ

หลังจากเตรียม isolated perfused kidney เรียบร้อยแล้ว บันทึกค่าความดันภายในหลอดเลือดจากการปั๊มสารละลาย Krebs ผ่านทางหลอดเลือดแดงด้วยอัตราการไหลต่างๆ กันโดยทำให้ความดันภายในหลอดเลือดมี

ค่าคงที่ในช่วง 80-120 มม.ปรอท ภายหลัง equilibrate หลอดเลือดภายในไตด้วยสารละลาย Krebs ด้วยอัตราการไหลนั้นๆ จนคงที่เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงบันทึกการเปลี่ยนแปลงค่าความดันภายในหลอดเลือดที่ไตเมื่อป้อนสารละลาย Krebs ที่มี AII ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 นาโนโมลาร์ ทีละขนาดโดยวิธีการเดียวกับข้อ 3 จากนั้นป้อนสารละลาย Krebs เพื่อให้ค่าความดันภายในหลอดเลือดกลับสู่ภาวะปกติเป็นเวลา 15 นาที แล้วป้อนสารละลาย Krebs ผสม candesartan ความเข้มข้น 11.4 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 30 นาที บันทึกการเปลี่ยนแปลงความดันภายในหลอดเลือดใหม่อีกครั้งขณะป้อนสารละลาย Krebs ผสม candesartan ที่มี AII ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 นาโนโมลาร์ ตามลำดับโดยวิธีการเดียวกัน นำค่าความดันภายในหลอดเลือดที่ได้จากการใช้อัตราการไหลต่างๆ มาคำนวณหาความต้านทานของหลอดเลือดภายในไต (Tublin et al., 1999) ดังนี้

ความต้านทานของหลอดเลือดภายในไต = ความดันเฉลี่ยภายในหลอดเลือด / อัตราการไหลภายในหลอดเลือด

การคำนวณและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบผลการทดลองจากค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบกับค่าเฉลี่ย

(mean±SEM) ของการตอบสนองของหลอดเลือด (dose-response curve) และคำนวณหาค่า EC_{50} (effective concentration) ซึ่งเป็นความเข้มข้นของยาที่ทำให้มีการตอบสนอง 50% ของการตอบสนองสูงสุด (maximum response) ของหลอดเลือดซึ่งหาได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกับการตอบสนองของหลอดเลือดดังกล่าว (Diem and Leutner, 1970) ส่วนการหาค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองใช้ Student's *t*-test และ ANOVA โดยจะยอมรับค่านัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $P < 0.05$

ผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราการไหลภายในหลอดเลือดกับค่าความดันภายในหลอดเลือด

จากการศึกษาพบว่า การเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลภายในหลอดเลือดที่ไต (RPFR) ของสารละลาย Krebs ที่ให้ผ่านหลอดเลือดแดง จะมีความสัมพันธ์กันแบบ positive correlation กับการเปลี่ยนแปลงของความดันภายในหลอดเลือดที่ไต (RPP) คือเมื่ออัตราการไหลภายในหลอดเลือดเพิ่มขึ้น ความดันภายในหลอดเลือดจะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรง โดยมีสมการความสัมพันธ์ $RPP = 42.3 RPFR - 24.3$ และ $r^2 = 0.98$ ($n=4, P < 0.05$) ดังแสดงใน Figure 2

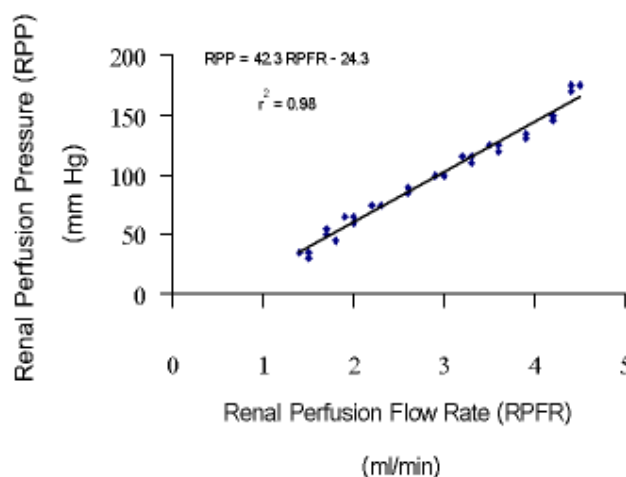


Figure 2. Relationship between renal perfusion pressure (RPP) and renal perfusion flow rate (RPFR)

$$RPP = 42.3 RPFR - 24.3, r^2 = 0.98 (P < 0.05)$$

2. ผลการศึกษาหา equilibration time และ time control

จากการบีบสารละลาย Krebs ผ่านทางหลอดเลือดแดงของ isolated perfused kidney ด้วยอัตราการไหล 3.5 มล/นาที ทำให้ค่าความดันภายในหลอดเลือดเริ่มต้นที่ใกล้เคียงกับค่าความดันเลือดปกติ จากการทดลองพบว่า ค่าเฉลี่ยของความดันภายในหลอดเลือด เมื่อเริ่มทำการทดลองเท่ากับ 113±9 มม.ปรอท (n=15) แล้วจะค่อยๆ ลดลงจนกระทั่งคงที่ที่ 94±8 มม.ปรอท ถือเป็นค่า basal perfusion pressure ที่ใช้เวลาประมาณ 15 นาที ดังตัวอย่างเส้นบันทึกการทดลองที่แสดงใน Figure 4 (A) และถือค่านี้เป็นค่า equilibration time สำหรับการทดลองในครั้งต่อไป

3. ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความดันภายในหลอดเลือดต่อการตอบสนองต่อ AII ก่อนและหลังการใช้ candesartan

Figure 3 แสดงผลการตอบสนองของหลอดเลือดในไตต่อ AII ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 นาโนโมลาร์ ก่อนและหลังการใช้ candesartan ความเข้มข้น 11.4 ไมโครโมลาร์ และตัวอย่างผลการทดลองที่ได้จากการบันทึกด้วยเครื่องโพลีกราฟ แสดงไว้ใน Figure 4 (B) และ (C)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงความดันภายในหลอดเลือดที่ไตที่ตอบสนองต่อ AII ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 นาโนโมลาร์จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ AII โดยพบว่าค่าความดันภายในหลอดเลือดเพิ่มขึ้นจากค่า basal perfusion pressure 94±8 มม.ปรอทเป็น 127±6, 157±12 และ 190±16 มม.ปรอทตามลำดับ (n=7, P<0.05) ภายหลังบีบสารละลาย Krebs ผสม candesartan ขนาดความเข้มข้น 11.4 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที พบว่า candesartan ไม่ทำให้ค่า basal perfusion pressure เปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด แต่เมื่อให้ AII ทั้งสามขนาดอีกครั้ง พบว่าค่าความดันภายในหลอดเลือดที่เกิดจาก AII นั้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็น 114±4, 127±8 และ 132±9 มม.ปรอทตามลำดับ (n=6) ดังแสดงใน Figure 3 หรือคิดเป็น 39%, 47% และ 61% ตามลำดับ นอกจากนี้ candesartan ขนาดความเข้มข้น 11.4 ไมโครโมลาร์ มีผลลดการตอบสนองสูงสุดของ AII จาก 96±16 มม.ปรอท เป็น 38±9 มม.ปรอท โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่า EC₅₀ ของการตอบสนองของหลอดเลือดภายในไตต่อ AII ค่า EC₅₀ จากการคำนวณเมื่อใช้ AII อย่างเดียว = 8.5 นาโนโมลาร์ และเมื่อให้ AII+candesartan = 9.4 นาโนโมลาร์

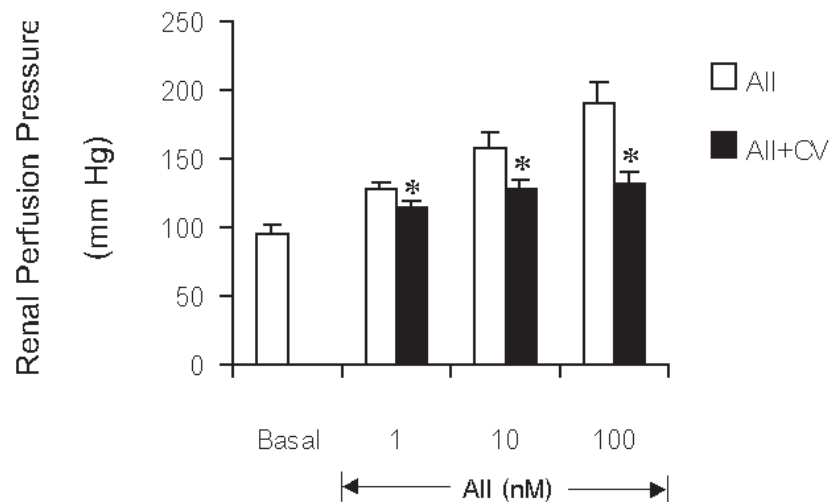


Figure 3. Effects of AII and AII+11.4 µM CV-11974 on renal perfusion pressure
Each bar represents the mean ± SEM (n = 7)
* P<0.05 compared with AII (paired t-test)

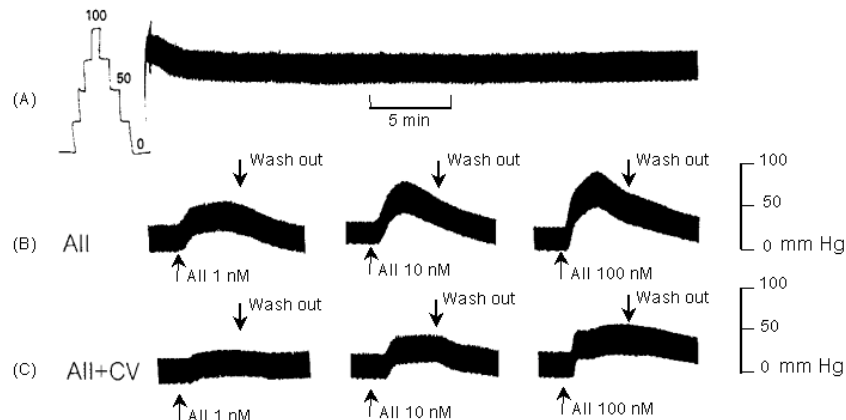


Figure 4. Effects of AII and AII+11.4 μM CV-11974 on renal perfusion pressure (A) basal perfusion pressure (B) effects of 1, 10, 100 nM AII (C) effects of 1, 10, 100 nM AII +11.4 μM CV-11974

สำหรับการทดลองที่ใช้ candesartan ขนาดความเข้มข้น 22.70 ไมโครโมลาร์ ด้วยวิธีการเช่นเดียวกันพบว่า มีผลยับยั้งการตอบสนองของหลอดเลือดภายในไตอย่างสมบูรณ์ต่อ AII ทั้ง 3 ความเข้มข้น (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง)

4. ผลการศึกษาค่าความต้านทานของหลอดเลือดภายในไตเมื่อให้ AII และเมื่อให้ AII+candesartan

จากการคำนวณพบว่าค่าความต้านทานของหลอดเลือดภายในไตจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ AII คือเพิ่มขึ้นจากค่า basal perfusion pressure 27±2 มม.ปรอท นาที/มล เป็น 41±1, 45±2 และ 47±2 มม.ปรอท นาที/มล ตามลำดับ (n=9) ภายหลังจากการบีบสารละลายแคบรีลผสม candesartan ขนาดความเข้มข้น 11.4 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที มีผลทำให้ความต้านทานของหลอดเลือดภายในไตที่ตอบสนองต่อ AII ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 นาโนโมลาร์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็น 37±1, 39±1 และ 41±1 มม.ปรอท นาที/มล ตามลำดับ (n=9) ดังแสดงใน Figure 5 โดย candesartan มีผลทำให้ความต้านทานของหลอดเลือดภายในไตที่ตอบสนองต่อ AII ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 นาโนโมลาร์ลดลง 38%, 48% และ 43% ตามลำดับเมื่อเทียบกับค่าที่ให้ AII อย่างเดียว

อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาการตอบสนองของหลอดเลือดภายในไตของหนูขาวที่แยกออกจากตัวครั้งนี้ พบว่า basal perfusion pressure มีค่า 94±8 มม.ปรอท ใกล้เคียงกับผลการทดลองของ Muller และคณะ (1997) และ Endlich และคณะ (1997) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความดันภายในหลอดเลือดดังกล่าวจะคงที่ตลอด 2-3 ชั่วโมง (n=4) หลังจากนั้นค่านี้ก็จะไม่สม่ำเสมอซึ่งอาจจะเกิดจากการเริ่มเสียสภาพการทำงานของเนื้อเยื่อต่างๆ ภายในไต ดังนั้นการทดลองทั้งหมดต่อไปจะทำให้เสร็จสิ้นภายในเวลา 3 ชั่วโมง

สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่าความดันภายในหลอดเลือดต่อการตอบสนองของหลอดเลือดภายในไตต่อ AII นั้นจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ AII และพบว่าในการทดลองใช้สารออกฤทธิ์ต้านตัวรับของ AII คือ candesartan เพียงอย่างเดียวไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่า basal perfusion pressure เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lambert และคณะ (1998) แต่จากการศึกษาผลของ candesartan ต่อการตอบสนองของหลอดเลือด mesenteric vascular beds ของแมว (Champion and Kodowitz, 1997) และผลต่อการตอบสนองของหลอดเลือดในกล้ามเนื้อ hindquarter (hindquarter vascular beds) ของแมวเช่นกัน (Lambert et al., 1998) พบว่า candesartan มีผลยับยั้งการตอบ

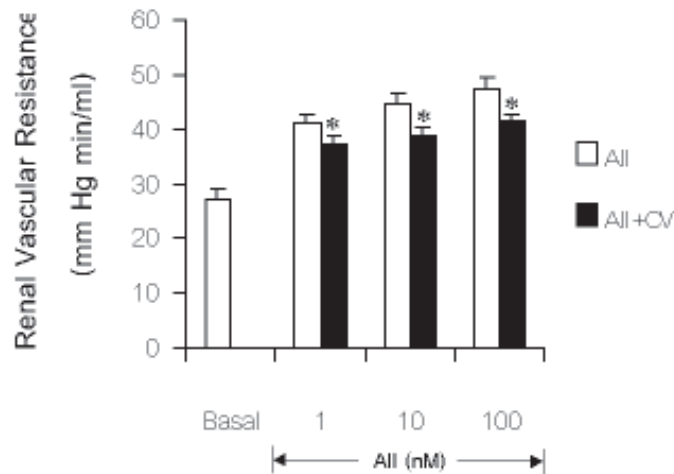


Figure 5. Effects of AII and AII+11.4 μ M CV-11974 on renal vascular resistance
Each bar represents the mean \pm SEM (n = 9)
* P<0.05 compared with AII (paired t-test)

สนองของหลอดเลือดต่อ AII ตามความเข้มข้นของ candesartan ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่า candesartan มีผลยับยั้งการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ AII โดยที่ candesartan ความเข้มข้น 11.4 ไมโครโมลาร์ มีผลทำให้การตอบสนองของหลอดเลือดภายในไตต่อ AII ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 นาโนโมลาร์โดยทำให้ค่าความดันภายในหลอดเลือดลดลง 39%, 47% และ 61% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาเบื้องต้น (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) พบว่า candesartan ในความเข้มข้นสูงชัน 2 เท่าคือ 22.7 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ AII ทั้ง 3 ความเข้มข้นดังกล่าวแบบสมบูรณ์ (complete inhibition)

สำหรับผลของ candesartan ที่ใช้ในผู้ป่วยความดันเลือดสูงก็มีรายงานขัดแย้งกันในการศึกษาเรื่อง renal function เช่น การศึกษาของ Buter และคณะ (1997) พบว่า candesartan cilexetil มีผลเพิ่ม RPF และลด filtration fraction (FF) โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลง GFR แต่ Fridman และคณะ (1998) พบว่า candesartan cilexetil มีผลเพิ่ม RPF และ GFR โดยที่ FF ไม่เปลี่ยนแปลง แม้การทดลองในสัตว์ทดลองก็มีรายงานที่ขัดแย้งเช่นกัน Cervenka และคณะ (1998) ทำการศึกษาในหนูขาวปกติที่ให้ AII พบว่า candesartan cilexetil มีผลลดความดันเลือด ลดการขับโซเดียม RPF, GFR และการ

ขับถ่ายบัสสาวะ แต่จากการศึกษาของ Cervenka และคณะ เช่นกัน (1999) ที่ศึกษาในหนู two-kidney, one clip (2K1C) renal hypertension พบว่า candesartan cilexetil ไม่มีผลลดความดันเลือด แต่มีผลเพิ่ม RPF, GFR และการขับโซเดียม

สำหรับ CV-11974 ซึ่งเป็น active metabolite ของ candesartan cilexetil (TCV-116) (Shibouta *et al.*,1993; Kondo *et al.*,1996) มีรายงานการศึกษาโดย Widdop และคณะ (1994) พบว่า candesartan มีผลก่อให้เกิดภาวะ hyperemic vasodilatation จึงทำให้ความดันเลือดลดลงได้ และ candesartan ยังมีผลเพิ่ม RPF และเพิ่ม conductance ของหลอดเลือดด้วย ต่อมามีการศึกษาเพิ่มเติมในหนู 2K1C ที่ชักนำให้เกิดภาวะความดันเลือดสูงมาวัด blood flow โดยวิธี Laser Doppler Flowmetry ในหลอดเลือด 3 ชนิดคือ renal, mesenteric และ hindquarter vascular beds พบว่า candesartan มีผลยับยั้งฤทธิ์ของ AII ทำให้เกิดภาวะ vasodilatation ในหลอดเลือด renal vascular beds เปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของ candesartan ได้มากกว่าหลอดเลือดชนิดอื่นๆ ทำให้ภาวะความดันเลือดสูงลดลงได้ (Li and Widdop, 1995)

Sachinidis และคณะ (1996) และ Flesch และคณะ (1997) พบว่า candesartan มีฤทธิ์ยับยั้งผลของ AII

ในการชักนำให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดเจริญเติบโต (cell growth-promotion effect) ต่อมา Nishimura และคณะ (1998) ศึกษาในหนู Wistar Kyoto ที่มีความดันเลือดปกติและในหนู SHR ที่มีความดันเลือดสูงโดยวิธี Laser Doppler Flowmetry พบว่า candesartan มีผลลดความดันเลือดได้ในหนูทั้งสองชนิด สำหรับการทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาใน isolated perfused kidney ที่ความดันทานส่วนใหญ่เกิดจากการหดตัวของ afferent และ efferent arterioles พบว่า candesartan มีผลยับยั้งฤทธิ์ของ AII โดยมีผลลดการตอบสนองสูงสุดแต่ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่า EC_{50} ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่า candesartan มีผลยับยั้งฤทธิ์ของ AII ในการชักนำให้หลอดเลือด aorta ของกระต่ายลดการหดตัวตอบสนองสูงสุด (maximum contractile response) เป็นแบบ non-competitive antagonist (Noda *et al.*, 1993; Shibouta *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังพบว่าผลการยับยั้งฤทธิ์ของ AII โดย candesartan จะลดลงเมื่อเพิ่ม losartan ความเข้มข้นสูงๆ ลงไปด้วย มีผลให้ candesartan ที่จับกับ receptor แล้วนั้นจะถูกแทนที่ด้วย losartan เมื่อใส่ AII เพิ่มลงไปอีกจึงยังสามารถจับกับ receptor ได้อีก ซึ่งมีความแตกต่างกับการใช้ candesartan เพียงอย่างเดียวที่จะจับกับ receptor แบบ irreversible (Ojima *et al.*, 1997)

ปัจจุบันเป็นที่ทราบแล้วว่า AII ในไตมีส่วนเกี่ยวข้องกับ nitric oxide (NO) ที่สร้างจากเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelium cell) (Ito *et al.*, 1991; Sigmon *et al.*, 1992) และมีผลร่วมกันในการควบคุมความดันเลือดและการไหลเวียนเลือดในไต (Baylis *et al.*, 1990) จากการศึกษาของ Thorup และคณะ (1998) ใน isolated perfused renal resistance arteries พบว่า losartan และ candesartan ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ต้านตัวรับของ AII ไม่มีผลต่อการหลั่ง NO ในภาวะปกติแต่มีผลลดฤทธิ์ของ AII ในการชักนำให้เกิดการหลั่ง NO ได้ แสดงให้เห็นว่า AII ที่มีผลทำให้หลอดเลือดที่มีเซลล์บุผนังหลอดเลือดเกิดการหดตัวได้นั้นเป็นผลมาจากการทำงานผ่าน AT_1 -receptor ซึ่งน่าจะมีส่วนทำให้ลดการหลั่งของ NO ลง หรือ NO ออกฤทธิ์ได้ไม่เต็มที่ นอกจากนี้ Dendorfer และคณะ (1998) ยังได้ศึกษาพบว่าการใช้ candesartan ซึ่งเป็นสาร

ออกฤทธิ์ต้านตัวรับชนิด AT_1 -receptor นั้นมีผลลดฤทธิ์ของ AII ในการชักนำให้เกิดการหลั่งสาร catecholamine (adrenaline และ noradrenaline) ทั้งจาก presynaptic sympathetic nerves และ adrenal medulla ของหนู pithed rats ซึ่งจะต้องมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับ AT_1 -receptor antagonist กับการหลั่งของ NO และสาร catecholamine กันต่อไป

บทสรุป

การออกฤทธิ์ของ angiotensin II ที่มีผลเพิ่มความดันทานรวมของหลอดเลือดภายในไตมีกลไกผ่านทาง AT_1 -receptor โดยที่ candesartan (CV-11974) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ต้านตัวรับของ AII ประเภท 1 (AT_1 -receptor antagonist) สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการตอบสนองของหลอดเลือดและการเปลี่ยนแปลงความดันภายในหลอดเลือดที่เกิดจาก AII ได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ขอขอบคุณบริษัท Astra ประเทศสวีเดน ที่ให้ความอนุเคราะห์ candesartan (CV-11974) ขอขอบคุณภาควิชาสรีรวิทยาคณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Baylis, C., Harton, P. and Engels, K. 1990. Endothelium derived relaxing factor control renal hemodynamics in normal rat kidney, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1: 875-881.
- Buter, H., Navis, G., de Zeeuw, D. and de Jong, P.E. 1997. Renal hemodynamic effects of candesartan in normal and impaired renal function in humans, *Kidney Int.*, (Suppl. 63): S185-S187.
- Cervenka, L., Wang, C.T. and Naver, L.G. 1997. Effects of acute AT_1 receptor blockade by candesartan on arterial pressure, cortical renal blood flow response to angiotensin II and on renal function,

- FASEB. J., 11: 1548-1548.
- Cervenka, L., Wang, C.T. and Naver, L.G. 1998. Effects of acute AT₁ receptor blockade by candesartan on arterial pressure and renal function in rats, *Am. J. Physiol.*, 274 (Renal Physiol. 43): F940-F954.
- Cervenka, L., Wang, C.T., Mitchell, K.D. and Naver, L.G. 1999. Proximal tubular angiotensin II levels and renal functional responses to AT₁ receptor blockade in nonclipped kidneys of Goldblatt-hypertensive rats, *Hypertension.*, 33: 102-107.
- Champion, H.C. and Kadowitz, P.J. 1997. Analysis of the effects of candesartan in the mesenteric vascular beds of the cat, *Hypertension.*, 30: 1260-1266.
- Champion, H.C., Czaplá, M.A. and Kadowitz, P.J. 1998. Responses to angiotensin peptide are mediated by AT₁ receptor in the rat, *Am. J. Physiol.*, 274. (Endocrinol. Metab.37): E115-E123.
- Chiu, A.T., Herblin, W.F., McCall, D.E., Ardecky, R.J., Carini, D.J., Duncia, J.V., Pease, L.J., Wong, P.C., Wexler, R.R., Johnson, A.L. and Timmermans, P.B.M.W.M. 1989. Identification of angiotensin II receptor subtypes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165: 196-203.
- Dendorfer A., Raasch, W., Tempel, K. and Dominiak, P. 1998. Interaction between the renin - angiotensin system (RAS) and the sympathetic system, *Basic Res. Cardiol.*, 93 (Suppl. 2): 24-29.
- Diem, K. and Leutner, C. 1970. Document Geigy Scientific Tables, 7th. ed., Basle. J.R., Geigy.
- Endlich, K., Muller, C., Barthelmebs, M. and Helwig, J.J. 1997. Role of shear stress in nitric oxide - dependent modulation of renal angiotensin II vasoconstriction, *Br. J. Pharmacol.*, 127: 1929-1935.
- Flesch, M., Ko, Y., Seul, C., Dusing, R., Feltkamp, H., Vetter, H. and Sachinidis, A. 1997. Effect of TCV-116 and CV 11974 on angiotensin II - induced responses in vascular smooth muscle cells, *Eur. J. Pharmacol.*, 289: 399-402.
- Fridman, L., Anderson, O.K., Wysocki, M., Friberg, P. and Sunzel, M. 1998. Acute effects of candesartan cilexetil (the new angiotensin II antagonist) on systemic and renal haemodynamics in hypertensive patients, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 54: 497-501.
- Inada, Y., Wada, T., Shibouta, Y., Ojima, M., Sanada, T., Ohtsuki, K., Itoh, K., Kubo, K., Kohara, Y., Naka, T. and Nishikawa, K. 1994. Antihypertensive effects of a highly potent and long-acting angiotensin II subtype -1-receptor antagonists, (±)-1-(cyclohexyloxycarbonyloxy) -ethyl 2-ethoxy-1-[[2-(1H-tetrazol-5-yl) biphenyl-4-yl] methyl]-1H-benzimidazole-7-carboxylate (TCV-116), in various hypertensive rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 268: 1540-1547.
- Ito, S., Juncos, L.A., Nushiro, N., Johnson, C.S. and Carretero, O.A. 1991. Endothelium-derived relaxing factor modulates endothelin active in afferent arterioles, *Hypertension.*, 17: 1052-1056.
- Kanagawa, R., Wada, T., Sanada, T., Ojima, M. and Inada, Y. 1997. Regional hemodynamic effects of candesartan cilexetil (TCV-116), an angiotensin II AT(1)- receptor antagonist, in conscious spontaneously hypertensive rats, *Japanese. J. Pharmacol.*, 73: 185-190.
- Kondo, T., Yoshida, K., Yoshimura, Y., Motohashi, M. and Tanayama, S. 1996. Characterization of conjugated metabolites of a new angiotensin II receptor antagonist, candesartan cilexetil, in rats by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry following chemical derivatization, *J. Mass. Spectrometry.*, 31: 873-878.
- Kubo, K., Kohara, Y., Yoshimura, Y., Inada, Y., Shibouta, Y., Furukawa, Y., Kato, T., Nishikawa, K. and Naka, T. 1993. Non-peptide angiotensin II receptor antagonists: synthesis and biological activity of potential prodrugs of benzimidazole-7- carboxylic acids, *J. Med. Chem.*, 36: 2343-2349.
- Lambert, D.G., Champion, H.C. and Kadowitz, P.J. 1998. Inhibition effects of candesartan on responses to angiotensin peptides in the hindquarter vascular beds of the cat, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 76: 133-140.
- Li, X.C. and Widdop, R.E., 1995. Regional haemodynamic effects of the AT₁ receptor antagonist CV 11974, in conscious renal hypertensive rats, *Hypertension.*, 26: 989-997.

- Muller, C., Endlich, K., Barthelmebs, M. and Helwig, J.J. 1997. AT₂-antagonist sensitive potentiation of angiotensin II - induced vasoconstrictions by blockade of nitric oxide synthesis in rat renal vasculature, *Br. J. Pharmacol.*, 122: 1495-1501.
- Navar, L.G., Inscho, E.W., Majid, D.S.A., Imig, J.D., Harrison-Bernard, L.M., Mitchell, K.D. 1996. Paracrine regulation of the renal microcirculation, *Physiol Rev.*, 76: 425-536.
- Nishikawa, K., Inada, Y., Shibouta, Y., Wada, T., Ojima, M., Kubo, K. and Naka, T. 1994. Pharmacological profile of a novel nonpeptide angiotensin II subtype 1 receptor antagonist, TCV-116, *Blood Pressure.*, 3 (Suppl. 5): 7-14.
- Nishimura, Y., Xu, T., Johren, O., Heuser, W. and Saavedra, J.M. 1998. The angiotensin AT₁ receptor antagonist CV 11974 regulates cerebral blood flow and brain angiotensin AT₁ receptor expression, *Basic Res. Cardiol.*, 93 (Suppl. 2): 63-68.
- Noda, M., Shibouta, Y., Inada, Y., Ojima, M., Wada, T., Sanada, T., Kubo, K., Kohara, Y., Naka, T. and Nishikawa, K. 1993. Inhibition of rabbit aortic angiotensin II (AII) receptor by CV 11974, a new nonpeptide AII antagonist, *Biochem. Pharmacol.*, 46: 311-318.
- Ojima, M., Inada, Y., Shibouta, Y., Wada, T., Sanada, T., Kubo, K. and Nishikawa, K. 1997. Candesartan (CV 11974) dissociates slowly from the angiotensin AT₁ receptor, *Eur. J. Pharmacol.*, 319: 137-146.
- Sachinidis, A., el Haschimi, K., Ko, Y., Seul, C., Dsing, R. and Vetter, H. 1996. CV 11974, the active metabolite of TCV-116 (candesartan), inhibits the synergistic or additive effect of different growth factors on angiotensin II induced proliferation of vascular smooth muscle cells, *Biochem. Pharmacol.*, 52: 123-126.
- Shibouta, Y., Inada, Y., Ojima, M., Kubo, K., Kohara, Y., Naka, T. and Nishikawa, K. 1992. Pharmacological profile of TCV-116, a highly potent and long-acting angiotensin II (AII) receptor antagonists, *J. Hypertens.*, 10 (Suppl. 4): S143.
- Shibouta, Y., Inada, Y., Ojima, M., Wada, T., Noda, M., Sanada, T., Kubo, K., Kohara, Y., Naka, T. and Nishikawa, K. 1993. Pharmacological profile of a highly potent and long-acting angiotensin II receptor antagonists, (2-ethoxy-1-[[2-(1H-tetrazol-5-yl) biphenyl-4-yl] methyl]-1H-benzimidazole-7-carboxylic acid (CV 11974), and its prodrug, (±)-1-(cyclohexyloxycarbonyloxy)-ethyl 2-ethoxy-1-[[2-(1H-tetrazol-5-yl) biphenyl-4-yl] methyl]-1H-benzimidazole-7-carboxylate (TCV-116), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 266: 114-120.
- Sigmon, D.H., Carretero, O.A. and Beierwaltes, W.H. 1992. Angiotensin dependence of endothelium-mediated renal hemodynamics, *Hypertension.*, 20: 643-650.
- Thorup, C., Kornfeld, M., Winaver, J. M., Goligorsky, M.S. and Moore, L.C. 1998. Angiotensin II stimulates nitric oxide release in isolated perfused renal resistance arteries, *Pflugers Arch.*, 435: 432-434.
- Timmermans, P.B.M.W.M., Wong, P.C., Chiu, A.T, Herblin, W.F., Benfield, P., Carini, D.J., Lee, R.J., Wexler, R.R., Saye, J.A.M. and Smith, R.D. 1993. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists, *Pharmacol. Rev.*, 45: 205-251.
- Tublin, M.E., Tessler, F.N., Murphy, M.E. 1999. Correlation between renal vascular resistance, pulse pressure, and the resistive index in isolated perfused rabbit kidneys, *Radiology.*, 213: 258-264.
- Widdop, R.E., Li, X.C. and Jarrott, B. 1994. Regional haemodynamic effects of the novel AT₁ receptor antagonist, CV 11974, in conscious rats, *Blood Press.*, 3 (Suppl. 5): 15-20.
- Woodman, O.L., Rechtman, M.P. and Lang, W.J. 1980. A comparison of the responses to some dopamine - receptor agonists and antagonist in the isolated perfused rat kidney, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 248: 203-211.
- Zhang, J.C., Van Meel, A., Pfaffendorf, M. and Van Zwieten, P. 1993. Different types of angiotensin II receptor antagonism induced by BIBS 222 in the rat portal vein and rabbit aorta; the influence of receptor reserve, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 269: 509-514.