

- mgr. Bożena Bądekowska -

ZS  
131



ZAKŁAD FIZJOLOGII STOSOWANEJ  
H3145  
INSTYTUT - CENTRUM MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ PAN

---

---

B o ż e n a      B ą d z y ń s k a

MECHANIZM DZIAŁANIA PRZEDSIONKOWEGO PEPTYDU  
NATRIURETYCZNEGO /A.N.P./ NA WYDALANIE  
SODU I WODY PRZEZ NERKĘ SZCZURA.

R o z p r a w a   d o k t o r s k a  
P r o m o t o r :  
Prof.dr hab med. Janusz Sadowski

---

---

Składam gorące podziękowania mojemu  
promotorowi, profesorowi Januszowi Sadowskiemu  
za pomoc, wskazówki, opiekę i serdeczność.  
Dziękuję również Eli Kompanowskiej i wszystkim,  
dzięki uprzejmości których  
praca ta mogła powstać.

# S P I S T R E Ś C I

	str.
1. WSTĘP	1
1.1. Rola zmian hemodynamiki nerek	3
1.1.1. Wzrost filtracji kłębuszkowej	3
1.1.2. Rola zjawiska "wash-out"	6
1.2. Bezpośredni wpływ ANP na transport kanalikowy	9
1.2.1. Działanie ANP na kanalik proksymalny	9
1.2.2. Działanie ANP na pętlę Henlego	10
1.2.3. Działanie ANP na kanalik zbiorczy	11
1.3. Znaczenie gradientu ciśnień hydraulicznych w strukturach rdzenia nerki	13
CEL PRACY	14
2. MATERIAŁ I METODY	15
2.1. Materiał doświadczalny	15
2.2. Przygotowanie zwierząt do doświadczenia	15
2.3. Pomiar RBF	16
2.4. Pomiar admittancji elektrycznej	17
2.5. Przebieg doświadczenia	20
2.6. Metody analityczne i obliczenia	21
3. WYNIKI	26
3.1. Charakterystyka czynności wydalniczej nerek	26
3.2. Charakterystyka hemodynamiki nerek	28
3.2.1. Zmiany ciśnienia krwi po infuzji ANP	29
3.2.2. Zmiany przepływu krwi i osocza przez nerkę	30

	str.
3.3.3. Zmiany GFR, $E_{in}$ i FF po infuzji ANP	30
3.3. Zmiany admitancji po infuzji ANP	31
4. DYSKUSJA	34
4.2. Zmiany hemodynamiczne	34
4.2.1. Ciśnienie tętnicze	35
4.2.2. Przepływ krwi przez nerkę	35
4.2.3. Filtracja kłębuszkowa	38
4.3. Zmiany stężenia elektrolitów w rdzeniu nerki /pomiary admitancji/	42
PODSUMOWANIE I WNIOSKI	46
PISMIENNICTWO	I-VII
TABELE 1-5	

## 1. W S T Ę P

Już w latach 50-tych w przebiegu badań mechanizmów regulujących objętość płynów ustrojowych Henry, Gauer i wsp. zwrócili uwagę, że rozciąganie przedsionków serca związane ze zwiększonym ich wypełnieniem krwią wywiera działanie diuretyczne <sup>42</sup>.

W 1964r. Jamieson i Palade wykryli ziarnistości w komórkach mięśniowych przedsionków i zasugerowali, że są to ziarnistości wydzielnicze <sup>48</sup>. Jednak dopiero w 1981r. de Bold i współpracownicy stwierdzili, że wyciąg z mięśni przedsionków wywołuje znaczną diurezę i wzrost wydalania soli u szczurów <sup>21</sup>. Intensywne badania doprowadziły wkrótce do wyizolowania czynnej substancji z tego wyciągu, jej oczyszczenia, ustalenia składu chemicznego <sup>27,50</sup> i syntezy <sup>83</sup>. Substancję nazwano przedsionkowym czynnikiem lub peptydem natriuretycznym /ANF, ANP/. Budowę, działanie biologiczne oraz proponowaną rolę ANP w homeostazie przedstawiono już w licznych opracowaniach poglądowych <sup>4,20,24,26,33,34,53,60,66,73,74,86,95,99,100,101</sup>.

Prekursorem ANP jest polipeptyd zbudowany ze 126 aminokwasów. Aktywne formy hormonu, krążące we krwi, powstają w wyniku proteolizy jego prekursora w miocytach przedsionków. Najlepiej poznanymi odmianami ANP jest peptyd ludzki /hANP/ i szczurzy /rANP/. Charakterystyczną cechą budowy łańcucha

peptydu jest mostek dwusiarczkowy pomiędzy dwiema cysteinami, który stanowi aktywne centrum cząsteczki hormonu i punkt uchwytu dla receptora. Hormon szczurzy różni się od ludzkiego jednym aminokwasem - zamiast izoleucyny /występującej w h ANP/ występuje w nim metionina.

Głównym czynnikiem regulującym uwalnianie ANP z miocytów jest najprawdopodobniej wzrost ciśnienia krwi w przedsionku serca, a co za tym idzie mechaniczne rozciągnięcie jego ścian. Tak więc wzrost stężenia ANP we krwi obserwowano po obciążeniu organizmu płynem, w następstwie zwiększonej podaży soli, po zmianie pozycji ciała ze stojącej na leżącą, w przebiegu zastoinowej niewydolności serca i ostrej niewydolności nerek.

Miejscom działania ANP są przede wszystkim naczynia krwionośne i nerka. Nie ulega wątpliwości, że peptyd działa rozkurczająco na mięśniówkę naczyń krwionośnych, powodując obniżenie oporu naczyniowego i spadek ciśnienia tętniczego<sup>16, 28, 101</sup>. Istnieją również doniesienia, że przyczyną spadku ciśnienia tętniczego po ANP może być obniżenie objętości minutowej serca<sup>53</sup>. Działanie peptydu na nerkę sprowadza się ostatecznie do modyfikacji jej czynności wydalniczej poprzez wywoływanie silnej diurezy i wzrostu wydalania sodu /natriurezy/. Istnieją również doniesienia, że przedsionkowy hormon natriuretyczny obniża aktywność osoczową i tempo wydzielania reniny. Stwierdzono także obniżenie stężenia we krwi angiotensyny II, aldosteronu i wazopresyny.

Biorąc pod uwagę dotychczasowe wyniki badań przypuszcza się, że ANP może odgrywać istotną rolę w utrzymywaniu stałej objętości i składu jonowego płynów ustrojowych i regulacji ciśnienia tętniczego. Mimo ogromnego zainteresowania badaczy przedsionkowym peptydem natriuretycznym i lawinowego

wzrostu liczby prac z tego zakresu, wiele problemów związanych z jego działaniem i rolą w ustroju budzi liczne i uzasadnione wątpliwości. W mojej pracy skoncentrowałam się tylko na jednym zagadnieniu, podejmując próbę wyjaśnienia mechanizmu natriuretycznego i diuretycznego działania ANP.

Wśród powszechnie proponowanych mechanizmów rozważa się rolę zmian hemodynamiki nerek a w szczególności wzrostu filtracji kłębuszkowej /GFR/ i wybiórczego wzrostu przepływu krwi przez rdzeń nerki powodującego wypłukanie z niego substancji osmotycznie czynnych /zjawisko "wash-out"/. Drugi kierunek badań dotyczy bezpośredniego działania ANP na transport soli przez ścianę kanalików nerkowych. Rozpatrywano również możliwość istnienia zupełnie innego mechanizmu natriurezy, w którym istotną rolę odgrywałby gradient ciśnień hydraulicznych w strukturach rdzenia nerki.

### 1.1. Rola zmian hemodynamiki nerek.

#### 1.1.1. Wzrost filtracji kłębuszkowej.

Wzrost tempa filtracji kłębuszkowej /GFR/ oznacza wzrost przesączonego ładunku soli, co powoduje zwiększenie /w wartościach absolutnych/ tempa reabsorpcji w kanaliku proksymalnym. Ponieważ w tym odcinku zachodzi zjawisko równowagi kłębuszkowo-kanalikowej tzn. reabsorpcji ulega stały procent przesączonego ładunku, jego zwiększenie w następstwie wzrostu GFR oznacza zarówno wzrost reabsorpcji /w wartościach absolutnych/ jak i wzrost objętości płynu i ilości sodu dostarczanych do bardziej dystalnych odcinków kanalika. W pętli Henlego, kanaliku krętym dystalnym i w kanaliku zbiorczym następuje również wzrost reabsorpcji, ale i tutaj

kompensacja zwiększonej dostawy płynu kanalikowego nie jest całkowita i ostatecznie dochodzi do zwiększonego wydalania.

Liczni badacze stwierdzali wzrost GFR po podaniu ANP u szczura 12,14,15,44,46,64, u psa 10,11,62,70,84,90,91, u małp <sup>7</sup> i u zdrowych ludzi <sup>32</sup>. Podobne wyniki zanotowano w badaniach na izolowanej nerce szczura 47,65,67 oraz na izolowanym perfundowanym kłębuszku nerki psa <sup>29</sup>. Bardzo wielu autorów doszło do przekonania, że wzrost GFR jest istotnym, a nawet dominującym czynnikiem odpowiedzialnym za wzrost wydalania sodu. Badania mechanizmu wzrostu GFR po ANP wskazują, że zależy on od rozszerzenia naczyń przedkłębuszkowych i wzrostu ciśnienia hydrostatycznego w naczyniach włosowatych kłębuszka 22,29,63,69,81,96 a także od wzrostu przepuszczalności błony filtracyjnej  $/K_f/$  <sup>29</sup>. Należy jednak zwrócić uwagę, że w większości przypadków wzrost GFR uzyskiwano przy dużych, farmakologicznych dawkach ANP.

Niektórzy z badaczy stwierdzając wzrost klirensu inuliny/ $C_{in}$ / nie uznawali go za jednoznaczny ze wzrostem GFR <sup>35,38,61</sup>. Zastrzeżenia te wynikają z uwzględnienia błędu jakim obarczony jest pomiar klirensu, podczas gwałtownego wzrostu diurezy w pierwszym okresie po podaniu ANP. W takiej sytuacji rzekomy wzrost GFR może być artefaktem związanym z istnieniem tzw. przestrzeni martwej w obrębie miedniczki nerkowej. W związku z tym podejmowano próby oszacowania objętości przestrzeni martwej i wyliczeniu poprawki niwelującej rozbieżność między  $C_{in}$  i rzeczywistym GFR <sup>17,51</sup>. Warto zauważyć, że w jednym z najwcześniejszych

badani, odkrywca hormonu de Bold nie stwierdził wzrostu GFR po podaniu bogatego w peptyd wyciągu z przedsionków serca <sup>21</sup>. Również w wielu późniejszych pracach nie stwierdzono wzrostu GFR po podaniu ANP <sup>23,30,35,36,39,71,88,103</sup>.

Szereg badaczy obserwowało wyraźną zależność zmian GFR od dawki: tylko po wysokich dawkach peptydu filtracja kłębuszkowa zwiększała się <sup>25,44,70,85</sup>. Ponieważ filtrację z reguły mierzono metodą klirensową, można się spodziewać, że ten wzrost, skojarzony z szybkim i znacznym wzrostem diurezy, w wielu przypadkach był jedynie pozorny /por. wyżej/.

W związku z tymi wątpliwościami, w niektórych badaniach starano się nie dopuścić do wzrostu GFR w czasie infuzji ANP. Uzyskiwano to poprzez obniżanie ciśnienia perfuzyjnego nerki za pomocą zacisku umieszczonego na tętnicy nerkowej /u psa/ lub na tętnicy głównej powyżej odejścia t. nerkowej /u szczura/ <sup>11,12,17</sup>. Obserwowano wówczas, że przy niezmięnionej filtracji wzrost diurezy i natriurezy był znacznie mniejszy. Interpretacja tego zmniejszenia odpowiedzi na ANP jest złożona; najprawdopodobniej zależy ono zarówno od utrzymania GFR i przesączonego ładunku sodu na niezmięzionym poziomie, jak i samego obniżenia ciśnienia perfuzyjnego nerki /odwrotnie, niż w zjawisku "pressure natriuresis"/.

Zaobserwowano, że szczury z doświadczalną niewydolnością krążenia uzyskiwaną przez wytworzenie przetoki tętniczo-żylną charakteryzują się bardzo wysokim stężeniem ANP we krwi. Zwierzęta takie nie reagują wzrostem GFR, nawet na bardzo duże dawki ANP, a mimo to obserwuje się u nich znaczny wzrost diurezy i natriurezy <sup>45</sup>.

Inni autorzy wykorzystali obserwację, że jednostronna nefrektomia powoduje przejęcie przez drugą nerkę funkcji

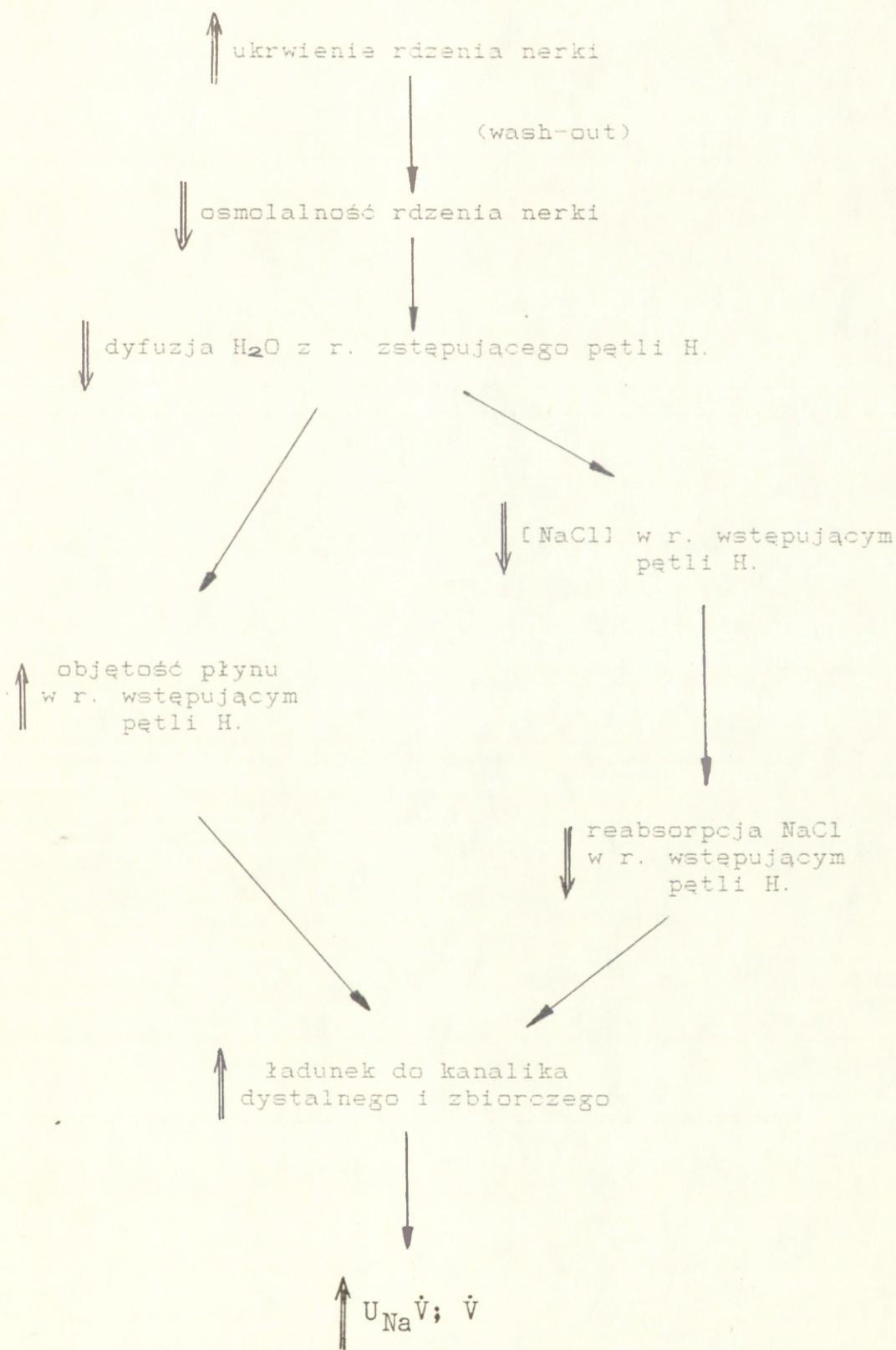
wydalniczej oraz istotne podwyższenie GFR. Stwierdzono, że pozostała nerka wykazywała znaczny wzrost wydalania soli i wody, mimo braku wzrostu filtracji po ANP <sup>7</sup>.

Jak widać z przytoczonych powyżej danych i opinii udział GFR jako czynnika wywołującego natriurezę i diurezę jest niejasny i wymaga dokładniejszego i szerszego zbadania.

#### 1.1.2 Rola zjawiska "wash-out".

Bezpośrednie badania na skrawkach nerki szczurzej wykazały, że po podaniu ANP dochodzi do obniżenia stężenia substancji osmotycznie czynnych w tkance rdzenia nerki <sup>18</sup>. Obserwacja ta wydaje się być zgodna z poglądem reprezentowanym przez wielu badaczy, że jednym z mechanizmów natriuretycznego działania ANP jest wymywanie substancji osmotycznie czynnych ze śródmiąższu rdzenia nerki w następstwie zwiększonego przepływu krwi przez naczynia proste /tzw. zjawisko wash-out/.

Wzrost przepływu krwi przez naczynia proste rdzenia powoduje wymywanie substancji osmotycznie czynnych ze śródmiąższu rdzenia nerkowego /ryc.1/. Prowadzi to do obniżenia osmolalności śródmiąższu, co ogranicza dyfuzję wody z ramienia zstępującego pętli Henlego. Dochodzi wtedy jednocześnie do: 1/ zwiększenia objętości płynu w ramieniu wstępującym oraz 2/ spadku stężenia NaCl w r. wstępującym pętli Henlego. Wynikiem obydwu tych procesów jest zwiększona dostawa wody i NaCl do odcinków dalszych, dystalnych względem ramienia wstępującego pętli Henlego i w rezultacie dochodzi do zwiększenia diurezy i wydalania sodu.



Ryc. 1. Schemat mechanizmu zjawiska "wash-out" (objaśnienie w tekście).

Starając się zweryfikować taką hipotezę wielu badaczy przeprowadzało pomiary przepływu krwi przez rdzeń nerki po podaniu ANP. W większości badań wykazano istotny wzrost przepływu krwi zarówno przez rdzeń jak i brodawkę <sup>5,31,37,52,93</sup>. Należy jednak wziąć pod uwagę duże trudności metodyczne związane z tego typu pomiarami: badacze posługujący się znakowanymi mikrosferami wykazywali po ANP tak znaczny wzrost przepływu krwi przez rdzeń /ponad 1000%/ , że należy uznać go za zupełnie nieprawdopodobny <sup>31</sup>.

W innych pracach <sup>37,90</sup> przeprowadzono pomiar przepływu krwi przez brodawkę za pomocą przepływomierza laserowo-Dopplerowskiego i również wykazano wzrost przepływu krwi przez ten obszar po podaniu hormonu. Podobne rezultaty otrzymali badacze stosujący metodę pomiaru szybkości erytrocytów w naczyniach prostych odsłoniętej brodawki za pomocą videomikroskopu fluorescencyjnego <sup>52</sup>. Jednak większość autorów jest zgodna co do tego, że wzrost przepływu krwi przez rdzeń nerkowy i brodawkę następował z pewnym opóźnieniem w stosunku do zwiększonej natriurezy i diurezy. Wynik taki sugeruje, że zjawisko "wash-out" być może odgrywa pewną rolę we wzroście wydalania sodu ale nie jest jego bezpośrednią i najistotniejszą przyczyną.

## 1.2. Bezpośredni wpływ ANP na transport kanalikowy.

Liczni autorzy, którzy przy odpowiednio dobranych dawkach ANP nie stwierdzali wzrostu GFR <sup>15,23,35,38,39</sup>, a także ci, którzy wskazywali, że działanie hormonu rozszerzające naczynia nerkowe nie może tłumaczyć ogromnego wzrostu wydalania sodu <sup>36</sup> sugerowali /jakby przez wykluczenie mechanizmów naczyniowych/ bezpośrednio działanie peptydu na transport kanalikowy. Należy tu zauważyć, że receptory wiążące ANP zostały wykryte nie tylko w naczyniach nerkowych i w komórkach mezangialnych kłębuszka, ale również w kanalikach nerkowych <sup>41,55</sup>. Wykazano także, że ANP wzmacnia syntezę cyklicznego guanozynomonofosforanu /cGMP/, uważanego za drugi przekaźnik dla tego hormonu, w komórkach brodawkowego odcinka kanalika zbiorczego <sup>1</sup>.

### 1.2.1 Działanie ANP na kanalik proksymalny.

Bezpośrednie badania wpływu ANP na transport w kanaliku proksymalnym są nieliczne. Na izolowanym kanaliku proksymalnym królika nie wykazano bezpośredniego działania ANP na transport <sup>3</sup>, należy jednak wziąć pod uwagę fakt, że tego typu pomiary wykonano in vitro, przy braku naturalnego biologicznego środowiska kanalików. Również w badaniach in vivo, przeprowadzonych za pomocą mikropunkcji kanalików proksymalnych, nie wykazano bezpośredniego wpływu ANP na transport NaCl <sup>6,58</sup>.

W przeciwieństwie do przytoczonych wyżej wyników badań bezpośrednich, określanie wskaźników pośrednich

przemawiało za istotnym zahamowaniem reabsorpcji płynu w odcinku proksymalnym kanalika. Badania te opierały się najczęściej na pomiarach klirensu nerkowego litu <sup>8,11,32,40,47,103</sup>. Wiadomo, że lit reabsorbuje się w kanaliku proksymalnym w takich samych proporcjach jak sód i woda ale w przeciwieństwie do tych ostatnich, nie ulega reabsorpcji w bardziej dystalnych odcinkach kanalika. Wobec tego klirens litu jest miarą dostawy płynu kanalikowego do ramienia zstępującego pętli Henlego, a więc i reabsorpcji  $\text{Na}^+$  w odcinku proksymalnym <sup>94</sup>. Wykazano, że ANP hamuje reabsorpcję proksymalną sodu i wody /podwyższa klirens litu/ w izolowanej nerce szczura <sup>8,47</sup>, u psów w uśpieniu barbituranowym <sup>11,103</sup> oraz u zdrowych ludzi <sup>32</sup>. W związku ze sprzecznymi wynikami pomiarów bezpośrednich i pośrednich konieczne są dalsze badania w tym kierunku.

#### 1.2.2. Działanie ANP na pętlę Henlego.

Działanie diuretyczne i natriuretyczne ANP jest tak potężne, że można go porównywać z najsilniejszymi środkami diuretycznymi. Do takich zalicza się tak zwane diuretyki pętlowe, np. furosemid i jego pochodne oraz kwas etakrynowy. W związku z tym możnaby się spodziewać, że ANP ma również swój punkt uchwytu we wstępującym odcinku pętli Henlego. Niestety badania dotyczące wpływu ANP na ten odcinek kanalika są nieliczne. Najwięcej informacji uzyskano posługując się metodą mikroperfuzji izolowanych odcinków pętli uzyskanych z nerki królika <sup>54</sup>. Nie stwierdzono wpływu ANP na transport soli w cienkim

wstępującym ramienia pętli Henlego ani w korowym i rdzeniowym odcinku grubego ramienia wstępującego. Nie wykazano również zmian przepuszczalności dla wody w obrębie ramienia zstępującego. Badania zawiesiny komórek grubego odcinka ramienia wstępującego pętli Henlego u psa nie wykazały charakterystycznych oznak biochemicznych zmian transportu pod wpływem ANP /np. zmian zużycia tlenu czy substratów/, w przeciwieństwie do wyraźnych zmian obserwowanych w obecności furosemidu <sup>97</sup>. Wszystkie te wyniki przemawiają przeciwko działaniu ANP w pętli Henlego, z zastrzeżeniem, że interpretacja tych danych musi być ostrożna ponieważ pochodzą one z badań in vitro.

Badania in vivo na nerkach z doświadczalną martwicą brodawki wykazały, że obecność nieuszkodzonych, cienkich odcinków długich pętli Henlego, należących do nefronów przyrdzeniowych, nie jest niezbędna dla wykazania natriuretycznego działania ANP <sup>43</sup>.

### 1.2.3. Działanie ANP na kanalik zbiorczy.

Wczesne doświadczenia mikropunkcyjne wskazywały, że wzrostowi wydalania sodu po infuzji ANP towarzyszy zahamowanie reabsorpcji w rdzeniowej części kanalika zbiorczego <sup>9,87</sup>. W badaniach z zastosowaniem mikrokatetyzacji zanotowano również zahamowanie reabsorpcji sodu w kanaliku zbiorczym w obrębie rdzenia wewnętrznego <sup>88</sup>. Mechanizm zahamowania transportu mógłby polegać na zwiększaniu przepuszczalności ścian kanalika dla  $\text{Na}^+$  w tym odcinku i w konsekwencji na zwiększonym biernym jego napływie do światła /zjawisko "back-flux"/.

Hipoteza ta jest zgodna z obserwacją o braku oznak biochemicznych hamowania czynnego transportu w brodawkowym odcinku kanalika zbiorczego<sup>97</sup>, ale dostarczono również danych przeczących wpływowi ANP na przepuszczalność ściany kanalika zbiorczego dla sodu<sup>69</sup>.

Najnowsze badania mikropunkcyjne przeprowadzone w dwóch różnych laboratoriach przyniosły bardzo zbliżone wyniki. Zaobserwowano zarówno zwiększoną dostawę sodu do końcowego odcinka kanalika zbiorczego, jak i zahamowanie reabsorpcji sodu, począwszy od części rdzeniowej aż po jego część brodawkową<sup>30,92</sup>. Natomiast badania *in vitro* przeprowadzone na zawieszynie komórek odcinka kanalika zbiorczego pochodzącego z rdzenia wewnętrznego dały niejednoznaczne wyniki. Wykazano, że ANP hamuje wychwytywanie  $\text{Na}^+$  i zużycie tlenu w tym odcinku u królika<sup>57, 102</sup>, natomiast w komórkach kanalika zbiorczego u psa nie udało się stwierdzić oznak biochemicznych zmniejszenia transportu<sup>97</sup>. Znaczna większość danych wskazuje jednak, że kanalik zbiorczy jest miejscem bezpośredniego działania ANP a obserwowane powszechnie zahamowanie transportu w tym odcinku przyczynia się istotnie do wzrostu wydalania sodu.

Należy tutaj zwrócić uwagę, że cytowane powyżej dane dotyczą wyłącznie odcinka kanalika zbiorczego, zlokalizowanego w rdzeniu wewnętrznym. Wiadomo, że odcinek ten odpowiedzialny jest za reabsorpcję 2% przesączonego ładunku soli<sup>49</sup>, podczas gdy wzrost wydalania sodu po ANP często sięgał 10%. Może to sugerować, że zahamowanie reabsorpcji  $\text{Na}^+$ , które udowodniono dla odcinka kanalika zbiorczego w rdzeniu wewnętrznym dotyczy również

odcinków położonych w rdzeniu zewnętrznym i korze, tj. w obszarze bardzo trudno dostępnym do badania. Sugestię tę potwierdzają dane wskazujące, że po podaniu ANP dochodzi zarówno do zahamowania transportu soli w kanaliku zbiorczym w obrębie rdzenia wewnętrznego jak i do zwiększonej dostawy soli do tego odcinka /co świadczy o zmniejszeniu reabsorbcji we wcześniejszych odcinkach kanalika/.

Dostarczono również danych wskazujących, że ANP zmniejsza przepuszczalność osmotyczną dla wody izolowanego kanalika zbiorczego szczura<sup>63</sup>. Wysunięto w związku z tym sugestię, że zatrzymywanie wody w świetle tego odcinka kanalika rozcienceza NaCl, stwarza mniej korzystny gradient dla jego reabsorbcji i tym sposobem przyczynia się do zwiększenia wydalania Na<sup>+</sup>.

### 1.3. Znaczenie gradientu ciśnień hydraulicznych w strukturach rdzenia nerki.

Wobec trudności pełnego wytłumaczenia bardzo silnego natriuretycznego działania ANP, niektórzy badacze zwracają uwagę na możliwą rolę zmian ciśnienia hydraulicznego w strukturach naczyniowych i kanalikowych rdzenia nerki po tym hormonie. Stwierdzono, że ciśnienie hydrauliczne krwi w naczyniach prostych rdzenia wzrasta po ANP dużo znacznie niż ciśnienie w pętlach Henlego i kanalikach zbiorczych<sup>64</sup>. Taka sytuacja nie sprzyja dyfuzji płynu śródmiąższowego do naczyń prostych, a więc i jego ewakuacji z krwią. Pośrednio może to również upośledzać reabsorbcję płynu z rdzeniowych odcinków kanalików, albo ułatwiać bierny jego napływ zwrotny /back-flux/ do ich

światła. Przypuszczenie to zgodne jest z hipotezą o zwiększonej przepuszczalności szczelnych złącz /tight junctions/ kanalik zbiorczego wysuwana przez badaczy posługujących się metodą mikrokateteryzacji tego odcinka<sup>88</sup>. Hipoteza o istotnej roli zjawiska back-flux w mechanizmie zmniejszenia reabsorpcji płynu kanalikowego po ANP wyjaśniałaby także nieobecność oznak biochemicznych zmniejszenia transportu kanalikowego w obecności tego hormonu<sup>97</sup>.

C e l e m p r a c y była próba wyjaśnienia szeregu wątpliwości dotyczących mechanizmu natriuretycznego działania ANP u szczura. Biorąc pod uwagę fakt, że dotychczasowy opis zmian przepływu krwi przez nerkę opierał się na wskaźnikach pośrednich / $C_{PAH}$ /, trudnych do jednoznacznej interpretacji, w niniejszej pracy mierzono ukrwienie nerki w sposób ciągły i metodą bezpośrednią. Dla uniknięcia prawdopodobnych błędów w ocenie filtracji na podstawie klirensu inuliny mierzono jej tempo równoległe jako  $C_{in}$  i  $RPF \cdot E_{in}$ . Uwzględniając fakt, że siła natriuretycznego działania ANP jest porównywalna z działaniem środków hamujących reabsorpcję  $Na^+$  w pętli Henle-go posłużono się własną metodą pozwalającą ocenić stan transportu soli w pętli na podstawie pomiarów admitancji elektrycznej tkanki rdzeniowej.

## 2. M A T E R I A Ł I M E T O D Y

### 2.1 Materiał doświadczalny.

Doświadczenia przeprowadzono na samcach szczurów rasy Wistar o średnim ciężarze ciała  $306g \pm SE/6g$ . Zwierzęta miały wolny dostęp do wody i pokarmu /standardowa chrupka białkowa/ aż do dnia doświadczenia.

### 2.2. Przygotowanie zwierząt do doświadczenia.

Szczury usypiano pentobarbitalem /Vetbutal, Puł. Zakł. Przemysłu Biowet./ w dawce 50 mg/kg ciężaru ciała dootrzewnowo. Vetbutal /roztwór 6%/ rozcieńczano roztworem Ringera; objętość płynu dostarczona zwierzęciu w tej formie odpowiadała ok. 0,8% ciężaru ciała.

W ciągu całego doświadczenia mierzono temperaturę ciała za pomocą czujnika termistorowego umieszczonego w odbyciu szczura. Stabilność temperatury /ok.  $37^{\circ}C$ / uzyskiwano dzięki lampom i płytce grzejnej na której zwierzę leżało w trakcie doświadczenia.

Po odsłonięciu tchawicy umieszczano w niej rurkę polietylenową poprawiającą drożność dróg oddechowych i w razie potrzeby umożliwiającą usuwanie zbierającej się wydzieliny.

Ciśnienie tętnicze mierzono za pomocą kaniuli wprowadzonej do t. głównej przez t. szyjną wspólną i połączonej z elektromanometrem EK 4 /Farum/ wyposażonym w przetwornik ciśnienia P 23 Db /Statham, Puerto Rico/.

Przez zakaniulowaną żyłę udową, w celu zrekompensowania utraty płynów prowadzono stałą infuzję /2,4 ml/h/ roztworu Ringera o następującym składzie:  $Na^{+}$  - 140,  $K^{+}$  - 4,  $Ca^{2+}$  - 2,  $Cl^{-}$  - 106 i  $HCO_3^{-}$  - 40 mmol/l.

Kaniulowano również żyłę jarzmową /zewnątrzną/ aby później połączyć ją pozaustrojowo z żyłą nerkową w celu pomiaru wypływu żylnego z nerki /por. niżej/.

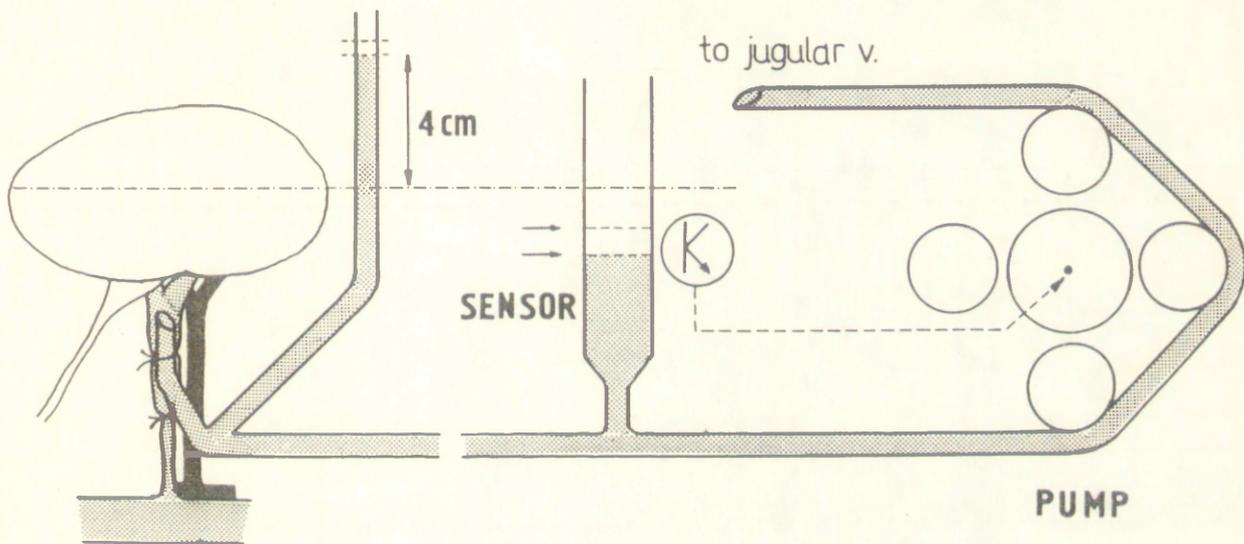
Następnie dokonywano cięcia lędźwiowego odsłaniającego lewą nerkę, którą unieruchamiano w specjalnym pojemniku, powszechnie używanym w badaniach mikropunkcyjnych kanalików nerkowych. Po wypreparowaniu moczowodu wprowadzano do niego cewnik umożliwiający zbiórkę moczu.

W dalszej kolejności usuwano tkankę tłuszczową otaczającą naczynia nerkowe /tętnicę i żyłę/ co w sposób nieunikniony wiązało się z częściowym odnerwieniem nerki. Po odsłonięciu naczyń nerkowych przystępowano do uruchomienia pozaustrojowego krążenia krwi na odcinku od żyły nerkowej do żyły jarzmowej /v. jugularis/, co umożliwiało bezpośrednio mierzenie wypływu krwi żyłnej z nerki /ryc.2/.

### 2.3. Pomiar RBF.

Szczegółowy opis pomiaru przepływu krwi przez nerkę /RBF/ przedstawiony został w publikacji metodycznej <sup>78</sup>. W tej pracy przedstawiono tylko ogólny schemat metody /ryc.2/

Kilka minut przed zakaniulowaniem żyły nerkowej zwierzęciu podawano dożylnie 100-150 j.m. heparyny, aby zapobiec tworzeniu się skrzepów w pozaustrojowym krążeniu. Po umieszczeniu kaniuli w żyłę nerkowej krew z nerki odpływała do boczniczy drenu odprowadzającego krew /z udziałem pompy rolkowej/ do ż. szyjnej. W momencie



Ryc. 2. Schemat bezpośredniego, ciągłego pomiaru całkowitego przepływu krwi przez nerkę szczura. Pompa rolkowa sterowana jest przez czujnik (K) poziomu krwi umieszczony przy bocznym zbiorniczku pozaustrojowego połączenia żyła nerkowa-żyła szyjna. Gdy krew wypływająca z nerki osiąga poziom czujnika, uruchamia on pompę, która przesuwa porcję krwi do żyły szyjnej. Objętość przepompowanej krwi jest wprost proporcjonalna do liczby obrotów pompy w jednostce czasu. Czujnik umieszczono na takim poziomie, aby ciśnienie krwi w bocznicy ( $4 \text{ cm H}_2\text{O} \approx 3 \text{ mm Hg}$ ) odpowiadało prawdziwemu ciśnieniu krwi w żyłę nerkowej. Wg. /78/.

kiedy krew w boczniczy osiągała poziom fotokomórki  $(K_2)$ , ta ostatnia wysyłała impuls do pompy powodując jej uruchomienie. Pompa przesuwiała porcję krwi do żyły szyjnej, co z kolei obniżało poziom krwi w boczniczy z fotokomórką, która wyłączała z kolei pompę itd. itd. Cykl ten powtarzał się bez przerwy w ciągu całego doświadczenia. Znając objętość krwi przepompowanej w ciągu jednego obrotu pompy oraz liczbę obrotów w określonym czasie wyliczano tempo przepływu krwi przez nerkę /RBF/. Należy zwrócić uwagę, że przepływ krwi tętnicą nerkową jest większy od wypływu żylnego o wartość diurezy i wypływu chłonki. Ten ostatni czynnik pomijano zupełnie jako ilościowo nieistotny. W przypadku dużej diurezy, np. rzędu 0,1 ml/min, stanowiła ona ok. 1,5% RBF i wówczas rzeczywistą wartość RBF wyliczano jako sumę wypływu żylnego i diurezy minutowej.

#### 2.4. Pomiar admittancji elektrycznej.

Kolejnym etapem było rozpoczęcie pomiaru admittancji elektrycznej.

Pomiary admittancji elektrycznej /odwrotność impedancji/ dla oceny stężenia elektrolitów w tkance rdzeniowej nerki zostały wprowadzone przez Sadowskiego i Portalską w 1983 r <sup>79</sup>. Mierzona impedancję /Z/ roztworu lub tkanki definiuje wyrażenie:  $Z = \sqrt{R^2 + X_c^2}$ , gdzie R oznacza opór rzeczywisty a  $X_c$  - reaktancję pojemnościową; zjawiska indukcji a więc i reaktancji indukcyjnej / $X_L$ / w roztworach i tkankach nie obserwuje się.

Dla pomiaru impedancji w roztworach stosuje się elektrody o dużej powierzchni aktywnej; udział  $X_c$  jest

wówczas tak mały, że wartość tę można pominąć, a więc  $Z = \sqrt{R^2}$  czyli  $Z=R$ . Praktycznie rzecz biorąc mierzy się wtedy opór rzeczywisty lub konduktancję /odwrotność oporu/. Natomiast w przedstawionych tutaj pomiarach tkankowych, w których zastosowano elektrody o małych powierzchniach aktywnych, wartość  $X_c$  nie jest tak mała by można ją pominąć. Wobec tego nie należy mówić o pomiarach oporności lub konduktancji, ale o impedancji  $/Z/$  i admitancji  $/Y=Z^{-1}/$ . Należy również wziąć pod uwagę fakt, że na mierzoną impedancję składały się: właściwa impedancja tkankowa oraz impedancja polaryzacyjna elektrod, która pojawia się na styku powierzchni elektrod i tkanki. Impedancja polaryzacyjna obniża się wraz ze wzrostem powierzchni aktywnej elektrod lub ze wzrostem częstotliwości prądu pomiarowego. W przedstawionych badaniach, z przyczyn technicznych nie można było zwiększyć powierzchni aktywnej elektrod. Nie było również wskazane stosowanie prądu pomiarowego o bardzo wysokiej częstotliwości. Jak wiadomo z literatury <sup>82</sup>, prąd o wysokich częstotliwościach przechodzi zarówno przez błony komórkowe jak i przez przestrzeń pozakomórkową. Korzystniejsze dla prowadzonych badań było ograniczenie pomiarów admitancji jedynie do przestrzeni pozakomórkowej - warunkiem tego było zastosowanie niezbyt wysokich częstotliwości. Ponieważ admitancja a nie impedancja jest funkcją liniową stężenia elektrolitów, w pracy tej wyniki pomiarów przedstawiano w jednostkach admitancji /mikrosiemensy/. Zależność między  $Y$  i stężeniem  $Na^+$  w tkance ustalono poprzednio empirycznie in vitro, na skrawkach

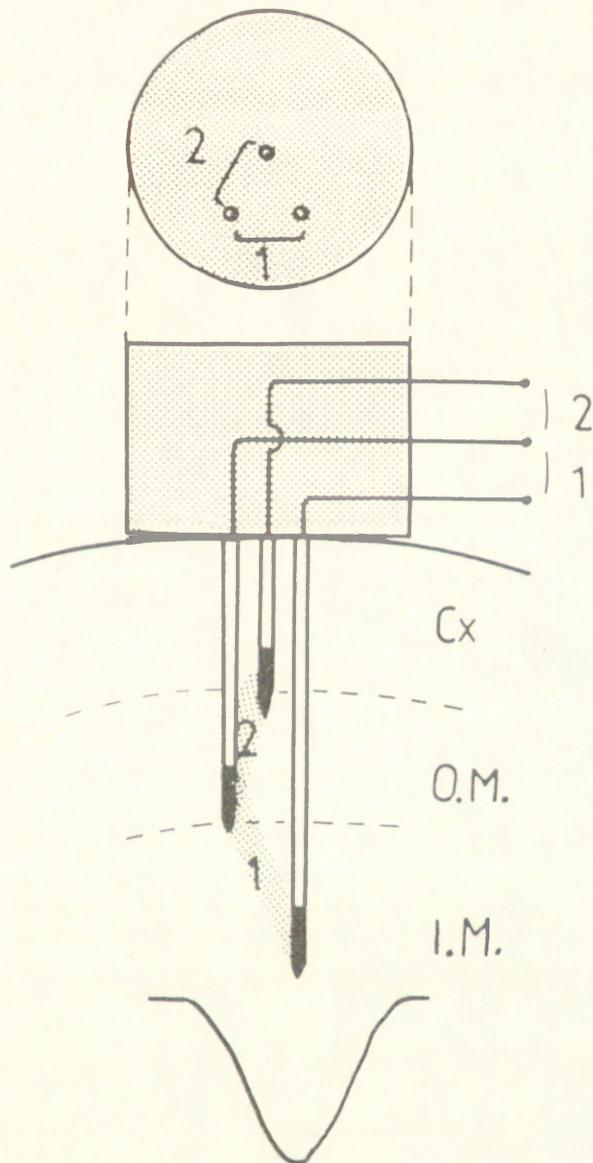
poszczególnych warstw nerki u psów<sup>79</sup> i królików<sup>72,77</sup>.

Bardziej istotną rzeczą było potwierdzenie takiej liniowej korelacji in vivo. Dokonano tego w tej pracy na szczurach. Aby uzyskać szeroki zakres stężeń  $\text{Na}^+$  w nerce wykonywano następujące zabiegi:

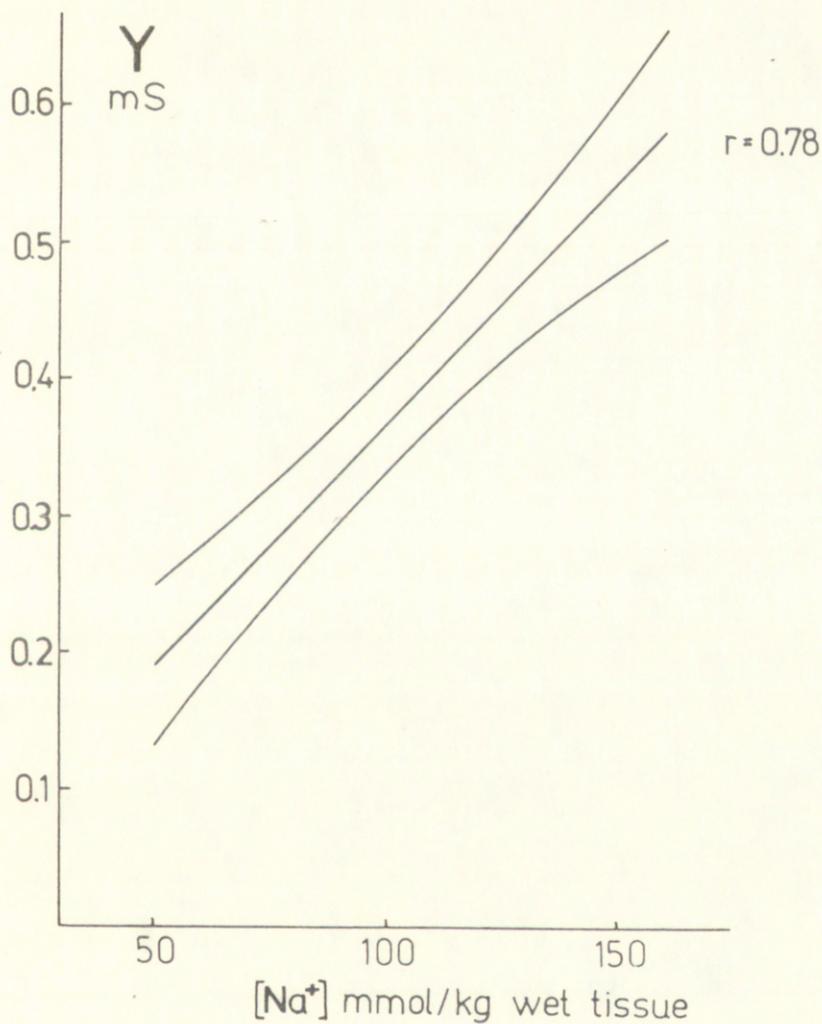
- infuzja do aorty na wysokości odejścia tt. nerkowych 9% roztworu NaCl
- powolna infuzja domiedniczkowa izotonicznego mannitolu
- infuzja do aorty 25% mannitolu
- zmniejszenie ciśnienia perfuzyjnego nerki poprzez doświadczalne zwężenie światła aorty powyżej odejścia tt. nerkowych.

Pierwszy z wymienionych zabiegów powodował wzrost a trzy pozostałe obniżenie stężenia NaCl w rdzeniu nerki i równoległe zmiany admitancji. Po jej ustabilizowaniu na podwyższonym lub obniżonym poziomie usuwano nerkę, oznaczano stężenie  $\text{Na}^+$  w rdzeniu wewnętrznym i zewnętrznym i zestawiano te dane z odpowiadającymi im wartościami admitancji. Ryc.3 ilustruje zależność admitancji in vivo od stężenia  $\text{Na}^+$  w tkance, co uzasadnia stosowanie Y jako wskaźniczka stężenia NaCl a praktycznie wszystkich elektrolitów w tkance rdzenia nerki.

Technikę pomiaru admitancji opisano szczegółowo w pracy metodycznej<sup>75</sup>. Admitancję mierzono za pomocą zestawu 3 elektrod wykonanych z drutu irydo-platynowego /ryc.4/. Najkrótsza elektroda miała 2,6 mm, średnia 4,3 mm, i najdłuższa 6,3 mm długości. Średnica każdej elektrody wynosiła 0,2 mm, powierzchnia aktywna -  $0,9 \text{ mm}^2$  i odległość między elektrodami w płaszczyźnie prostopadłej do nich - 1 mm. Jak pokazuje ryc.4 pomiar admitancji odbywał



Ryc. 4. Zestaw 3 elektrod służących do pomiaru admitancji elektrycznej w nerce szczura. Aktywne powierzchnie elektrod umieszczone są: dla najdłuższej elektrody - w rdzeniu wewnętrznym (I.M.), dla średniej - na granicy rdzenia wewnętrznego i zewnętrznego (I.M. - O.M.), dla najkrótszej - na granicy rdzenia zewnętrznego i kory (O.M. - Cx). Zaznaczono obszary tkanki podlegające pomiarowi w rdzeniu wewnętrznym (1) i zewnętrznym (2).



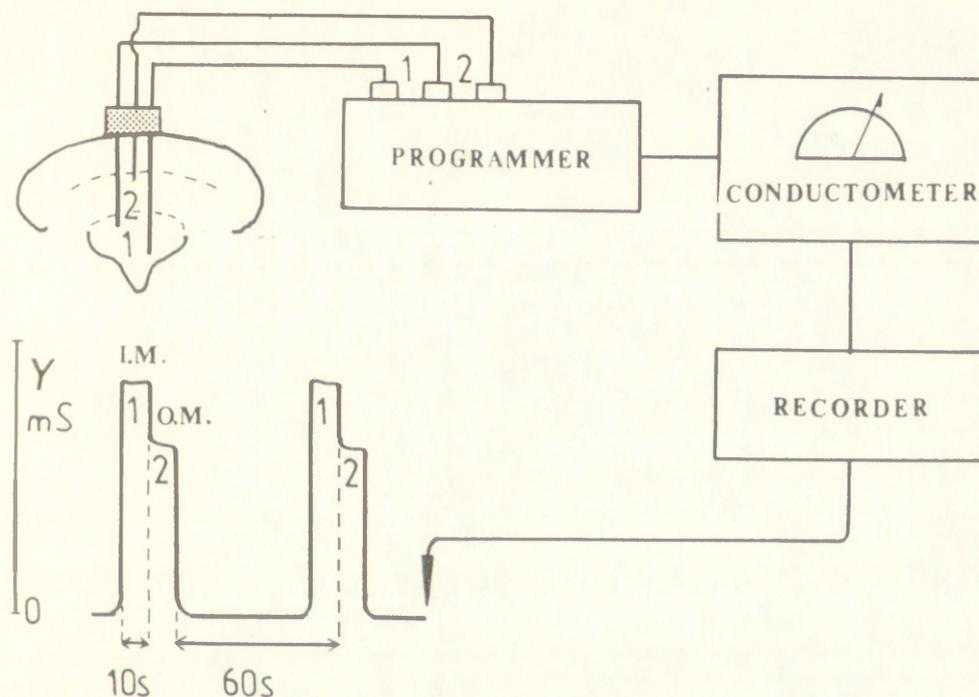
Ryc. 3. Zależność pomiędzy admitancją elektryczną tkanki nerki szczura mierzoną in vivo (Y, mS) a stężeniem jonów Na<sup>+</sup> w rdzeniu nerki (mmol/kg ciężaru mokrej tkanki). Przedstawiono prostą regresji:  $y=0.004x - 0.010$ , z przedziałem ufności na poziomie 0.05;  $n = 25$ ,  $r = 0.78$  ( $p < 0.001$ ).

się w rdzeniu wewnętrznym /obszar między najdłuższą i średnią elektrodą/ oraz w rdzeniu zewnętrznym /obszar między średnią i najkrótszą elektrodą/. Dodatkowo mierzono admitancję w rdzeniu nerkowym w obszarze między najdłuższą i najkrótszą elektrodą. Elektrody były połączone z programatorem /ryc.5/, który włączał kolejno do pracy poszczególne ich pary. Miernikiem admitancji był konduktometr laboratoryjny /N-572, Mera-Elwro/, który wskazywał wartości w mikrosiemensach  $\mu\text{S}$ /. Wartości dla rdzenia wewnętrznego, zewnętrznego i łącznie niemal całego rdzenia nerkowego rejestrowano za pomocą jednokanałowego rejestratora potencjometrycznego /ryc.5/. Częstotliwość prądu pomiarowego wynosiła 3,5 kHz.

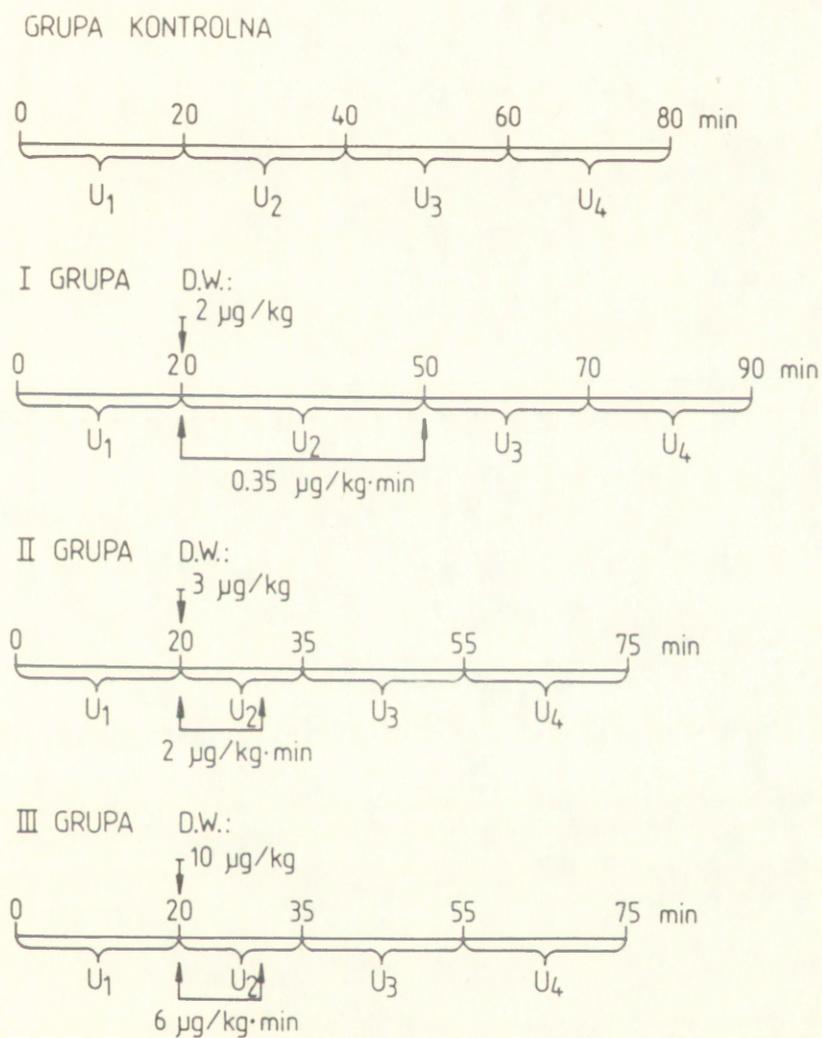
#### 2.5. Przebieg doświadczenia.

Zastosowano protokół doświadczeń powszechnie przyjęty w badaniach klirensowych. Dawkę wstępną metoksy -  $^3\text{H}$ -inuliny, 5  $\mu\text{Ci}$  w 1 ml 2% NaCl podawano dożylnie w ciągu 2-3 min. Następnie wkłuwano do nerki elektrody do pomiaru admitancji elektrycznej i rozpoczynano infuzję inuliny w tempie 6  $\mu\text{Ci}$  /w 1,2 ml 2% NaCl/ na godzinę.

Okres wyrównawczy potrzebny do ustabilizowania stężenia inuliny w osoczu, ciśnienia tętniczego krwi, przepływu krwi przez nerkę i wartości admitancji trwał od 20 do 30 min. Po tym czasie przystępowano do właściwych pomiarów. Szczury podzielono na 4 grupy: 3 grupy doświadczalne i grupę kontrolną /ryc.6/. We wszystkich grupach doświadczenie przebiegało w czterech okresach klirensowych, równoznacznych z okresami zbiórki moczu.



Ryc. 5. Schemat pomiaru admitancji elektrycznej w poszczególnych warstwach nerki szczura. Elektrody są włączane do pracy przez programator. Miernikiem admitancji jest konduktometr wskazujący wartości w mikrosiemensach ( $\mu\text{S}$ ), dane rejestrowane są za pomocą rejestratora jednokanałowego. Czas pomiaru przez poszczególne pary elektrod wynosi 10 s. I.M. - rdzeń wewnętrzny, O.M. - rdzeń zewnętrzny.



Ryc. 6. Schemat przebiegu doświadczeń w poszczególnych grupach zwierząt. U<sub>1,2,3,4</sub> - czas zbiórki moczu w kolejnych okresach doświadczalnych. Zaznaczono podanie dawki wstępnej (D.W.) ANP i czas trwania ciągłej infuzji.

W środku każdego okresu pobierano 2 próbki krwi tętniczej z tętnicy szyjnej do heparynizowanych kapilar.

W ciągu 4 min przed i po pobraniu próbek krwi tętniczej pobierano próbki krwi żyłnej nerkowej. Próbki te pobierano za pomocą pompy rolkowej z bocznicy drenu łączącego pozaustrojowo żyłę nerkową z żyłą jarzmową. Próbki krwi służyły do oznaczania stężenia znakowanej inuliny i hematokrytu, który obliczano bezpośrednio po każdym pobraniu krwi. Utratę krwi związaną z pobieraniem próbek i sączeniem się jej z ran operacyjnych /heparynizacja!/ kompensowano przez transfuzję krwi uzyskanej od szczura dawcy. Oznaczanie hematokrytu na bieżąco umożliwiało kontrolę skuteczności transfuzji.

Grupy doświadczalne różniły się między sobą wielkością dawki i czasem podawania hormonu /ryc.6/. Po okresie kontrolnym trwającym 20 min. rozpoczynano infuzję przedsionkowego peptydu natriuretycznego /ANP/ poprzedzoną dawką wstępną. Stosowany tu preparat hormonu składał się z 26 aminokwasów /ANP 8-33,101-126/ o charakterystycznej dla peptydu szczurzego sekwencji, z izoleucyną w pozycji 17 /czyli 110/ zamiast metioniny występującej w hormonie ludzkim.

Hormon rozpuszczano w 0,9% NaCl.

Grupa I - /n=11/. Dawka wstępna ANP - 2 $\mu$ g/kg ciężaru ciała.

Tempo infuzji 0,35 $\mu$ g/kg·min w ciągu 30 min.

W następnych dwóch grupach doświadczalnych skrócono czas infuzji ze względu na obserwowany - nawet przy małej dawce ANP - postępujący spadek ciśnienia krwi. Przy większych dawkach hormonu utrzymanie 30-minutowego czasu infuzji

spowodowałyby b. znaczne obniżenie ciśnienia krwi i związane z tym zaburzenia czynności nerek.

- Grupa II - /n=8/. Dawka wstępna -  $3\mu\text{g}/\text{kg}$  c.c.,  
infuzja -  $2\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{min}$  w ciągu 10 min.
- Grupa III - /n=9/. Dawka wstępna -  $10\mu\text{g}/\text{kg}$  c.c.,  
infuzja -  $5\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{min}$  przez 10 min.
- Grupa kontrolna - /n=8/. Doświadczenie podzielono na cztery 20-minutowe okresy klirensowe. Procedura doświadczalna była taka sama jak w grupach I-III z tym, że nie podawano ANP.

W szeregu doświadczeń nie udało się przeprowadzić jednocześnie wszystkich zaplanowanych pomiarów. Z tego względu wartości n w tabelach /por.3. Wyniki/ nie zawsze są identyczne z liczbą szczurów podaną dla poszczególnych grup.

## 2.6. Metody analityczne i obliczenia.

Mocz zbierano w wytarowanych probówkach Eppendorfa. Objętość moczu wyznaczano poprzez ważenie, przy założeniu, że jego ciężar właściwy nie odbiega istotnie od  $1,00 \text{ g}/\text{ml}$ . Diurezę minutową / $\dot{V}$ / obliczano i wyrażano w  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Stężenie substancji osmotycznie czynnych w moczu /osmolalność,  $U_{\text{osm}}$ / określano w oparciu o obniżenie punktu zamrzania /osmometr Fiske G-66, USA/; wartości wyrażano w  $\text{mosm}/\text{kgH}_2\text{O}$ . Stężenie sodu w moczu / $U_{\text{Na}}$ / mierzono za pomocą fotometru płomieniowego i wyrażano w  $\text{mmol}$ ach na litr / $\text{mM}$ /. Znając wartość diurezy minutowej oraz  $U_{\text{osm}}$  i  $U_{\text{Na}}$ .

obliczano tempo wydalania, substancji osmotycznie czynnych  $/\dot{U}_{osm}, \mu\text{osm}/\text{min}/$  i sodu  $/\dot{U}_{Na}, \mu\text{mol}/\text{min}/$ .

Próbki moczu i osocza zawierające znakowaną inulinę/metoksy -  $^3\text{H}$ -inulina, Dupont, Boston Mass., USA/ umieszczano w naczynkach scyntylicyjnych zawierających 5 ml płynu scyntylicyjnego Bray'a. Radioaktywność każdej próbki mierzono w liczniku scyntylicyjnym LKB 1211. Dla próbek osocza wprowadzono empirycznie ustaloną poprawkę  $/x 1,12/$  na tłumienie aktywności przez białka. Na podstawie tych danych wyliczano tempo filtracji kłębuszkowej  $/\text{GFR}/$  jako klirens inuliny równy stosunkowi stężenia znakowanej inuliny w moczu  $/\dot{U}_{in}/$  i osoczu krwi tętniczej  $/A_{in}/$  pomnożonemu przez wartość diurezy minutowej  $\frac{\dot{U}_{in}}{A_{in}} \cdot \dot{V}$ , ml/min. Obliczano również współczynnik ekstrakcji inuliny  $/E_{in}, \%/$  jako  $\frac{A_{iu} - RV_{in}}{A_{iu}}$  gdzie  $RV_{in}$  oznacza stężenie znakowanej inuliny w osoczu krwi żylniej. Wartość  $E_{in}$  /równa frakcji filtracyjnej, FF/ pozwalała na obliczenie tempa filtracji  $/\text{GFR}/$  drugą metodą, a mianowicie jako iloczyn przepływu osocza przez nerkę i  $E_{in}$ . Tempo przepływu osocza  $/\text{RPF}/$  przez nerkę określano na podstawie wartości RBF i hematokrytu wg. zależności  $\text{RPF} = \text{RBF} \cdot /1 - \text{Ht}/$ . Hematokryt oznaczano w kapilarach heparynizowanych po odwirowaniu krwi w ciągu 3 min z szybkością 13000 obr/min. Znając  $C_{iu}$  i tempo przepływu osocza przez nerkę obliczano również frakcję filtracyjną jako  $\frac{C_{in}}{\text{RPF}}$ .

Analiza statystyczna, w tekście, tabelach i na rycinach stosowano błąd standardowy średniej  $/\text{SE}/$  jako miarę rozrzutu danych. Do oceny statystycznej wyników zastosowano analizę wariancji dla pomiarów powtarzanych w czasie

/repeat measurement ANOVA/<sup>98</sup> oraz test t-Studenta dla zmiennych połączonych.

Analiza wariancji /ANOVA/ posłużyła do wstępnego ustalenia, czy w czasie doświadczeń zachodziły istotne zmiany badanych parametrów. W przypadku zmiennych charakteryzujących hemodynamikę i czynność wydalniczą nerki analizowano łącznie okres kontrolny i trzy kolejne okresy po podaniu ANP. Natomiast w przebiegu admitancji analizowano okres kontrolny i pierwszy okres doświadczalny po podaniu peptydu, jedyny, w którym zanotowano widoczne zmiany. Jeżeli otrzymana wartość F była niższa od krytycznej dla poziomu znamienności 0,05, wynik analizy uznawano za ujemny i nie stosowano żadnych innych testów statystycznych. W przypadku gdy wynik był dodatni tj.  $F > F_k$  /czyli zmiany w czasie były istotne/, stosowano test t-Studenta dla zmiennych połączonych. Miało to na celu bardziej szczegółowe przeanalizowanie badanych zmiennych i uzyskanie informacji co do istotności zmian w poszczególnych okresach doświadczalnych względem okresu kontrolnego. Gdy zmiana występowała tylko w jednym okresie lub gdy wydawało się, że jest ilościowo znaczna tylko w krótkim okresie czasu, stosowano pojedyncze porównanie. Jeżeli wyliczona wartość t osiągała poziom istotności 0,05, uznawano ją za znamienne.

Nieco inaczej analizowano zmienne, w których przebiegu zaobserwowano znaczne różnice w dwóch lub trzech okresach doświadczalnych. W tej sytuacji, aby wykluczyć przypadkowe pojawienie się istotności wynikającej z wielokrotnych porównań /każdy z trzech okresów

dośw. w stosunku do okresu kontrolnego/ korzystano ze wzoru:  $\sqrt{1-p/n} = 0,95$ <sup>13</sup>. W wyrażeniu tym n oznacza liczbę porównań, a p - wymagany poziom istotności, który staje się tym wyższy im więcej przeprowadza się porównań. Dla trzech porównań wyliczony z powyższego wzoru wymagany poziom istotności wynosi 0,017.

### 3. W Y N I K I

Większość wyników zebrano w 5 tabelach /tab.1-5/, a pozostałe /wartości admitancji/ przedstawiono graficznie /ryc.10/. Zarówno w tabelach jak i na wykresach podano średnie wartości absolutne dla poszczególnych zmiennych i błędy standardowe. Dodatkowo, dla lepszej ilustracji i łatwiejszego porównania wyników w poszczególnych grupach doświadczalnych część danych przedstawiono graficznie w formie ustandaryzowanej /zmiany %/ /ryc.7,8,9/.

#### 3.1. Charakterystyka czynności wydalniczej nerek.

Dla scharakteryzowania czynności wydalniczej nerki przeanalizowano następujące wskaźniki: diurezę minutową  $V$ , stężenie w moczu substancji osmotycznie czynnych  $U_{osm}$  i sodu  $U_{Na}$  oraz tempo wydalania substancji osmotycznie czynnych  $U_{osm}V$  i sodu  $U_{Na}V$ .

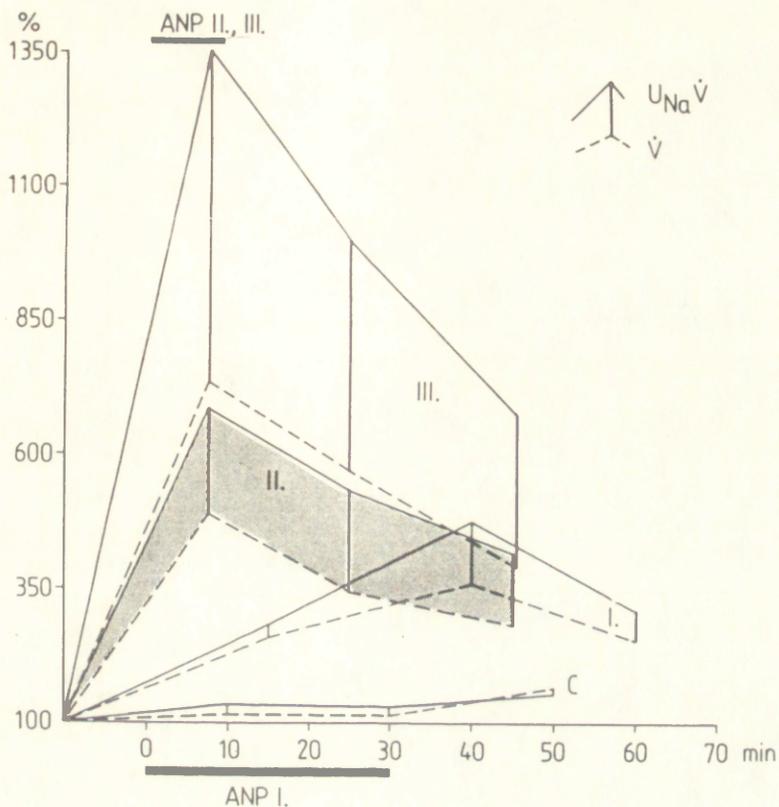
W grupie kontrolnej zbadano zachowanie się powyższych wskaźników w czasie odpowiadającym przebiegowi doświadczenia, bez podawania hormonu. Z tab.1 wynika, że wszystkie wskaźniki oprócz  $U_{osm}$  wykazywały pewne zmiany w czasie, które w świetle wyników analizy wariancji okazały się nieistotne statystycznie. Natomiast istotny był stopniowy spadek  $U_{osm}$ , prawdopodobnie związany z pewną tendencją do wzrostu diurezy.

Po podaniu ANP nastąpiły wyraźne zmiany wskaźników charakteryzujących wydalanie. Zaobserwowano różnice między grupami doświadczalnymi zależne od wielkości dawki hormonu i czasu jego podawania.

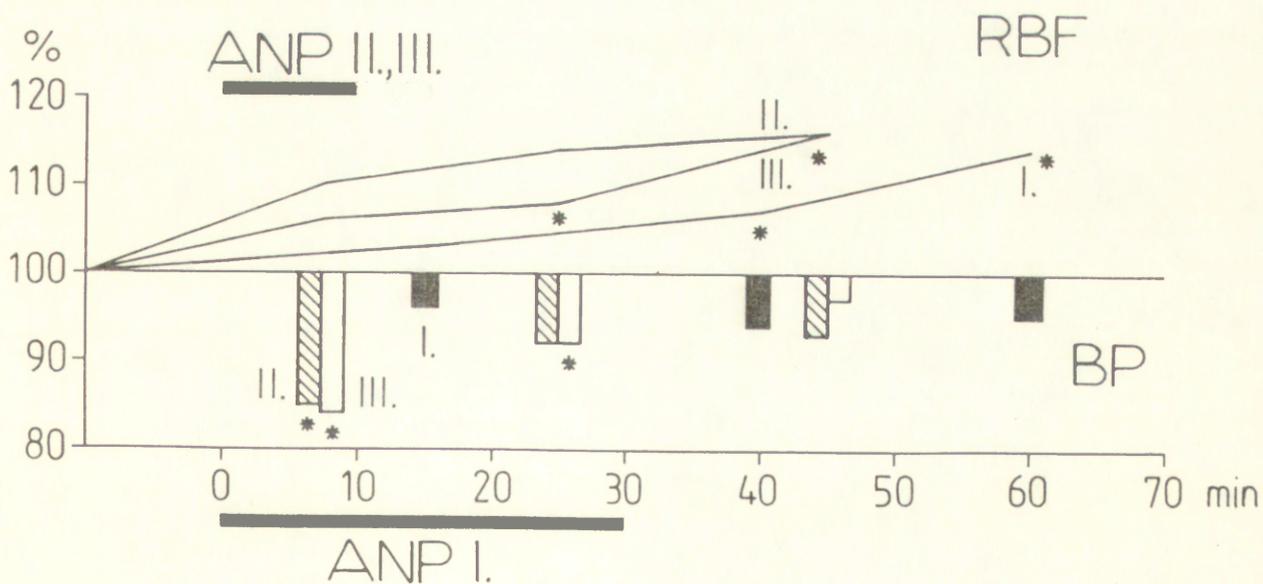
W grupie I /najniższa dawka ANP, czas infuzji 30 min./ wzrost  $U_{Na}V$  był już istotny w ciągu 30 min. od rozpoczęcia infuzji, a w ciągu następnych 20 min. osiągnął wartość maksymalną, wyższą od wartości w okresie kontrolnym o ok. 400%. Natomiast w grupach II i III /wyższe dawki, czas infuzji 10 min./ najwyższy wzrost  $U_{Na}V$  nastąpił już w ciągu 15 min. od rozpoczęcia infuzji /w grupie II o ponad 500%, a w III o ponad 1200%/ /ryc.7/, po czym wartości  $U_{Na}V$  obniżały się stopniowo z upływem czasu, pozostając do końca doświadczenia na poziomie istotnie wyższym od wartości kontrolnych.

W podobny sposób zachowywały się  $V$  i  $U_{osm}V$ , a ich wzrosty osiągnęły bardzo wysoką znamienność statystyczną zarówno w świetle analizy wariancji jak i testu t Studenta. W grupie I wartość maksymalna diurezy była wyższa o ponad 200% od wartości w okresie kontrolnym, a w grupie II i III odpowiednio o ponad 300 i 600% /ryc.7/. W przeciwieństwie do przebiegu zmian  $U_{Na}V$ ,  $V$  i  $U_{osm}V$ , zmiany stężeń / $U_{Na}$  i  $U_{osm}$ / nie przebiegały równoległe. Duże podobieństwo między grupami zaobserwowano w dynamice zmian stężenia sodu w moczu. We wszystkich grupach już w trakcie infuzji ANF zanotowano wzrost  $U_{Na}$ ; najniższy po najmniejszej dawce ANP /w grupie I/. W kolejnym okresie we wszystkich grupach wartość  $U_{Na}$  osiągnęła maksimum, a następnie zanotowano lekkie obniżenie.

Jak widać z tab.2 w grupie I/najniższa dawka ANP/ w ciągu 30 min. infuzji nastąpił nieznaczny spadek osmolalności moczu, który następnie pogłębił się i osiągnął minimum pod koniec doświadczenia. Dynamika zmian  $U_{osm}$



Ryc. 7. Procentowe zmiany wydalania sodu ( $U_{Na} \dot{V}$ ) i diurezy ( $\dot{V}$ ) dla grupy kontrolnej i 3 grup doświadczalnych (I, II, III). Grube linie oznaczają czas infuzji ANP w poszczególnych grupach.



Ryc. 8. Zmiany całkowitego przepływu krwi przez nerkę (%) w grupach doświadczalnych (I, II, III) - górny wykres. Poniżej zaznaczono spadki ciśnienia krwi tętniczej (%). Grube linie oznaczają czas infuzji ANP; gwiazdki - istotność zmian względem okresu kontrolnego.

po średniej i najwyższej dawce ANP /tj. w grupie II i III/ była zupełnie podobna /tab.3 i 4/. Bezpośrednio po podaniu hormonu nastąpił zdecydowany spadek osmolalności /większy w III grupie/, a następnie lekki wzrost. Zmiany te były w obydwu grupach statystycznie znamienne /analiza wariancji/. Należy zauważyć, że stopniowe obniżanie się  $U_{osm}$  obserwowano również w grupie kontrolnej /tab.1/.

Z powyższego omówienia wynika, że wraz ze wzrostem dawki ANP zanotowano wzrost tempa wydalania wody, jonu sodowego oraz łącznie wszystkich substancji osmotycznie czynnych. Wzrost wydalania sodu przebiegał ze wzrostem jego stężenia w moczu.

### 3.2. Charakterystyka hemodynamiki nerek.

W celu scharakteryzowania hemodynamiki nerek mierzono: ciśnienie krwi w tętnicy głównej /BP/, przepływ krwi przez nerkę /RBF/, przepływ osocza przez nerkę /RPF/, frakcję filtracyjną mierzoną jako  $C_{in}/RPF$  /FF/ oraz jako współczynnik ekstrakcji inuliny / $E_{in}$ / a także tempo filtracji kłębuszkowej dwiema metodami: /1/ na podstawie klirensu inuliny / $C_{in}$ / i /2/ na podstawie iloczynu  $RPF E_{in}$ .

W grupie kontrolnej badano BP, RBF, RPF i  $C_{in}$  i nie zanotowano istotnych zmian tych wskaźników w ciągu 80 min. obserwacji.

### 3.2.1. Zmiany ciśnienia krwi po infuzji ANP.

W grupie I /najniższa dawka ANP/ /tab.2/ zaobserwowano pewne obniżenie wartości średnich BP po hormonie, jednak zmiana ta była nieznamienne. W grupie II i III /po wyższych dawkach hormonu/ nastąpił szybki i znamieny spadek ciśnienia o 19 mmHg /tab.3 i 4/; w grupie III obniżenie utrzymywało się jeszcze w trzecim okresie doświadczenia.

Procentowe zmiany ciśnienia dla grup I-III przedstawiono na ryc.8.

### 3.2.2. Zmiany przepływu krwi i osocza przez nerkę.

We wszystkich grupach zanotowano postępujący i znamieny /analiza wariancji/ wzrost przepływu krwi przez nerkę /tab.2-4, ryc.8/. W grupie I /najniższa dawka/ był on najmniejszy, aczkolwiek w dwóch końcowych okresach doświadczenia osiągnął wartości istotne statystycznie, także w analizie za pomocą testu t Studenta / $p < 0,013$ /. W grupie II i III przebieg RBF po infuzji hormonu był zbliżony. W grupie II zaobserwowano nieco większy średni wzrost, ale i większe rozrzuty wyników /tab.3/, natomiast grupa III charakteryzowała się mniejszą zmiennością /niższe SE/ /tab.4/, stąd też pojawienie się istotności zmian także przy rygorystycznej ocenie za pomocą testu Studenta.

Wzrost RBF we wszystkich grupach przebiegał wraz z obniżeniem ciśnienia krwi, choć należy zauważyć, że dla grupy I spadek ciśnienia nie był znamieny statystycznie.

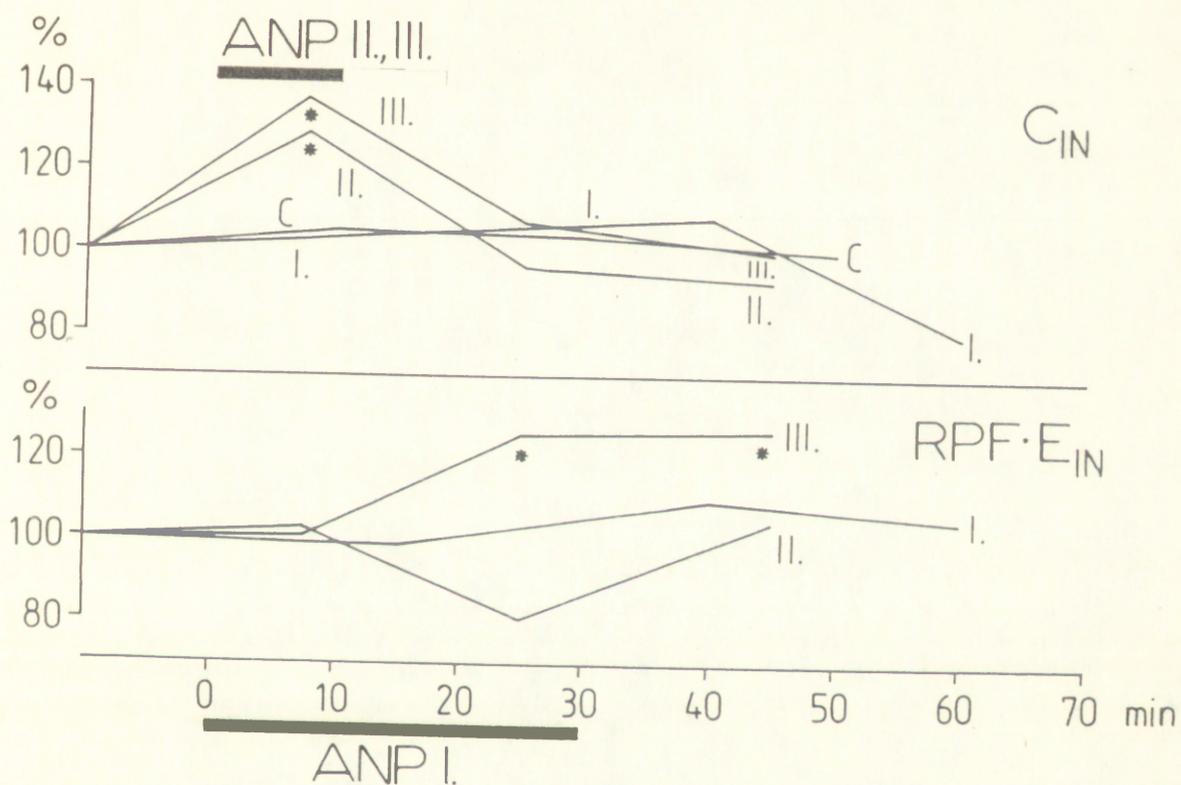
Natomiast nawet przy najniższej dawce ANP można było zaobserwować wyraźne obniżenie oporu naczyniowego nerki, obliczonego jako  $\frac{BP}{RBF}$ , który w kolejnych okresach doświadczalnych wynosił średnio: 18.5, 17.3, 16.3 i 15.4 mmHg·min·ml<sup>-1</sup>.

Wzrost RPF prawie zawsze przebiegał równoległe do zmian RBF i we wszystkich grupach był istotny /analiza wariancji/.

### 3.2.3. Zmiany GFR, $E_{in}$ i FF po infuzji ANP.

Porównując wartości filtracji kłębuszkowej mierzonej dwiema metodami zaobserwowano w grupie I trudną do wytłumaczenia różnicę pomiędzy średnimi wartościami kontrolnymi  $C_{in}$  i  $RPF \cdot E_{in}$ . /tab.2/. Po infuzji hormonu zaobserwowano tendencję do wzrostu  $C_{in}$  a także zagadkowy spadek tego wskaźnika w ostatnim okresie doświadczenia /bez zmian RPF/. To ostatnie znalazło swoje odzwierciedlenie w istotnym obniżeniu się frakcji filtracyjnej mierzonej jako  $\frac{C_{in}}{RPF}$ . W przeciwieństwie do widocznej zmienności  $C_{in}$ , filtracja mierzona jako  $RPF \cdot E_{in}$  charakteryzowała się w tej grupie znaczną stabilnością. Wynika to także z porównania wartości F wyliczonych z analizy wariancji: 1,98 dla  $C_{in}$  i 0,46 dla  $RPF \cdot E_{in}$  /tab.2/. Również wartość frakcji filtracyjnej mierzonej jako  $E_{in}$  nie zmieniała się w czasie doświadczenia.

W grupie II i III /tab.3 i 4/  $C_{in}$  wzrósł istotnie w czasie raptownego wzrostu diurezy po podaniu ANP, a po zakończeniu infuzji obniżył się osiągając plateau utrzymujące się do końca doświadczenia. Równoległe zmiany zaobserwowano we frakcji filtracyjnej  $\frac{C_{in}}{RPF}$ .



Ryc. 9. Zmiany filtracji kłębuszkowej jako  $C_{in}$  i  $RPF \cdot E_{in}$  dla grupy kontrolnej i trzech grup doświadczalnych (I, II, III). Grube linie oznaczają czas trwania infuzji ANP; gwiazdki - istotność zmian względem grupy kontrolnej.

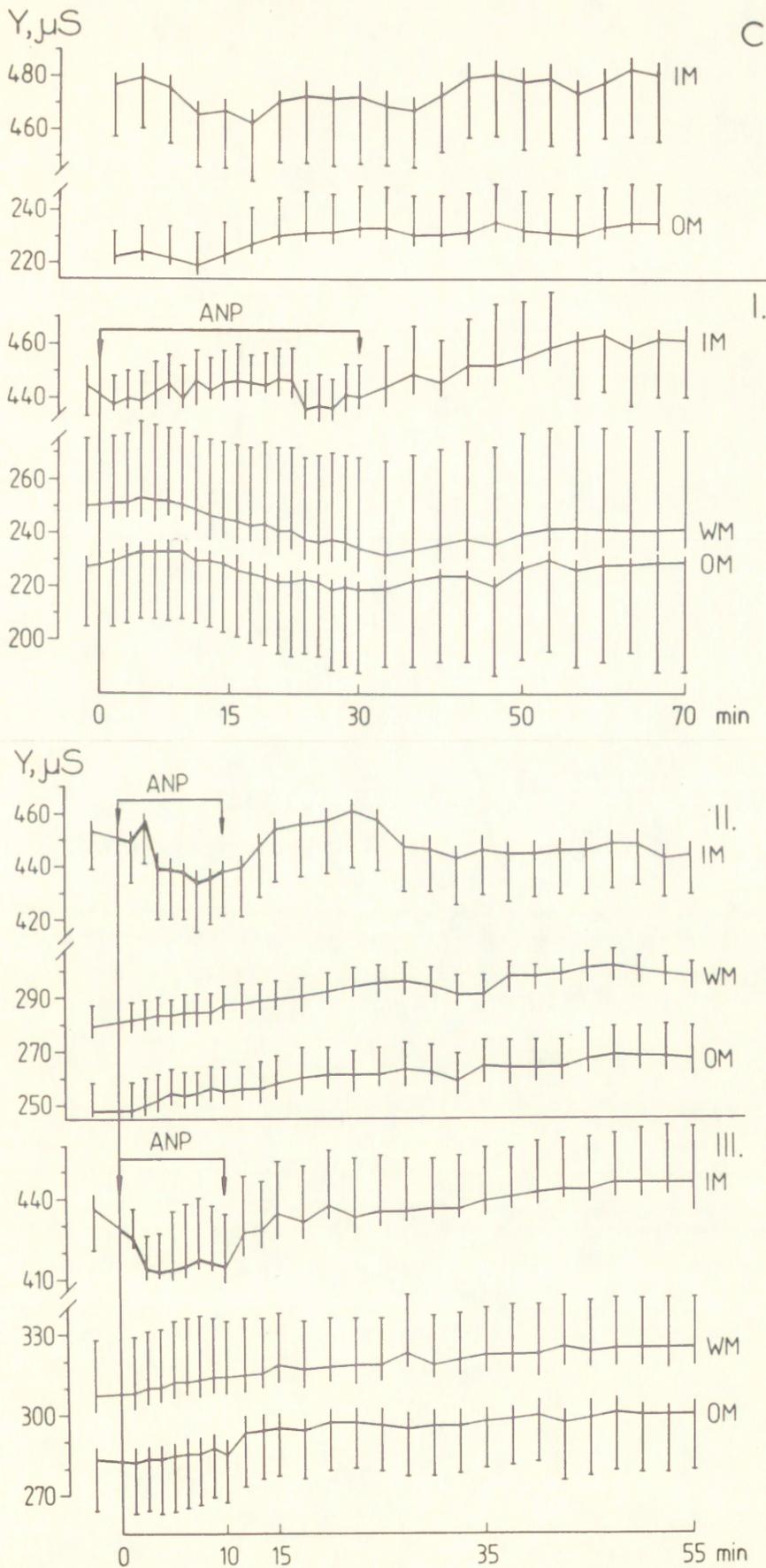
W grupie II nie zanotowano istotnych zmian w filtracji kłębuszkowej mierzonej jako RPF  $E_{in}$ . Jedy- nie w trzecim okresie doświadczenia zanotowano pewne obniżenie powiązane z istotnym spadkiem  $E_{in}$ .

Zmiany klirensu inuliny w grupie III niewiele odbiegały od zmian w grupie II. Znacznie zmienił się natomiast przebieg filtracji mierzonej drugą metodą. Po infuzji ANP zaobserwowano postępujący i znamieny wzrost tego wskaźnika, zwłaszcza w 3. i 4. okresie. /tab.4/. Wzrost ten był równoległy do wzrostu RPF a więc nie wiązał się ze zmianą  $E_{in}$ . Procentowe zmiany filtracji w grupach I-III zilustrowano na ryc.9.

Powyższe dane wskazują, że infuzja ANP spowo- dowała widoczne obniżenie się ciśnienia krwi, zwłaszcza przy wyższych dawkach. Postępujący wzrost RBF obserwowa- no we wszystkich grupach doświadczalnych. Uderzająca by- ła rozbieżność między wartościami tempa filtracji kłę- buszkowej mierzonej dwiema metodami. Po wyższych daw- kach hormonu obserwowano szybki wzrost  $C_{in}$  /równoległy do wzrostu diurezy/ bez zmian RPF  $E_{in}$ . Ten drugi wska- źnik sugerował jednak istotny wzrost filtracji po naj- wyższej dawce ANP i to dopiero w drugiej części doświa- dzenia.

### 3.3. Zmiany admitancji po infuzji ANP.

Admitancję mierzono osobno w rdzeniu zewnętrznym, wewnętrznym i w całym rdzeniu nerkowym /ryc.10/. Znaczny rozrzut wartości Y wokół średnich /dla rdzenia wewnętr- nego błędy standardowe wynosiły ok.4% absolutnych wartości



Ryc. 10. Przebieg admitancji ( $Y, \mu S$ ) w grupie kontrolnej (C) i w grupach doświadczalnych (I, II, III) dla rdzenia wewnętrznego (IM), zewnętrznego (OM) i całego rdzenia (WM). Podano wartości średnie  $\pm SEM$ . Czas infuzji ANP zaznaczono strzałkami. Odcinki oznaczone pogrubioną linią przedstawiają zmiany istotne statystycznie (por. tab. 5).

mierzonych/ był niewątpliwie spowodowany zmiennym umiejscowieniem elektrod w poszczególnych nerkach /por. wyżej: 2. Metody/. Przemawia za tym fakt, że wartości SE, niekiedy dosyć wysokie, na ogół niewiele zmieniały się w czasie doświadczeń. Zastosowana w tej pracy metoda analizy wariancji dla pomiarów powtarzalnych /tab.5/ wyraźnie oddziela zmienność osobniczą od zmienności w czasie. W związku z tym duże różnice między poszczególnymi nerkami nie przeszkadzały w wykazaniu istotnych zmian admitancji po ANP.

W grupie kontrolnej /bez podawania hormonu/ prowadzono rejestrację tylko dla rdzenia zewnętrznego i wewnętrznego. Obserwacja trwała około 70 min. i nie zanotowano zmian istotnych w czasie /analiza wariancji/.

W grupie I /ryc.10/, w której podano najniższą dawkę ANP, nie zanotowano istotnych zmian admitancji w rdzeniu wewnętrznym i zewnętrznym ani też w całym rdzeniu nerkowym. Uderzająco wysoki rozrzut wartości Y obserwowanych w tej grupie dla rdzenia zewnętrznego i całkowitego wynikał z bardzo niskich wartości zarejestrowanych w jednym z doświadczeń.

W grupie II /ryc.10/ zaobserwowano znamienne spadki admitancji w rdzeniu wewnętrznym w czasie infuzji hormonu. Po zakończeniu podawania ANP zanotowano pewien wzrost admitancji /"rebound"/ a następnie lekkie obniżenie. Natomiast przebiegi tego wskaźnika w rdzeniu zewnętrznym i w całym rdzeniu nerkowym były równoległe do siebie i w świetle analizy wariancji obserwowane zmiany nie były istotne.

Bardzo podobnie przedstawiał się przebieg admitancji w grupie III /po najwyższej dawce ANP/ /ryc.10/. Znamienny spadek /nieco głębszy niż w grupie II/ zaobserwowano tylko w rdzeniu wewnętrznym i tylko w okresie infuzji hormonu. Natychmiast po zakończeniu infuzji admitancja zaczęła wzrastać, wykazując znaczne oscylacje w ciągu 15 min. W rdzeniu zewnętrznym i w całym rdzeniu nerkowym nie zanotowano zmian istotnych w czasie.

Z obserwacji tych wynika, że dopiero wyższe dawki hormonu natriuretycznego powodują znamienne, chociaż przejściowe obniżenie admitancji sugerujące spadek stężenia elektrolitów ograniczony do rdzenia wewnętrznego nerki.

#### 4. D Y S K U S J A

##### 4.1. Zmiany czynności wydalniczej nerki.

W przedstawionych tutaj badaniach wykazano, że wzrost wszystkich parametrów charakteryzujących wydalniczą czynność nerki  $/V, U_{Na} V, U_{osm} V/$  zależy od dawki ANP. Należy zwrócić również uwagę, że wzrost wydalania sodu  $/U_{Na} V/$  jest większy od wzrostu wydalania łącznie wszystkich substancji osmotycznie czynnych  $/U_{osm} V/$  i wzrostu diurezy  $/V/$ . Mniejszy wzrost diurezy sugeruje, że hamowanie reabsorpcji wody jest procesem wtórnym w stosunku do hamowania reabsorpcji sodu. Potwierdza to obserwacja, że po infuzji ANP doszło do spadku stężenia wszystkich substancji osmotycznie czynnych w moczu  $/U_{osm}/$  ale do wzrostu stężenia sodu  $/U_{Na}/$ . Tak więc nastąpiło zwiększenie udziału sodu i towarzyszących mu anionów w składzie moczu. Powyższe stwierdzenia sugerują, że hormon działa specyficznie, głównie na zahamowanie reabsorpcji  $Na^+$  i dopiero wtórnie hamuje reabsorpcję wody, co z kolei powoduje znaczne rozcieńczenie innych składników moczu  $/głównie mocznika/$  i spadek  $U_{osm}$ . Wiadomo co prawda, że wzrasta wydalanie  $/hamowana jest reabsorpcja/$  także innych składników przesącza, takich jak fosforany, potas lub wapń <sup>7,65</sup>, jednak ich stężenie w moczu  $/udział w całkowitej jego osmolalności/$  jest niezbyt duże.

##### 4.2. Zmiany hemodynamiczne.

Obszerna literatura opisująca zmiany czynności nerek po ANP podkreśla liczne wątpliwości dotyczące charakteru zależności między zmianami wydalania i hemodynamiki.

Współistnienie zmian hemodynamicznych i wydalniczych zostało bardzo dobrze udokumentowane, jednak duża złożoność obserwowanych zmian utrudnia uchwycenie ewentualnych związków przyczynowych.

#### 4.2.1. Ciśnienie tętnicze.

Pierwotne przyczyny spadku ciśnienia tętniczego po ANP nie są jeszcze w pełni poznane. Przeglądu często sprzecznych doniesień dokonali Winqvist i Kirchheim<sup>53,100</sup>. Sugeruje się, że przy niskich, fizjologicznych dawkach hormonu obniża się objętość minutowa serca a przy wyższych dochodzi do rozszerzenia naczyń obwodowych i spadku obwodowego oporu naczyniowego. Brak jest danych, które mogłyby rozstrzygnąć czy spadek ciśnienia krwi obserwowany po ANP w przedstawionych tu doświadczeniach zależał od zmniejszenia objętości minutowej serca czy od zmniejszenia obwodowego oporu naczyniowego. Jednak obserwowany tutaj spadek oporów naczyniowych nerki /patrz niżej/ sugeruje rozszerzenie również innych naczyń oporowych a więc dominację mechanizmu obwodowego. Z drugiej strony to obserwowane rozszerzenie naczyń nerkowych można także interpretować jako autoregulacyjną reakcję nerki na spadek ciśnienia tętniczego. W takim przypadku obniżenie oporu naczyniowego nerki byłoby następstwem a nie częściową przyczyną spadku ciśnienia tętniczego.

#### 4.2.2. Przepływ krwi przez nerkę.

W badaniach wpływu ANP na hemodynamikę nerki szczura cytowanych w literaturze posługiwano się z reguły<sup>x</sup> klirenssem

kwasu p-amino-hipurowego  $/C_{PAH}/$  jako miarą przepływu osocza przez nerkę  $/RPF/$ , a więc mierzono, ściśle rzecz biorąc, tzw. efektywny przepływ osocza  $/ERPF/^{xx}$ .

Wskaźnik ten jest mało miarodajny co najmniej z dwóch powodów:

- 1/  $C_{PAH}$  wykazuje zawyżone wartości w czasie szybkiego wzrostu diurezy /artefakt ten przedyskutowano dokładniej dla  $C_{in}$ , patrz niżej/.
- 2/ Jego wartość opiera się na założeniu, że współczynnik ekstrakcji PAH  $/E_{PAH}/$  jest bardzo wysoki /dla szczura wynosi 0,80/ a przede wszystkim nie zmienia się pod wpływem stosowanych bodźców /np. ANP/.

Jednak żadna z grup badawczych nie oznaczała  $E_{PAH}$ , najprawdopodobniej ze względu na duże trudności w uzyskiwaniu próbek krwi żyłnej nerkowej u szczura.

W zastosowanym w tej pracy układzie doświadczalnym mierzono przepływ krwi przez nerkę szczura w sposób bezpośredni, unikając przez to wątpliwości obciążających pomiary pośrednie.

---

<sup>x</sup> Z jednym wyjątkiem: w pracy <sup>71</sup> u kilku szczurów zmierzono RBF za pomocą przepływomierza elektromagnetycznego.

$$^{xx} ERPF = C_{PAH} = \frac{U_{PAH}}{A_{PAH}} \cdot V ; \quad RPF = \frac{C_{PAH}}{E_{PAH}} ; \quad E_{PAH} = \frac{A_{PAH} - RV_{PAH}}{A_{PAH}} ;$$

$U_{PAH}$ ,  $A_{PAH}$  i  $RV_{PAH}$  oznaczają odpowiednio stężenia PAH w moczu, krwi tętniczej i żyłnej nerkowej.

Już przy najniższej dawce hormonu zaobserwowano wzrost przepływu krwi przez nerkę /RBF/ oraz wyraźną tendencję /mimo braku znamienności/ do spadku ciśnienia. Łącznie te dwie zmiany należy interpretować jako wyraz obniżenia się oporu naczyniowego nerki. Przy wyższych dawkach obserwowano jednocześnie wyraźny wzrost przepływu krwi przez nerkę oraz istotny spadek ciśnienia tętniczego, co wskazywało na bardzo znaczne zmniejszenie oporu w obrębie naczyń nerkowych.

Warto rozważyć ewentualne powiązanie zmian RBF i wydalania sodu po ANP. Przepływ krwi wzrastał progresywnie w ciągu całego doświadczenia we wszystkich 3 grupach doświadczalnych. Natomiast wydalanie sodu w grupie I /najniższa dawka/, wyraźnie obniżyło się w ostatnim okresie a w grupach II i III już w przedostatnim. Tak więc porównanie dynamiki zmian  $U_{Na}V$  i RBF nie przemawia za wzajemnym powiązaniem. Obserwowany tu wzrost całkowitego przepływu sugeruje, że zwiększył się także przepływ przez naczynie proste rdzenia.

Autorzy, którzy mierzyli zmiany przepływu krwi przez odsłoniętą brodawkę nerki szczura po ANP również nie zanotowali wyraźnego związku między tym przepływem a wydalaniem sodu <sup>5.52</sup>. Zarówno własne dane dotyczące całkowitego przepływu krwi przez nerkę jak i pomiary przepływu krwi przez naczynie rdzenia i brodawki nie potwierdzają więc poglądu o istotnej roli wypłukiwania substancji osmotycznie czynnych rdzenia /zjawisko wash-out/ w mechanizmie wzrostu wydalania sodu po ANP. Również przebieg zmian admitancji nie przemawia za istotną rolą tego zjawiska /patrz niżej/.

#### 4.2.3. Filtracja kłębuszkowa.

Problemy z ustaleniem roli zmian filtracji kłębuszkowej w mechanizmie natriurezy po ANP w dużej części są uwarunkowane trudnościami metodycznymi w precyzyjnym mierzeniu GFR. Powszechnie stosowaną metodą pomiaru jest oznaczanie klirensu inuliny  $/C_{in}/$ . Błąd oznaczenia filtracji na podstawie  $C_{in}$  może sięgać ok. 10%. Tak więc, jeżeli po ANP stwierdza się brak zmian filtracji kłębuszkowej, to nie ma jeszcze pewności, że się ona w istocie nie zmieniała. Pewniejsze byłoby wnioskowanie o przyczynach wzrostu wydalania przy zmianie filtracji w przeciwnym kierunku /tzn. jej obniżeniu/.

Wszystkie pomiary klirensowe  $/C_{in}, C_{PAH}/$  są metodami rzetelnymi tylko w warunkach czynnościowego stanu równowagi /steady state/, a zwłaszcza w warunkach względnie stałej diurezy minutowej. W sytuacji szybkiego wzrostu diurezy, jak to ma miejsce po ANP, dochodzi do zafałszowania pomiaru ze względu na znaczną objętość moczu zalegającą w tzw. przestrzeni martwej tj. w miedniczce nerkowej i cewniku służącym do zbiórki moczu.

Założmy, że w sytuacji wyjściowej /np. w tzw. okresie kontrolnym/ nerka wydalą w jednostce czasu małą objętość moczu o wysokim stężeniu inuliny. W momencie, w którym następuje szybki i znaczny wzrost diurezy /np. po ANP/, dochodzi również do znacznego obniżenia się stężenia inuliny w moczu dopływającym do przestrzeni martwej. Powoduje to wypchnięcie z tej przestrzeni znacznej objętości moczu o dużo wyższym stężeniu inuliny, pochodzącego z okresu kontrolnego. Mocz ten wejdzie w skład objętości

zebranej w okresie po ANP, czego następstwem będzie istotne podwyższenie stężenia inuliny w tej próbce i, co za tym idzie, znaczne podwyższenie klirensu inuliny w tym okresie /artefakt/.

Wymienione zastrzeżenia do techniki klirensowej przypomniano ostatnio w publikacji przeglądowej <sup>61</sup>. Jednak wielu autorów badań nad ANP nie uwzględniło tych zastrzeżeń w interpretacji zmian GFR mierzonych jako  $C_{in}$ . Biorąc pod uwagę zastrzeżenia metodyczne w oznaczaniu filtracji kłębuszkowej, w przedstawionych tutaj badaniach zastosowano równolegle dwie metody jej oznaczania: konwencjonalną, czyli klirens inuliny i rzadziej stosowaną metodę opartą na pomiarze współczynnika ekstrakcji inuliny przez nerkę  $E_{in}$ .

Należy zauważyć, że ilość inuliny wydalanej przez nerkę w jednostce czasu  $U_{in}V$  równa się różnicy między ilością inuliny dopływającą do nerki  $RPF \cdot A_{in}$  i ilością wypływającą z nerki żyłą nerkową  $RPF \cdot RV_{in}$ :

$$RPF \cdot A_{in} - RPF \cdot RV_{in} = U_{in}V \quad /1/$$

lub

$$RPF /A_{in} - RV_{in}/ = U_{in}V \quad /2/$$

Po podzieleniu obydwu stron przez  $A_{in}$  otrzymujemy

$$\frac{RPF /A_{in} - RV_{in}/}{A_{in}} = \frac{U_{in}V}{A_{in}} \quad /3/$$

Ponieważ  $\frac{A_{in} - RV_{in}}{A_{in}} = E_{in}$ , równy tzw. frakcji filtracyjnej,

a  $\frac{U_{in}V}{A_{in}} = C_{in} = GFR$ , równanie /3/ można zapisać jako

$$GFR = RPF \cdot E_{in} \quad /4/$$

W tej pracy równoległe mierzono GFR dwiema metodami: jako  $C_{in}$  i jako RPF  $E_{in}$ . Jest rzeczą oczywistą, że ta druga metoda nie opiera się na pomiarach objętości moczu i stężenia w nim inuliny, a więc nie jest obciążona błędami wynikającymi z istnienia przestrzeni martwej. Inni autorzy badający wpływ ANP na filtrację kłębuszkową u szczura nie wykorzystywali możliwości oznaczenia RPF  $E_{in}$  zapewne ze względu na trudności z uzyskiwaniem próbek krwi żyłnej nerkowej u tego gatunku a także trudności z precyzyjnym określaniem różnicy tętniczo-żyłnej  $/A_{in} - RV_{in}/$  w stężeniu inuliny. Ta ostatnia trudność polega na tym, że po nakłuciu żyły nerkowej aspiruje się często nie tylko krew żylną nerkową ale także krew z żyły głównej dolnej charakteryzującą się znacznie wyższym stężeniem inuliny. W niedawnej próbie oznaczania  $E_{in}$  u szczura grupa autorów zmuszona była uciec się do mało uzasadnionego zabiegu odrzucania wartości  $E_{in}$  niższych niż 20%, w przekonaniu, że były one wynikiem kontaminacji krwi żyłnej nerkowej krwią z żyły głównej <sup>19</sup>.

W zastosowanym w tej pracy modelu doświadczalnym /ze sztucznym połączeniem żyła nerkowa - żyła szyjna/ podwiązuje się żyłę nerkową od strony jej ujścia do ż. głównej; nie ma więc niebezpieczeństwa kontaminacji. Próbkę krwi żyłnej nerkowej uzyskuje się bez trudności w dowolnym punkcie doświadczenia.

Przy najniższej dawce ANP nie zanotowano istotnych zmian ani w  $C_{in}$  ani w RPF  $E_{in}$ . Mimo wyraźnego wzrostu diurezy nie stwierdzono wzrostu  $C_{in}$  jaki mógłby nastąpić w związku z istnieniem miedniczkowej przestrzeni martwej. Należy sądzić, że wzrost diurezy nie był aż tak znaczny i raptowny /rozłożył się jakby na dwa okresy doświadczalne/,

aby ujawnił się opisywany wyżej artefakt.

Przy średniej i najwyższej dawce ANP bezpośrednio po podaniu peptydu  $C_{in}$  i  $RPF \cdot E_{in}$  zachowywały się różnie: pierwszy wskaźnik wykazywał znamieny statystycznie wzrost, podczas gdy drugi nie zmieniał się. W świetle tego co omówiono wyżej nie ulega wątpliwości, że wzrost  $C_{in}$  miał charakter artefaktu, związanego z ra-  
ptownym i bardzo znacznym wzrostem diurezy. Dodatkowego komentarza wymaga obserwacja opóźnionego umiarkowanego, ale znamienego wzrostu  $RPF \cdot E_{in}$  po najwyższej dawce ANP. Można sądzić, że w późniejszym okresie doświadczenia przy braku stanu równowagi w zakresie diurezy  $RPF \cdot E_{in}$  był w dalszym ciągu bardziej miarodajnym wskaźnikiem filtracji niż  $C_{in}$ . Warto zauważyć, że ten późny wzrost GFR przebiegał równoległe ze spadkiem diurezy i wydalania sodu.

Reasumując, bezpośrednio po wstrzyknięciu peptydu zaobserwowano wzrost  $V$  i  $U_{Na} V$  bez wzrostu filtracji, a po zakończeniu infuzji hormonu przy najwyższej jego dawce stwierdzono wzrost GFR podczas spadku diurezy. Łącznie dane wszystkich grup doświadczalnych wskazują, że znaczny wzrost wydalania sodu po ANP występuje także bez wzrostu filtracji kłębuszkowej.

Fakt, że tak wielu badaczy obserwowało wzrost filtracji kłębuszkowej w następstwie podawania ANP, tłumaczy się niewłaściwością stosowania  $C_{in}$  jako jej miernika.

Należy także podkreślić, że wzrost filtracji nie musi w sposób oczywisty i niezmienny prowadzić do wzrostu wydalania sodu, ponieważ zwiększenie jego przesączonego ładunku może zostać w całości skompensowane przez reabsorb-  
cję kanalikową. Tak np. w jednym z badań sprzed 20 laty wykazano, że do znacznego wzrostu  $U_{Na} V$  dochodzi gdy fil-

trację zwiększa się poprzez zwiększenie objętości płynu pozakomórkowego, podczas gdy wydalanie sodu prawie nie zmienia się w następstwie wzrostu GFR wywołanego infuzją glukokortykoidów, dopaminy lub aminokwasów<sup>56</sup>. Wydaje się, że wzrost GFR po ANP może nastąpić po bardzo wysokich, farmakologicznych dawkach, a więc nie ma znaczenia fizjologicznego. W jednej z najnowszych prac ustalono, że tempo infuzji "progowej" już wywołującej wzrost wydalania sodu wynosiło u szczura ok. 0,015  $\mu\text{g}/\text{kg min.}$ , co powoduje podwojenie się stężenia ANP w osoczu względem wartości kontrolnej<sup>85</sup>. Przy ponad 20-krotnie większym tempie infuzji /grupa doświadczalna I w tej pracy/ nie zarejestrowano wzrostu filtracji. Tym bardziej nie dochodzi do wzrostu GFR po wspomnianej wyżej infuzji "progowej" ANP<sup>85</sup>, prowadzącej do podwyższenia stężenia peptydu w osoczu jakie mogłoby wystąpić w warunkach fizjologicznych a tym bardziej w stanach patologicznych. Wynika z tego jednoznacznie, że zmiany filtracji nie pośredniczą w mechanizmie regulacji wydalania sodu i wody przez przedsionkowy peptyd natriuretyczny.

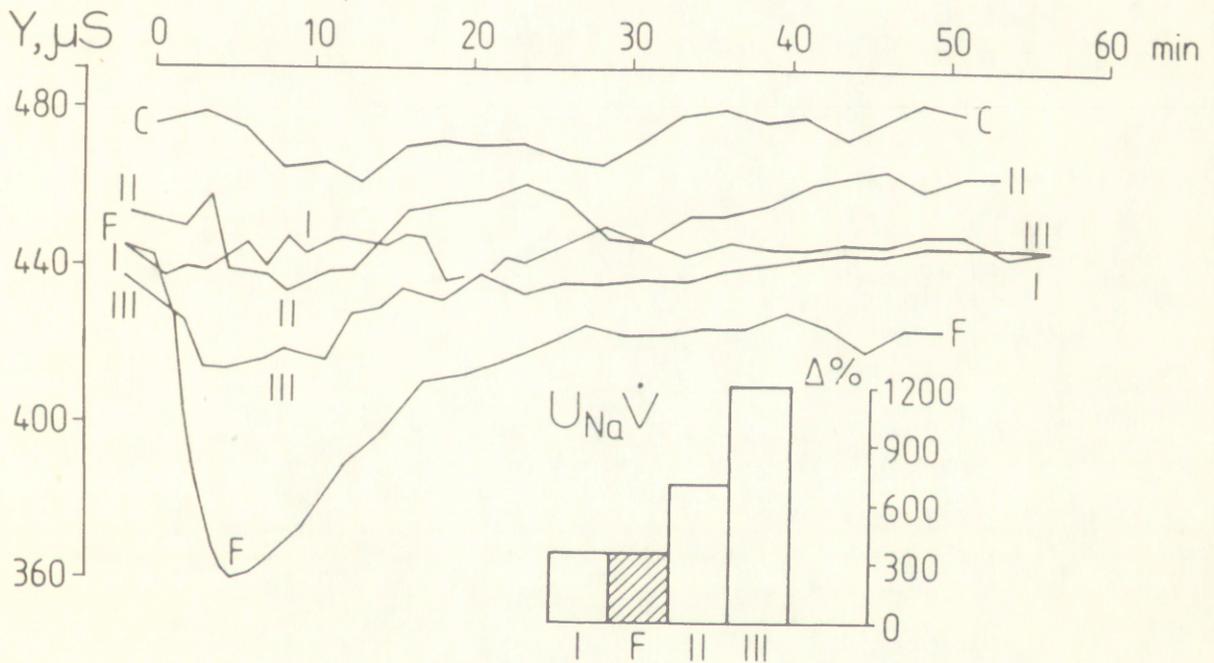
#### 4.3. Zmiany stężenia elektrolitów w rdzeniu nerki /pomiary admitancji/.

Wcześniejsze badania z tej pracowni wykazały, że admitancja elektryczna /Y/ jest miarą całkowitego stężenia elektrolitów w śródmiaższu rdzenia nerki /wzrost admitancji wskazuje na wzrost stężenia elektrolitów i odwrotnie/<sup>72,75,77,79</sup>.

W przedstawionych tutaj badaniach prowadzono pomiary admitancji we wszystkich grupach doświadczalnych, mierząc ją w sposób ciągły w rdzeniu wewnętrznym, zewnętrznym oraz łącznie w całym rdzeniu nerkowym. Po najniższej dawce ANP nie zaobserwowano żadnych zmian admitancji. Przy średniej i najwyższej dawce hormonu zanotowano szybki i przejściowy spadek admitancji, głębszy po większej dawce. Zmiany te ograniczały się tylko do rdzenia wewnętrznego i mimo iż niezbyt duże wykazywały znamienność statystyczną.

Na ryc.11 przedstawiono porównanie zmian wydalania sodu i odpowiadających im zmian admitancji po różnych dawkach ANP i po klasycznym diuretyku pętlowym - furosemidzie. Największą zmianę admitancji zaobserwowano właśnie po furosemidzie, chociaż podawano go w niskiej dawce powodującej wzrost wydalania  $\text{Na}^+$  porównywalny do wzrostu wywołanego przez najniższą dawkę ANP tj. taką po której nie zanotowano zmian admitancji. Po średnich i najwyższych dawkach hormonu, powodujących bardzo znaczny wzrost  $U_{\text{Na}} V$  zaobserwowano dużo mniejszy spadek admitancji niż po furosemidzie.

Z wcześniejszych badań wynika, że spadek admitancji zależy od tego, w którym odcinku kanalika nerkowego występuje zahamowanie reabsorpcji. Tak np. własne wcześniejsze dane wskazują, że wyraźny spadek  $Y$  występuje po furosemidzie /zahamowanie reabsorpcji w pętli Henlego/ natomiast przy takim samym wzroście  $U_{\text{Na}} V$  nie zaobserwowano spadku admitancji po zahamowaniu reabsorpcji w kanalikule proksymalnym /po podaniu acetazolamidu/.



Ryc. 11. Porównanie zmian admitancji ( $Y$ ,  $\mu\text{S}$ ) w rdzeniu wewnętrznym nerki w grupie kontrolnej (C) oraz po różnych dawkach ANP (grupy I, II, III) i po furosemidzie (F). Słupki przedstawiają procentowy wzrost ( $\Delta\%$ ) wydalania sodu ( $U_{\text{Na}} \dot{V}$ ) w tych samych grupach doświadczalnych.

/Bądzyska B. i wsp.: Tissue electrical admittance (electrolyte concentration) in rat renal medulla: effects of furosemide and acetazolamide. Arch. Internat. Physiol. Bioch., w druku/. Podobnie nie zaobserwowano zmian admittancji po chlorotiazydzie /zablokowanie reabsorpcji w odcinku kanalik dystalnym względem wstępującego ramienia pętli Henlego/<sup>76</sup>, natomiast obserwuje się wyraźny jej spadek po kwasie etakrynowym, typowym diuretyku pętlowym o zupełnie innej budowie niż furosemid /L. Dobrowolski i wsp., dane niepublikowane/.

Na podstawie powyższych danych można stwierdzić, że wpływ ANP na admittancję elektryczną rdzenia nerki, a więc na stężenie elektrolitów w tym obszarze nie jest porównywalny z wpływem diuretyków pętlowych.

Obserwowany po ANP spadek admittancji w obrębie rdzenia wewnętrznego był niewielki, mimo iż przebiegał z bardzo znacznym wzrostem wydalania sodu. Również badania na skrawkach nie wykazały spadku stężenia  $\text{Na}^+$  w rdzeniu wewnętrznym, a jedynie w brodawce nerkowej<sup>41</sup>.

Podsumowując, obecnie uzyskane dane wskazują, że działanie natriuretyczne ANP nie jest wynikiem zahamowania reabsorpcji  $\text{NaCl}$  we wstępującym ramieniu pętli Henlego.

Powstaje pytanie, w jaki sposób obserwowane zmiany admittancji rzutują na hipotezę przypisującą wzrost  $U_{\text{Na}}^V$  po ANP pierwotnemu wzrostowi ukrwienia rdzenia i wypłukaniu przez krew substancji osmotycznie czynnych ze śródmiąższu /wash-out/. Wnioskowanie jest tu o tyle trudne, że spadek osmolalności płynu śródmiąższowego w rdzeniu może towarzyszyć każdemu znacznemu wzrostowi diurezy,

w następstwie utrudnienia biernej reabsorpcji mocznika w końcowym odcinku kanalika zbiorczego <sup>2,59</sup>.

Niewielki spadek Y po ANP mógłby być równie dobrze następstwem wzrostu przepływu krwi przez naczynia rdzenia jak i zwiększonego przepływu moczu przez końcowy odcinek kanalika zbiorczego i na podstawie uzyskanych danych nie można wyrokować, który z tych mechanizmów jest odpowiedzialny za spadek stężenia soli w rdzeniu, a więc ewentualnie odgrywa rolę we wzroście wydalania sodu przez nerki.

Z przytoczonych powyżej i diskutowanych danych z literatury oraz z wyników badań własnych stanowiących drobny fragment zakrojonego na szeroką skalę wysiłku wielu badaczy wyłania się obraz działania ANP na wydalanie nerkowe zawierający liczne luki i wątpliwości. Nowsze badania wskazują, że zmiany wydalania soli i wody przez nerki zależne od peptydu przedsionkowego dokonują się bez istotnego udziału zmian filtracji kłębuszkowej. Nie udało się przedstawić dowodów na to, że wzrost diurezy i wydalanie sodu po ANP jest następstwem wybiórczego wzrostu przepływu krwi przez rdzeń nerkowy i wypłukania z niego substancji osmotycznie czynnych. Jest rzeczą pewną, że peptyd hamuje reabsorpcję NaCl w końcowych odcinkach kanalików zbiorczych. Nie może to być jednak jedyny punkt uchwytu ANP, ponieważ obserwowany bardzo znaczny wzrost wydalania sodu nie da się wytłumaczyć nawet całkowitym zahamowaniem reabsorpcji w tym odcinku. Nie można też wykluczyć, że ogromny potencjał natriuretyczny peptydu jest związany z uruchamianiem nieznanych dotychczas mechanizmów wewnątrznerkowych.

P O D S U M O W A N I E I W N I O S K I.

1. Wyniki badań potwierdzają wybitne natriuretyczne działanie ANP nasilające się ze wzrostem dawki. Wzrostowi wydalania sodu towarzyszy wtórny, nieco mniejszy wzrost diurezy.
2. Bezpośredni pomiar przepływu krwi przez nerkę wykazał wzrost jej ukrwienia po ANP. Brak równoległości w przebiegu zmian przepływu i wydalania sodu przemawia przeciwko ich przyczynowemu powiązaniu.
3. Wykazano, że znaczny wzrost wydalania sodu po ANP występuje bez wzrostu filtracji kłębuszkowej. Jednoczesne mierzenie filtracji jako  $C_{in}$  i  $RPF \cdot E_{in}$  ujawniło, że tylko ten drugi wskaźnik jest rzetelną miarą jej zmian po ANP. Stosowanie  $C_{in}$  prowadziło w przeszłości do błędnej oceny roli zmian filtracji kłębuszkowej w mechanizmie natriurezy.
4. Mimo znacznych rozmiarów natriurezy po ANP, porównywalnej tylko z efektem natriuretycznym tzw. diuretyków pętlowych, dostarczono danych /pomiaru admitancji elektrycznej tkanki/ przemawiających przeciwko lokalizacji działania peptydu w pętli Henlego.

P I Ś M I E N N I C T W O

1. Appel RG, Dunn MJ: Renal sites of action for atrial natriuretic factor. *Trans Assoc Am Phys* 98: 85-91, 1985.
2. Atherton JC: Lability of renal papillary tissue composition in the rat. *J Physiol* 274: 323-328, 1978.
3. Baum M, Toto RD: Lack of a direct effect of atrial natriuretic factor in the rabbit proximal tubule. *Am J Physiol* 250: F66-F69, 1986.
4. Blaine EH: Role of atriopeptin in blood pressure regulation. *Am J Med Sci* 31: 293-298, 1988.
5. Borenstein HB, Cupples WA, Sonnenberg H, Veress AT: The effect of a natriuretic atrial extract on renal haemodynamics and urinary excretion in anaesthetized rats. *J Physiol* 334: 133-140, 1983.
6. Bourgoignie JJ: Natriuretic hormones: comparison of renal effects. *Klin Wochenschr* 65 (Suppl 8): 14-20, 1987.
7. Bourgoignie JJ, Gavellas G, Hwang KH: Renal effects of atrial natriuretic factor in primate. *Am J Physiol* 251: F1049-F1054, 1986.
8. Brier ME, Brier RA, Luft FC, Aronoff GR: Kinetics and pharmacodynamics of atrial natriuretic peptide and lithium clearance in the isolated perfused rat kidney. *J Pharmacol Exper Therap* 243: 868-873, 1987.
9. Briggs JP, Steipe B, Schubert G, Schnermann J: Micropuncture studies of the renal effects of atrial natriuretic substance. *Pflugers Arch* 395: 271-276, 1982.
10. Burnett JC, Granger JP, Opgenorth TJ: Effects of synthetic atrial natriuretic factor on renal function and renin release. *Am J Physiol* 247: F863-F866, 1984.
  
11. Burnett JC, Opgenorth TJ, Granger JP: The renal action of atrial natriuretic peptide during control of glomerular filtration. *Kidney Internat* 30: 16-19, 1986.
12. Camargo MJF, Atlas SA, Maack T: Role of increased glomerular filtration rate in atrial natriuretic factor - induced natriuresis in the rat. *Life Sci* 38: 2397-2404, 1986.
13. Christensen S, Steiness E, Christensen H: Tubular sites of furosemide natriuresis in volume replaced and volume depleted conscious rats. *J Pharmacol Exptl Therap* 239: 211-218, 1986.
14. Cogan MG: Atrial natriuretic factor can increase renal solute excretion primarily by raising glomerular filtration. *Am J Physiol* 250: F710-F714, 1986.
15. Cris-cione L, Burdet R, Hänni H, Kaulber B, Truog A, Hofbauer KG: Systemic and regional hemodynamic effects of atriopeptin II in anesthetized rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 9: 135-141, 1987.
16. Currie MG, Geller DM,

Cole BR et al: Bioactive cardiac substances: potent vasorelaxant activity in mammalian atria. *Science* 221: 71-73, 1983. 17. Davis CL, Briggs JP: Effect of reduction in renal artery pressure on atrial natriuretic peptide - induced natriuresis. *Am J Physiol* 252: F146-F153, 1987. 18. Davis CL, Briggs JP: Effect of atrial natriuretic peptides on renal medullary solute gradients. *Am J Physiol* 253: F679-F684, 1987. 19. Davis JM, Haberle DA, Kawata T: The control of glomerular filtration rate and renal blood flow in chronically volume - expanded rats. *J Physiol* 402: 473-495, 1988. 20. De Bold AJ: On the shoulders of giants: the discovery of atrial natriuretic factor. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 2007-2012, 1987.

21. De Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H: A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 28: 89-94, 1981. 22. Dunn BR, Ichikawa I, Pfeffer JM, Troy JL, Brenner BM: Renal and systemic hemodynamic effects of synthetic atrial natriuretic peptide in the anesthetized rat. *Circ Res* 59: 237-246, 1986. 23. Emmeluth C, Eiken P, Johannessen AC, Bie P: Effects of atrial natriuretic peptides and furosemide in conscious dogs. *Proc Soc Exper Biol Med* 186: 103-112, 1987. 24. Epstein FH: Atriopeptin: a cardiac hormone intimately involved in fluid, electrolyte and blood-pressure homeostasis. *New Engl J Med* 314: 828-834, 1986. 25. Firth JD, Raine AEG, Ledingham JGG: Low concentration of ANP cause pressure-dependent natriuresis in the isolated kidney. *Am J Physiol* 255: F391-F396, 1988. 26. Flynn TG: The elucidation of the structure of atrial natriuretic factor, a new peptide hormone. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 2013-2020, 1987. 27. Flynn TG, De Bold ML, De Bold AJ: The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem Biophys Res Commun* 117: 859-865, 1983. 28. Forssmann WG, Birr C, Carlquist M, Christmann M, Finke R, Henschen A, Hock D, Kirchheim H, Kreye V, Lottspeich F, Metz J, Mutt V, Reinecke M: The auricular myocardocytes of the heart constitute an endocrine organ. *Cell Tissue Res* 238: 425-430, 1984. 29. Fried TA, McCoy RN, Osgood RW, Stein JH: Effect of atriopeptin II on determinants of glomerular filtration rate in the in vitro perfused dog glomerulus. *Am J Physiol* 250: F1119-F1122, 1986. 30. Fried TA, Osgood RW, Stein JH: Tubular site(s) of action of atrial natriuretic peptide in the rat. *Am J Physiol* 255: F313-F316, 1988.

31. Fujioka S, Tamaki T, Fukui K, Okahara T, Abe Y: Effects of a synthetic human atrial natriuretic polypeptide on regional blood flow in rats. *Eur J Pharmacol* 109: 301-304, 1985. 32. Gaillard CA, Koomans HA, Rabelink AJ, Mees EJD: Effects of indomethacin on renal response to atrial natriuretic peptide. *Am J Physiol* 253: F868-F873, 1987. 33. Goetz KL: Atrial receptors, natriuretic peptides and the kidney - current understanding. *Mayo Clin Proc* 61: 600-603, 1986. 34. Goetz KL: Physiology and pathophysiology of atrial peptides. *Am J Physiol* 254: E1-E15, 1988. 35. Hansell P, Fasching A, Sjöquist M, Anden NE, Ulfendahl HR: The dopamine receptor antagonist haloperidol blocks natriuretic but not hypotensive effects of the atrial natriuretic factor. *Acta Physiol Scand* 130: 401-408, 1987. 36. Hansell P, Michaelsson K, Ulfendahl HR: Renal effects of atriopeptin II and dopamine receptor blockade in acutely volume-expanded rats. *Acta Physiol Scand* 133: 35-40, 1988. 37. Hansell P, Ulfendahl HR: Atriopeptins and renal cortical and papillary blood flow. *Acta Physiol Scand* 127: 349-357, 1986. 38. Hansell P, Ulfendahl HR: The influence of atriopeptins I and II on the relationship between glomerular filtration and natriuresis. *Acta Physiol Scand* 129: 361-369, 1987. 39. Hansell P, Ulfendahl HR: Effects of atrial natriuretic peptide (ANP) during converting enzyme inhibition. *Acta Physiol Scand* 130: 393-400, 1987. 40. Harris PJ, Skinner SL, Zhuo J: The effects of atrial natriuretic peptide and glucagon on proximal glomerulo-tubular balance in anaesthetized rats. *J Physiol (Lond)* 402: 29-42, 1988.
41. Healy DP, Fanestil D: Localization of atrial natriuretic peptide binding sites within the rat kidney. *Am J Physiol* 250: F573-F578, 1986. 42. Henry JH, Gauer OH, Reeves JL: Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Circ Res* 4: 85-90, 1956. 43. Hildebrandt DA, Banks RO: Effects of atrial natriuretic factor on renal function in rats with papillary necrosis. *Am J Physiol* 252: F977-F980, 1987. 44. Hirata Y, Ishii M, Sugimoto T, Matsuoka H, Kangawa K, Matsuo H: The effects of human atrial 28-amino acid peptide on systemic and renal hemodynamics in anesthetized rats. *Circ Res* 57: 634-639, 1985. 45. Hoffman A, Burnett JC Jr, Haramati A, Winaver J: Effects of atrial natriuretic factor in rats with experimental high-output heart failure. *Kidney Internat* 33: 656-661, 1988. 46. Huang GL, Lewicki J, Johnson LK, Cogan MG: Renal mechanism of action of rat atrial natriuretic factor. *J Clin Invest* 75: 769-773, 1985. 47. Itabashi A, Chan L, Shapiro JJ, Cheung C, Schrier RW: Comparison of the natriuretic response to atriopeptin III and loop diuretic in the isolated perfused rat kidney. *Clin Sci* 73: 143-150, 1987. 48. Jamieson JD,

- Palade GE: Specific granules in atrial muscle cells. *J Cell Biol* 23: 151-172, 1964. 49. Jamison RL, Sonnenberg H, Stein JH: Questions and replies: role of the collecting tubule in fluid, sodium and potassium balance. *Am J Physiol* 237: F247-F261, 1979. 50. Kaugawa K, Matsuo H: Purification and complete amino acid sequence of  $\alpha$ -human atrial natriuretic polypeptide ( $\alpha$ -hANP). *Biochem Biophys Res Commun* 118: 131-139, 1984.
51. Keeler R: The effects of dead space and urine flow changes on measurements of glomerular filtration rate by clearance methods. *Can J Physiol Pharmacol* 61: 435-438, 1983. 52. Kiberd BA, Larson TS, Channing RR, Robertson CR, Jamison RL: Effect of atrial natriuretic peptide on vasa recta blood flow in the rat. *Am J Physiol* 252: F1112-1117, 1987. 53. Kirchheim HR: "Physiological significance of atrial natriuretic factor in cardiovascular control". *Proc First Eur Congress Endocrinol, Norhaven 1987*, 165-172. 54. Kondo Y, Imai M, Kangawa K, Matsuo H: Lack of direct action of  $\alpha$ -human atrial natriuretic polypeptide on the in vitro perfused segments of Henle's loop isolated from rabbit kidney. *Pflügers Arch* 406: 273-278, 1986. 55. Koseki Ch, Hayashi Y, Torikai S, Furuya M, Ohnuma N, Imai M: Localization of binding sites for  $\alpha$ -rat atrial natriuretic polypeptide in rat kidney. *Am J Physiol* 250: F210-F216, 1986. 56. Linheimer MD, Lalone RC, Levinsky NG: Evidence that acute increase in glomerular filtration has little effect on sodium excretion in the dog unless extracellular volume is expanded. *J Clin Invest* 46: 256-265, 1967. 57. Light DB, Schwiebert EM, Karlson KH, Stanton BA: Atrial natriuretic peptide inhibits a cation channel in renal inner medullary collecting duct cells. *Science* 243: 383-385, 1989. 58. Liu FY, Cogan MG: Atrial natriuretic factor does not inhibit basal or angiotensin II - stimulated proximal transport. *Am J Physiol* 254: F434-F437, 1988. 59. Lote CJ, Snape BM: Collecting duct flow rate as a determinant of equilibration between urine and renal papilla in the rat in the presence of a maximal antidiuretic hormone concentration. *J Physiol* 270: 533-544, 1977. 60. Maack T: Atrial natriuretic factor: structure and functional properties. *Kidney Internat* 27: 607-615, 1985.
61. Maack T: Renal clearance and isolated kidney perfusion techniques. *Kidney Internat* 30: 142-151, 1986. 62. Maack T, Marion DN, Camargo MJF, Kleinert HD, Laragh JH, Vaughan ED, Atlas SA: Effects of auriculin (atrial natriuretic factor) on blood pressure, renal

- function, and the renin aldosterone system in the dog. *Am J Med* 77: 1069-1075, 1984. 63. Marin-Grez M, Fleming JT, Steinhausen M: Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* 324: 473-476, 1986. 64. Mendez RE, Dunn BR, Troy JL, Brenner BM: Atrial natriuretic peptide and furosemide effects on hydraulic pressure in the renal papilla. *Kidney Internat* 34: 36-42, 1988. 65. Murray RD, Itoh S, Inagami T, Misono K, Seto S, Scicli AG, Carretero OA: Effects of synthetic atrial natriuretic factor in the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 249: F603-F609, 1985. 66. Murthy KK, Thibault G, Schiffrin EL, Garcia R, Chartier L, Gutkowska J, Genest J, Cantin M: Disappearance of atrial natriuretic factor from circulation in the rat. *Peptides* 7: 241-246, 1986. 67. Narumi S, Fuji Y, Yoshizawa M, Yasui T, Saruta T: Effect of vasoactive substances on natriuresis induced by atrial natriuretic peptide in isolated perfused rat kidneys. *Endocrinol Japon* 34: 879-885, 1987. 68. Nonoguchi H, Sands JM, Knepper MA: Atrial natriuretic factor inhibits vasopressin-stimulated water permeability in rat inner medullary collecting duct. *J Clin Invest* 82: 1383-1390, 1988. 69. Ohishi K, Hishida A, Honda N: Direct vasodilatory action of atrial natriuretic factor on canine glomerular afferent arterioles. *Am J Physiol* 255:F415-F420, 1988. 70. Paul RV, Kirk KA, Navar LG: Renal autoregulation and pressure natriuresis during ANF-induced diuresis. *Am J Physiol* 253: F424-F431, 1987.
71. Pollock DM, Arendshorst WJ: Effect of atrial natriuretic factor on renal hemodynamics in the rat. *Am J Physiol* 251: F795-F801, 1986. 72. Portalska E, Sadowski J: Renal medullary electrolytes - effects of furosemide assessed by studies in vivo of electrical admittance. *Arch Internat Physiol Bioch* 92: 345-354, 1984. 73. Pruszczyński W: Przed-sionkowy peptyd natriuretyczny. *Pol Tyg Lek* 42: 1485-1487, 1987. 74. Rankin AJ: Mechanisms of the release of atrial natriuretic peptide. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 1673-1679, 1986. 75. Sadowski J: Estimation of changes in renal tissue electrolytes from measurements of electrical admittance - application in the rat. *Acta Physiol Polon* 36: 339-344, 1985. 76. Sadowski J, Kulczykowska E: Medullary electrolyte responses to three diuretics assessed by measurements of electrical admittance of the in situ rat kidney. *Proc 5th Eur Colloquium Renal Physiol, Frankfurt*, 1985. 77. Sadowski J, Kulczykowska E: Studies of tissue electrical admittance - relation to tissue sodium for different zones of rabbit kidney. *Physiol Bohemoslov* 37: 185-187, 1988. 78. Sadowski J, Kulczykowska E, Kulczykowski M, Bądzynska B: Renal vein outflow recording in rats and rabbits - alternative method of RBF

- measurement. *Acta Physiol Hungar* 72: 335-342, 1988. 79. Sadowski J, Portalska E: Dynamic evaluation of renal electrolyte gradient by in situ tissue impedance studies. *Kidney Internat* 24: 800-803, 1983. 80. Sands JM, Nonoguchi H, Knepper MA: Hormone effects on NaCl permeability of rat inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* 255: F421-F428, 1988.
81. Schnermann J, Marin-Grez M, Briggs JP: Filtration pressure response to atrial natriuretic peptides. *Pflügers Arch* 406: 237-239, 1986. 82. Schwan HP: Determination of biological impedance. w: *Physical techniques in biological research*, rozdz. 6, red. Nastuk WL, Academic Press, NowyJork, Londyn, t. 6: 323-342, 1963. 83. Seidah NG, Lazure C, Chrétien M, Thibault G, Garcia R, Cantin M, Genest J, Nutt RF, Brady SF, Lyle TA, Palevado WJ, Colton CD, Ciccarone TM, Veber DF: Amino acid sequence of homologous rat atrial peptides: natriuretic activity of native and synthetic forms. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 2640-2644, 1984. 84. Showalter CJ, Zimmerman RS, Schwab TR, Edwards BS, Opgenorth TJ, Burnett JC: Renal response to atrial natriuretic factor is modulated by intrarenal angiotensin II. *Am J Physiol* 254: R453-R456, 1988. 85. Soejima H, Grekin RJ, Briggs JP, Schnermann J: Renal response of anesthetized rats to low-dose infusion of atrial natriuretic peptide. *Am J Physiol* 255: R449-R455, 1988. 86. Sonnenberg H: On the physiological role of atrial natriuretic factor. *Klin Wschr* 65 (Suppl. VIII): 8-13, 1987. 87. Sonnenberg H, Cupples WA, De Bold AJ, Veress AT: Intrarenal localization of the natriuretic effect of cardiac atrial extract. *Can J Physiol Pharmacol* 60: 1149-1152, 1982. 88. Sonnenberg H, Honrath U, Chong CK, Wilson DR: Atrial natriuretic factor inhibits sodium transport in medullary collecting duct. *Am J Physiol* 250: F963-F966, 1986. 89. Sonnenburg Ch, Muiz AC, Criscione L, Kraetz J, Hofbauer G: Is the natriuretic effect of atrial natriuretic factor in conscious rats mediated by renal vasodilatation ?. *J Hypert* 3 (Suppl. 3): S303-S305, 1985. 90. Sosa RE, Volpe M, Marion DN, Atlas SA, Laragh JH, Vaughan ED, Maack T: Relationship between renal hemodynamic and natriuretic effects of atrial natriuretic factor. *Am J Physiol* 250: F520-F524, 1986.
91. Steigerwalt S, Carretero OA, Beierwaltes WH: A stop-flow study of intrarenal effects of atrial natriuretic factor. *Proc Soc Exptl Biol Med* 182: 88-94, 1986. 92. Stolpe, van de A, Jamison RL: Micropuncture study of the effect of ANP on the papillary collecting duct in the rat. *Am J Physiol* 254: F477-F483, 1988. 93. Takezawa K,

- Cowley AW Jr, Skelton M, Roman RJ: Atriopeptin III alters renal medullary hemodynamics and the pressure-diuresis response in rats. *Am J Physiol* 252: F992-F1002, 1987. 94. Thomsen K, Schou M, Steiners J, Hansen HE: Lithium as an indicator of proximal sodium reabsorption. *Pflügers Arch* 308: 180-184, 1969. 95. Trippodo NC, Cole FE, Mac Phee AA, Pogram BL: Biologic mechanisms of atrial natriuretic factor. *J Lab Clin Med* 109: 112-119, 1987. 96. Veldkamp PJ, Carmines PK, Inscho EW, Navar LG: Direct evaluation of the microvascular actions of ANP in juxtamedullary nephrons. *Am J Physiol* 254: F440-F444, 1988. 97. Vinay P, Manillier C, Lalonde L, Thibault G, Boulange Y, Gougoux A, Cantin M: Comparative effects of ANP and various diuretics on isolated nephron segments. *Kidney Internat* 31: 946-955, 1987. 98. Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL: Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 47: 1-9, 1980. 99. Weidmann P, Saxenhofer H, Ferrier C: Geschichte und Physiologie des atrialen natriuretischen Peptids beim Menschen. *Schweiz Med Wschr* 117: 1921-1930, 1987. 100. Winquist RJ: Modulation of vascular tone by atrial natriuretic factor. *Blood Vessels* 24: 128-131, 1987.
101. Winquist RJ: Pharmacologic effects of atrial natriuretic peptide. *Endocrinol Metab Clin N Amer* 16: 163-181, 1987. 102. Zeidel ML, Kikeri D, Silva P, Burrowes M, Brenner BM: Atrial natriuretic peptides inhibit conductive sodium uptake by rabbit inner medullary collecting duct cells. *J Clin Invest* 82: 1067-1074, 1988. 103. Zimmerman RS, Schirger JA, Edwards BS, Schwab TR, Heublein DM, Burnett JC Jr: Cardio-renal-endocrine dynamics during stepwise infusion of physiologic and pharmacologic concentrations of atrial natriuretic factor in the dog. *Circ Res* 60: 63-69, 1987.

T a b e l e 1-5

Tabela 1. Charakterystyka czynności wydalniczej i hemodynamiki nerek w grupie szczurów kontrolnych /wartości średnie  $\pm$  SE/.

	Przebieg w czasie /minuty/				Analiza wariancji		
	0-20	20-40	40-60	60-80	n	F	F <sub>0.05</sub>
V μl/min	14.4 $\pm 3.5$	16.7 $\pm 4.2$	16.7 $\pm 4.4$	22.2 $\pm 6.6$	8	1.79	3.07
U <sub>osm</sub> mosm/kg H <sub>2</sub> O	764 $\pm 88$	725 $\pm 72$	612 $\pm 49$	615 $\pm 56$	8	3.27 >	3.07
U <sub>osm</sub> V μosm/min	9.9 $\pm 2.1$	11.9 $\pm 2.5$	9.8 $\pm 2.4$	11.8 $\pm 2.9$	8	0.70	3.07
U <sub>Na</sub> mM	96 $\pm 18$	121 $\pm 31$	109 $\pm 22$	119 $\pm 19$	8	0.02	3.07
U <sub>Na</sub> V μmol/min	1.6 $\pm 0.9$	2.2 $\pm 0.9$	2.1 $\pm 1.0$	2.5 $\pm 1.4$	8	0.35	3.07
BP mmHg	120 $\pm 3$	122 $\pm 3$	120 $\pm 2$	119 $\pm 3$	8	0.48	3.07
RBF ml/min	6.4 $\pm 0.8$	6.1 $\pm 0.7$	6.8 $\pm 0.9$	6.2 $\pm 0.7$	5	2.36	3.49
RPF ml/min	3.6 $\pm 0.5$	3.9 $\pm 0.5$	3.9 $\pm 0.4$	3.6 $\pm 0.4$	5	2.83	3.49
C <sub>in</sub> ml/min	0.93 $\pm 0.13$	0.98 $\pm 0.14$	0.97 $\pm 0.14$	0.93 $\pm 0.17$	8	0.07	3.07

V - diureza minutowa, U<sub>osm</sub> - osmolalność moczu, U<sub>osm</sub>V - wydalanie substancji osmotycznie czynnych,

U<sub>Na</sub> - stężenie Na<sup>+</sup> w moczu, U<sub>Na</sub>V - wydalanie Na<sup>+</sup>, BP - średnie ciśnienie krwi w t. głównej,

RBF - przepływ krwi przez nerkę, RPF - przepływ osocza przez nerkę, C<sub>in</sub> - Klirens <sup>3</sup>H-inuliny /tempo filtracji

kłębuszkowej/, F, F<sub>0.05</sub> - wartości: wyliczone i krytyczne dla poziomu zmienności 0.05 /z tablic/ wg. statystyki F.

Tabela 2. Zmiany czynności wydalniczej i hemodynamiki nerek zależne od działania ANP /I grupa doświadczalna/.

	kontrola	Czas /min/ od początku infuzji ANP			Analiza wariancji		
		0 - 30	30 - 50	50 - 70	n	F	F <sub>0.05</sub>
$\dot{V}$ μl/min	8.9 ±1.2	23.0 <sup>xx</sup> ±3.8	32.3 <sup>xx</sup> ±8.7	22.4 <sup>xx</sup> ±3.1	9	6.47	3.01
$U_{osm}$ mosm/kg	899 ±80	749 ±53	642 <sup>xx</sup> ±42	628 <sup>xx</sup> ±53	9	9.97	3.01
$U_{osm} \cdot V$ μosm/min	7.4 ±0.6	14.1 <sup>xx</sup> ±1.8	20.0 ±4.5	14.5 <sup>xx</sup> ±2.0	9	6.29	3.01
$U_{Na}$ mM	131 ±8	155 ±9	158 <sup>xx</sup> ±6	153 ±7	11	3.60	2.92
$U_{Na} \cdot V$ μmol/min	1.2 ±0.2	3.4 <sup>xx</sup> ±0.6	5.7 <sup>xx</sup> ±1.6	4.0 <sup>xx</sup> ±0.8	9	6.50	3.01
BP mmHg	128 ±6	123 ±5	121 ±5	122 ±5	7	0.25	< 3.16
RBF ml/min	6.9 ±0.3	7.1 ±0.3	7.4 <sup>xx</sup> ±0.3	7.9 <sup>xx</sup> ±0.4	11	7.70	2.92
RPF ml/min	4.3 ±0.2	4.5 ±0.2	4.8 <sup>xx</sup> ±0.2	4.9 <sup>xx</sup> ±0.2	11	12.80	2.92
$C_{in}$ ml/min	1.11 ±0.09	1.17 ±0.11	1.21 ±0.19	0.89 ±0.10	7	1.98	< 3.16
$RPF \cdot E_{in}$ ml/min	0.85 ±0.09	0.84 ±0.07	0.94 ±0.06	0.89 ±0.08	11	0.46	< 2.92
$E_{in}$ %	20 ±2	19 ±2	19 ±1	18 ±1	11	0.40	< 2.92
FF %	28 ±2	29 ±3	26 ±3	19 <sup>x</sup> ±2	8	7.17	3.07

Dawkowanie ANP: dawka wstępna 2μg/kg dożylnie; infuzja ciągła 0.35 μg/min·kg ciężaru ciała w ciągu 30 min;  
 $E_{in}$  - współczynnik ekstrakcji nerkowej inuliny;  $RPF \cdot E_{in}$  - tempo filtracji kłębuszkowej; FF - frakcja filtracyjna  
 $[C_{in}/RPF]$ ; x - p < 0.05 w stosunku do wartości kontrolnej /jedno porównanie/; xx - p < 0.017 /trzy porównania/;  
 pozostałe oznaczenia jak w tabeli 1.

Tabela 3. Zmiany czynności wydalniczej i hemodynamiki nerek zależne od działania ANP /II grupa doświadczalna/.

	kontrola	Czas /min/ od początku infuzji ANP			Analiza wariancji		
		0 - 15	15 - 35	35 - 55	n	F	F <sub>0.05</sub>
V μl/min	8.5 ±1.2	41.9 <sup>xxx</sup> ±8.6	29.3 <sup>xxx</sup> ±5.6	24.5 <sup>xxx</sup> ±5.1	7	6.30	3.16
U <sub>osm</sub> mosm/kg	712 ±47	542 ±34	570 ±47	586 ±49	7	4.50	3.16
U <sub>osm</sub> ·V μosm/min	6.9 ±0.8	22.8 <sup>xxx</sup> ±4.0	16.6 <sup>xxx</sup> ±2.4	13.9 ±2.3	6	8.96	3.29
U <sub>Na</sub> mM	106 ±17	153 ±4	156 <sup>xxx</sup> ±8	155 ±9	8	12.40	3.07
U <sub>Na</sub> ·V μmol/min	1.0 ±0.3	6.9 <sup>xxx</sup> ±1.5	5.3 <sup>xxx</sup> ±0.7	4.2 <sup>xxx</sup> ±0.7	6	10.40	3.29
BP mmHg	126 ±8	107 <sup>xxx</sup> ±9	116 <sup>xxx</sup> ±7	117 ±8	6	4.20	3.29
RBF ml/min	8.3 ±0.5	9.1 ±0.7	9.5 ±0.7	9.6 ±0.6	8	3.46	3.07
RPF ml/min	5.1 ±0.3	5.5 ±0.4	5.8 ±0.4	5.9 ±0.4	7	3.87	3.16
C <sub>in</sub> ml/min	0.85 ±0.10	1.10 <sup>x</sup> ±0.16	0.82 ±0.10	0.79 ±0.07	5	7.05	3.49
RPF·E <sub>in</sub> ml/min	0.99 ±0.12	1.02 ±0.11	0.80 ±0.11	0.94 ±0.15	6	0.80 <	3.29
E <sub>in</sub> %	20 ±2	19 ±2	13 <sup>x</sup> ±1	16 ±1	7	4.40	3.16
FF %	17 ±2	22 <sup>x</sup> ±2	15 ±1	15 ±1	5	9.20	3.49

Dawkowanie ANP: dawka wstępna 3.1 μg/kg dożylnie, infuzja ciągła 2 μg/min·kg ciężaru ciała w ciągu 10 min; pozostałe oznaczenia jak w tabeli 2.

Tabela 4. Zmiany czynności wydalniczej i hemodynamiki nerek zależne od działania ANP /III grupa doświadczalna/.

	kontrola	Czas /min/ od początku infuzji ANP			Analiza wariancji		
		0 - 15	15 - 35	35 - 55	n	F	F <sub>0.05</sub>
V μl/min	9.8 ±1.4	72.5 <sup>xx</sup> ±10.6	56.1 <sup>xx</sup> ±6.5	38.4 <sup>xx</sup> ±5.3	8	24.12	3.07
U <sub>osm</sub> mosm/kg	720 ±93	462 ±24	466 <sup>xx</sup> ±19	511 ±36	8	8.40	3.07
U <sub>osm</sub> ·V μosm/min	6.5 ±1.0	32.3 <sup>xx</sup> ±3.8	25.5 <sup>xx</sup> ±2.4	18.7 <sup>xx</sup> ±2.1	8	34.97	3.07
U <sub>Na</sub> mM	94 ±9	150 <sup>xx</sup> ±6	151 <sup>xx</sup> ±9	148 <sup>xx</sup> ±5	8	37.60	3.07
U <sub>Na</sub> ·V μmol/min	1.0 ±0.2	11.4 <sup>xx</sup> ±1.3	8.4 <sup>xx</sup> ±1.0	5.7 <sup>xx</sup> ±0.8	8	32.11	3.07
BP mmHg	120 ±3	101 <sup>xx</sup> ±3	110 <sup>xx</sup> ±3	117 ±3	9	12.70	3.01
RBF ml/min	6.1 ±0.3	6.5 ±0.3	6.6 <sup>xx</sup> ±0.3	7.1 <sup>xx</sup> ±0.2	8	10.38	3.07
RPF ml/min	3.6 ±0.2	3.8 ±0.2	3.8 ±0.2	4.2 <sup>x</sup> ±0.1	9	20.00	3.01
C <sub>in</sub> ml/min	0.79 ±0.04	1.08 <sup>x</sup> ±0.04	0.85 ±0.04	0.79 ±0.04	8	14.40	3.07
RPF·E <sub>in</sub> ml/min	0.69 ±0.03	0.70 ±0.06	0.87 <sup>xx</sup> ±0.05	0.88 <sup>xx</sup> ±0.03	8	7.22	3.07
E <sub>in</sub> %	18 ±2	18 ±1	22 ±2	20 ±2	9	2.22 <	3.01
FF %	21 ±2	27 ±2	21 ±2	17 ±2	9	10.4	3.01

Dawkowanie ANP: dawka wstępna 10μg/kg dożylnie, infuzja ciągła 6 μg/min·kg ciężaru ciała w ciągu 10 min; pozostałe oznaczenia jak w tabeli 2.

Tabela 5. Ocena istotności zmian admitancji tkanki nerkowej szczura na podstawie analizy wariancji dla pomiarów powtarzanych w czasie oraz testu t-Studenta. Dane dla doświadczeń kontrolnych i trzech grup zwierząt /I,II,III/ otrzymujących różne dawki ANP /wzrastające od I do III/.

Grupa doświadczalna	Warstwa nerki	Pomiar między elektrodami	n	$t_v$	F	$F_t$	test Studenta	
							t	P
kontrolna <sup>a</sup>	RW	I - II	8	6	0.34	2.53		
	RZ	II-III	8	7	1.02	2.34		
I <sup>b</sup>	RW	I - II	6	5	0.81	2.87		
	RZ	II-III	6	8	0.11	2.25		
	R	I -III	5	7	1.55	2.51		
II <sup>b</sup>	RW	I - II	8	9	2.90	> 2.10	3.00	0.02
	RZ	II-III	8	9	0.45	2.10		
	R	I -III	8	9	0.33	2.07		
III <sup>b</sup>	RW	I - II	7	9	3.32	> 2.34	2.73	0.05
	RZ	II-III	7	9	1.21	2.18		
	R	I -III	6	9	0.93	2.12		

Analiza wariancji:

n - liczba zwierząt doświadczalnych;  $t_v$  - liczba badanych punktów w czasie; F - wartość wyliczona;  $F_t$  - wartość krytyczna przy poziomie istotności 0.05;

a - analiza dotyczy całego czasu doświadczenia;

b - analiza dotyczy czasu podawania ANP; RW - rdzeń wewnętrzny; RZ - rdzeń zewnętrzny;

R - łącznie obie warstwy rdzenia.