

9425
H3181



ZESPÓŁ FIZJOLOGII STOSOWANEJ
CENTRUM MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ P A N

.....

Ewa Portalska

**ZMIANY IMPEDANCJI ELEKTRYCZNEJ TKANKI NERKOWEJ KRÓLIKA
W NASTĘPSTWIE BLOKADY REŚCRPCJI KANALIKOWEJ SOLI
ZA POMOCĄ FUROSEMIDU**

Praca doktorska

Promotor:

doc.dr hab.med. Janusz Sadowski

.....

Warszawa

1983

Promotorowi pracy
- doc.dr hab.med. Januszowi Sadowskiemu -
za opiekę i pomoc okazaną mi
podczas przygotowania niniejszej pracy
oraz pani Jadwidze Zwolińskiej
za pomoc w przeprowadzeniu doświadczeń
pragnę służyć wyrazy podziękowania

S P I S T R E Ś C I

	str
1. W S T Ę P	1
2. CEL PRACY	7
3. MATERIAŁ I METODY	8
3.1. Zwierzęta doświadczalne	8
3.2. Przygotowanie operacyjne zwierząt do doświad- czenia	8
3.3. Pomiar przepływu krwi przez nerkę /RBF/	11
3.4. Protokół doświadczenia	13
3.5. Pomiar admitancji elektrycznej tkanki w nerce królika in situ	15
3.6. Analiza zawartości substancji osmotycznie czynnych i jonu Na^+ w płynie tkanki nerkowej .	17
3.6.1. Zależność między admitancją mierzoną w świe- żych skrawkach nerkowych a ich osmolalnością i stężeniem Na^+ . /Próba kalibracji/	19
3.7. Badania klirensowe	20
3.8. Statystyczne opracowanie danych	21
4. W Y N I K I	23
4.1. Admitancja elektryczna /Y/ mierzona w tkan- ce nerki królika in situ	23
4.2. Przepływ krwi przez nerkę i ciśnienie tę- nicze krwi	26
4.3. Wyniki badań klirensowych	27
4.3.1. Wskaźniki hemodynamiczne	27
4.3.2. Charakterystyka funkcji wydalniczej nerki	30
4.3.3. Zagęszczenie moczu	31
4.4. Badania skrawków tkanki nerkowej. Korelacja z wartościami admitancji	33

	str
5. D Y S K U S J A	38
5.1. Rozważania metodyczne	38
5.2. Próba lokalizacji miejsca działania furosemidu w nefronie	42
5.2.1. Zmiany admitancji w świetle tradycyjnych po- glądów na działanie furosemidu	42
5.2.2. Zmiany admitancji w świetle najnowszych po- glądów na działanie furosemidu	50
5.3. Przepływ krwi przez nerkę /RBF/ a zawartość elektrolitów w tkance	53
5.3.1. Wpływ furosemidu na RBF	53
5.3.2. Wpływ mannitolu na RBF	55
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	58
7. PIŚMIENNICTWO	60

1. W S T Ę P

Opublikowanie w 1951 roku wyników badań Wirza i wsp. /86/ dotyczących ciśnień osmotycznych tkanki nerkowej stało się punktem przełomowym na drodze do poznania mechanizmu zagęszczania moczu, jednego z podstawowych procesów zachodzących w nerce. Wirz i wsp. stosując metodę krioskopową stwierdzili, że osmolalność tkanki nerkowej narasta od kory przez rdzeń do brodawki nerkowej, a więc, że istnieje gradient stężeń substancji osmotycznie czynnych w nerce, a rdzeń nerkowy jest zawsze hiperosmotyczny w stosunku do osocza krwi. W oparciu o te obserwacje zwrócono uwagę na wcześniej zaproponowaną koncepcję funkcjonowania pętli Hanle'go jako "wzmacniacza przecioprądowego" /54/. Wytworzenie wysokich stężeń substancji osmotycznie czynnych w rdzeniu nerkowym i w brodawce stwarza warunki do biernej reabsorpcji wody z kanalików zbiorczych i ostatecznie do formowania zagęszczonego moczu. Gradient osmotyczny w nerce odgrywa więc kluczową rolę w utrzymywaniu prawidłowej równowagi wodno-elektrolitowej organizmu.

Należy podkreślić, że zróżnicowanie stężeń substancji osmotycznie czynnych w tkance nerkowej jest wynikiem równowagi dynamicznej między dostarczaniem tych substancji ze światła kanalików nerkowych, głównie z ramienia wstępującego pętli Hanle'go, do śródmiąszu oraz ewakuacją ich ze śródmiąszu przez przepływającą naczyniami prostymi krew. Badania skrawków tkanki nerkowej wykazały, że w warunkach antydiurezy na osmolalność brodawki w 75% składają się NaCl i mocznik, zaś udział wszystkich elektrolitów łącznie wynosi 50-60%. W czasie diurezy wodnej hipertonia osmotyczna rdzenia znacznie zmniejsza się, ale osmolalność rdzenia nerkowego i brodawki pozostaje nadal wyższa niż osmolalność osocza krwi /45/. Istnieje obszerna literatura dotycząca gradientu osmotycznego, w tym także gradientu elektrolitów i mocznika w nerce, obejmująca dane pochodzące z badań skrawków tkankowych /5,6,7,8,10,11,36,37,38,50,55,56,61,62,71,72/. Badania te dostarczyły podstawowych informacji na temat roli gradientu osmotycznego i jego zmian w procesie zagęszczania moczu przez nerkę. Ponieważ jednak zastosowana w nich metodyka sprowadza się z konieczności do jednorazowego pobierania próbek tkanki od jednego zwierzęcia, ogranicza to zakres uzyskiwanych w ten wyrywkowy sposób informacji. Posługując się tą metodyką nie można np. prowadzić obserwacji dynamiki zmian stężeń substancji osmotycznie czynnych w nerce jednego zwierzęcia. Grupa brytyjskich badaczy /Atherton i wsp./ starała się rozwiązać ten problem badając skrawki tkanki nerkowej u wielu grup szczurów zabijanych podczas trwania doświadczenia w pewnych krótkich

odstępach czasu. Należy zdawać sobie sprawę, że prowadzenie tego typu obserwacji wymaga zabijania dużej liczby zwierząt i stąd wypływa dodatkowe ograniczenie: powtórzenie podobnych badań u innych gatunków zwierząt /np. u królików lub psów/ byłoby bardzo kosztowne. Zresztą tak otrzymywane wyniki reprezentują tylko w przybliżeniu rzeczywistą dynamikę zmian, gdyż każda seria danych uzyskiwana w kolejnym etapie doświadczenia pochodzi z innej grupy zwierząt.

Warto podkreślić, że badania skrawków tkanki nerkowej dostarczają informacji o stężeniu substancji osmotycznie czynnych w tkance jako całości, a więc łącznie dla komórek, płynu pozakomórkowego, światła kanalików i naczyń nerkowych. Nie jest to korzystne biorąc pod uwagę fakt, że siłę napędową dla procesu zagęszczania moczu stanowią substancje osmotycznie czynne zawarte w płynie pozakomórkowym rdzenia otaczającym kanaliki, nie zaś w innych przestrzeniach tkankowych. Należy zauważyć również, że badania skrawków wymagają stosowania czasochłonnych metod analitycznych, a różne sposoby przeliczania i ostatecznego wyrażania wyników budzą liczne wątpliwości i często prowadzą do kontrowersyjnej lub wręcz nieprawidłowej interpretacji /28,29/.

W roku 1979 rozpoczęte w naszym laboratorium pierwsze badania dynamiki zmian zawartości elektrolitów w tkance nerkowej przy użyciu nowej metody opartej na pomiarze oporu elektrycznego tkanki. Pierwsze wyniki zostały przedstawione w 1981 r. /32,73/, a następne w rok później /31,69,74/. Metoda ta chociaż "jakościowa" lub w korzystnych warunkach "pół-ilościowa" pozwala na prowadzenie ciągłej obserwacji

zmian stężenia elektrolitów w różnych warstwach nerki *in vivo* i *in situ*, co w pewnym stopniu stanowi przewyżczenie ograniczeń charakteryzujących tradycyjne metody analityczne.

U podstaw teoretycznych zastosowanej metody leży znany fakt, że oporność elektryczna roztworu elektrolitowego zmniejsza się ze wzrostem stężenia wolnych jonów w roztworze, a przewodność roztworu będąca odwrotnością oporności $G = \frac{1}{R}$ jest wprost proporcjonalna do stężenia wolnych jonów.

Ponieważ przewodność roztworu /a nie jego oporność/ jest liniową funkcją stężenia wolnych jonów stosowane do pomiaru przyrządy /konduktometry/ wyskalowane są w jednostkach przewodności. W badaniach konduktometrycznych używa się prądu zmiennego, co jest podyktowane względami technicznymi i wówczas mierzona jest nie oporność roztworu lecz jego impedancja elektryczna wyrażająca się wzorem:

$$Z = \sqrt{R^2 + (X_L - X_C)^2}$$

gdzie:

R - oporność rzeczywista

X_C - reaktancja pojemnościowa

X_L - reaktancja indukcyjna

Przy zachowaniu optymalnych warunków pomiarowych polegających m.in. na zastosowaniu elektrod o dużej powierzchni czynnej i prądu zmiennego o odpowiedniej częstotliwości, udaje się wyeliminować udział reaktancji pojemnościowej i indukcyjnej. Można się wówczas spodziewać, że admitancja elektryczna roztworu stanowiąca odwrotność impedancji - $Y = Z^{-1}$ - będzie liniową funkcją stężenia jonów w roztworze.

W przypadku zastosowania pomiaru admitancji elektrycznej dla określenia stężenia jonów w tkance nie należy oczekiwać równie prostej zależności jak dla roztworów. Wynika to z jednej strony z niehomogenności tkanki /77/, z drugiej zaś z wymagań nałożonych przez cel badań i dotyczących konfiguracji elektrod i zalecanej częstotliwości pomiarowej. Ponieważ tkanka wykazuje znikomą reaktancję indukcyjną, jej impedancję można przedstawić jako: $Z = \sqrt{R^2 + X_C^2}$. Niestety ze względu na konieczność stosowania elektrod o kształcie i właściwościach umożliwiających ich wkłucie w tkankę nie udaje się całkowicie wyeliminować reaktancji pojemnościowej. Dodatkową trudność stanowi fakt, że elektrody posiadają własną impedancję związaną z ich polaryzacją, szczególnie wysoką przy niskich częstotliwościach pomiarowych. Mierzona impedancja jest więc sumą impedancji polaryzacyjnej elektrod i impedancji tkanki. Podobnie jak w przypadku roztworów, korzystniejsze wydaje się odnoszenie stężeń jonów do admitancji elektrycznej /odwrotność impedancji/ niż do samej impedancji, ponieważ ta pierwsza zależność będzie miała najprawdopodobniej charakter bardziej zbliżony do liniowego.

Jak wykazały wcześniejsze badania przy niskich częstotliwościach pomiarowych prąd nie płynie przez wnętrza komórek z uwagi na dużą oporność błon komórkowych /30,77/. Informacja ta została również sprawdzona w naszym laboratorium: istotnie okazało się, że admitancja preparatu złożonego z krwinek /liczba hematokrytowa = 100%/ zmierzona przy użyciu stosowanych przez nas elektrod tkankowych i częstotliwości stosowanej do badań tkankowych /400 Hz/

jest równa zero, a pojawia się i wzrasta w miarę dodawania osocza. Obserwacja ta pozwala przypuszczać, że mierzona admitancja tkanki nerkowej odpowiada w rzeczywistości admitancji samego płynu pozakomórkowego. O znaczeniu tego faktu pisano powyżej.

Przedstawiona metoda - obok zalet, do których oprócz wczesniej wymienionych należy prostota wykonywania pomiarów i uniknięcie skomplikowanego przeliczania wyników /jak przy analizie skrawków/ - posiada również poważne ograniczenie: nie pozwala na oddzielny pomiar stężeń poszczególnych jonów i na określenie zawartości niezjonizowanych substancji osmotycznie czynnych w płynie pozakomórkowym, np. mocznika.

Głównym przedmiotem zainteresowania w obecnej pracy było wyjaśnienie, czy pomiar admitancji tkanki nerkowej jest metodą na tyle oszczędną, że umożliwi wykrycie zmian stężenia elektrolitów w płynie śródmiąższowym. W tym celu przeprowadzono serie badań, w których podając zwierzętom furosemid i blokując w ten sposób reabsorpcję NaCl przesuwano równowagę dynamiczną między dostarczeniem jonów z kanalików nerkowych do śródmiąższu a ich ewakuacją z krwią. Większość prac poświęconych działaniu furosemidu wskazuje, że głównym jego punktem uchwytu jest gruba część ramienia wstępującego pętli Henle'go /18,26,64,65,85/. Porównano także zmiany admitancji różnych warstw tkanki nerkowej po podaniu furosemidu - diuretyka o szałozalizowanym punkcie uchwytu i po mannitolu, działającym wzdłuż całego nefronu /33/.

2. CEL PRACY

Celem pracy było sprawdzenie przydatności metody pomiaru admitancji tkanki nerkowej dla oceny dynamiki zmian stężenia elektrolitów w tkance śródmiąższowej rdzenia. Dla wywołania zmian tego stężenia posłużono się furosemidem - środkiem blokującym reabsorpcję kanalikową NaCl. Przedmiotem zainteresowania było także porównanie furosemidu, środka o działaniu slobalizowanym, z mannitolem blokującym reabsorpcję NaCl wzdłuż całego przebiegu kanalika. Brano też pod uwagę możliwość uzyskania nowych danych dotyczących dokładniejszej lokalizacji działania furosemidu w nefronie.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Zwierzęta doświadczalne

Doświadczenia przeprowadzono na królikach rasy mieszanej - samcach ważących 3,0-5,0 kg. Zwierzęta karmiono standardową chrupką i zapewniono im swobodny dostęp do wody.

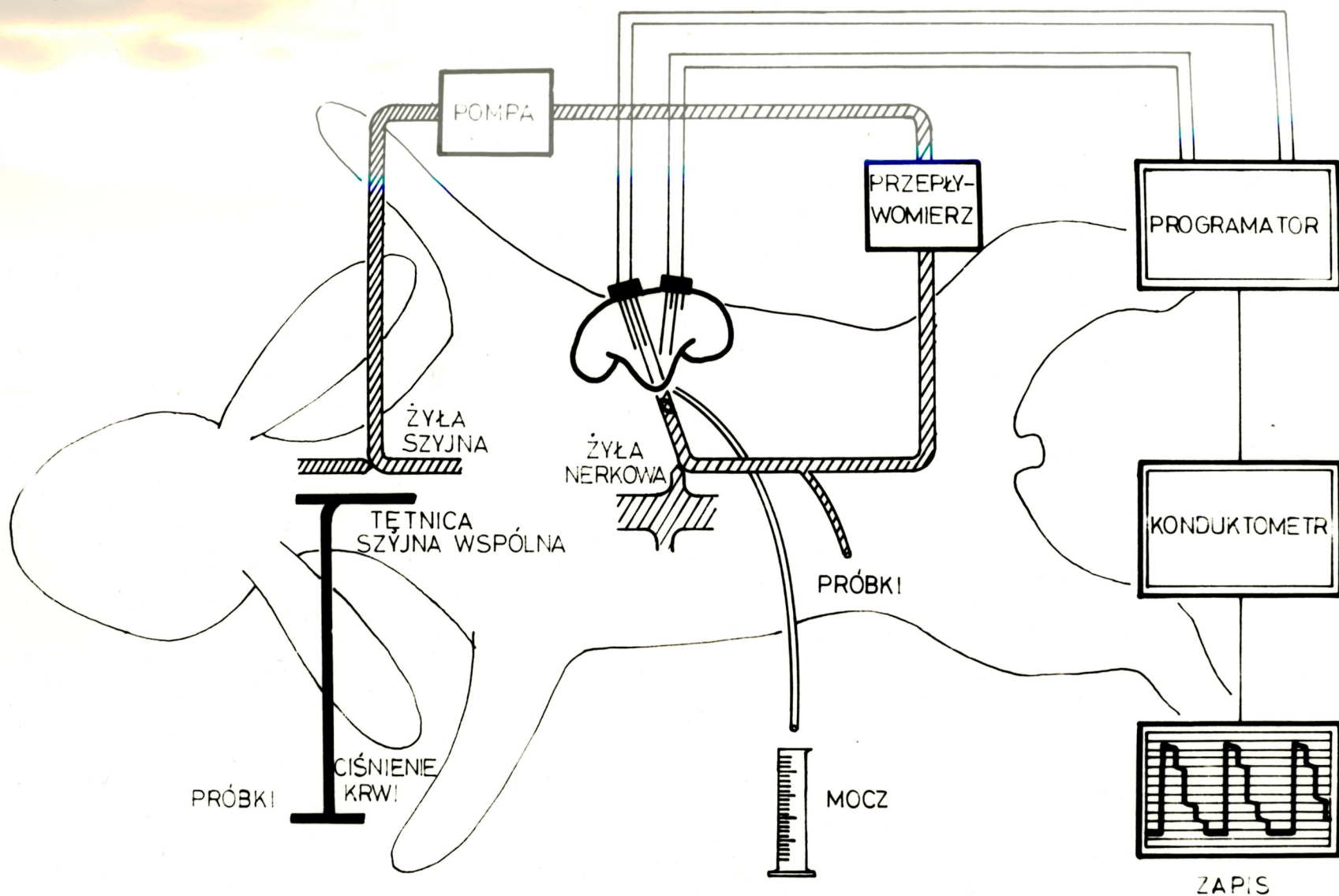
3.2. Przygotowanie operacyjne zwierząt do doświadczenia

Badanym zwierzętom zabierano karmę i wodę na 24 godziny przed rozpoczęciem doświadczenia. Pół godziny przed podaniem środka usypiającego królikom wstrzykiwano domięśniowo chlorowodorek 10-/3-dwumetyloaminopropyl/-fenotiazyny /promazynej/ w dawce 3,5 mg/kg ciężaru ciała. Ten lek neuroleptyczny pozwalał na zmniejszenie dawki środka narkotycznego niezbędnej do uzyskania głębokiego uspienia zwierzęcia. Króliki usypiano wstrzykując im do żyły brzeżnej ucha roztwór pentobarbitalu /vetbutal/ w dawce 20 mg/kg ciężaru ciała. Jeśli zaistniała potrzeba, dawkę tę uzupełniano w czasie trwania

operacji i doświadczenia. Podczas operacji zwierzęta otrzymywały do żyły brzeżnej ucha infuzję izotonicznego roztworu NaCl z szybkością 0,3 ml/min., zaś w czasie doświadczenia miejsce jej zajmowała infuzja substancji klirensowych /por. niżej - pkt.3.7/.

Ryc.1 przedstawia w zarysie model doświadczalny, ilustrując jednocześnie elementy przygotowania operacyjnego. Po chirurgicznym odsłonięciu tohawicy wprowadzano do niej polietylenową rurkę tracheostomijską; kaniulowano także tętnicę szyjną wspólną w celu pobierania próbek krwi tętniczej i mierzenia ciśnienia tętniczego krwi za pomocą elektromanometru EK4 /Farum/ wyposażonego w przetwornik ciśnienia P23 Db / Statham, Puerto Rico/. Kolejnym etapem operacji było odsłonięcie lewej nerki z cięcia lędźwiowego, uwolnienie jej z tkanki tłuszczowej oraz wypreparowanie moczowodu i naczyń nerkowych: żyły i tętnicy. Szypułkę nerkową starannie oczyszczono z przylegającej tkanki i włókien nerwowych, po czym do moczowodu wprowadzono cewnik w celu zbierania moczu bezpośrednio z nerki.

W doświadczeniach zastosowano model "pół-izolowanej nerki" z pozaustrojowym krążeniem krwi typu: żyła nerkowa-żyła szyjna, co stwarzało możliwość bezpośredniego mierzenia wypływu żylnego z nerki i ułatwiało pobieranie próbek krwi żyłnej nerkowej. Pojemność systemu krążenia pozaustrojowego wraz z przepływomierzem wynosiła średnio 7,5 ml; układ ten wypełniano wstępnie izotonicznym roztworem NaCl. Po wstrzyknięciu dożylnym heparyny w dawce 7.000 j.m. kaniulowano żyłę szyjną zewnętrzną przygotowując w pierwszej



Ryc.1. Przygotowanie królika do doświadczenia. Model pół-izolowanej nerki z pozaustrojowym krążeniem krwi. Krew z żyły nerkowej tłoczona jest pompą do żyły szyjnej. Przepływomierz włączony w układ mierzy wypływ żylny. Okresowo pobierane są próbki krwi tętniczej /t.szyjna wspólna/ i żylny nerkowej oraz moczu. Elektrody /4 pary/ wklute w różne warstwy nerki połączone są przez programator z konduktometrem mierzącym admittancję tkanki. Średnie ciśnienie krwi mierzone jest w tętnicy szyjnej wspólnej.

kolejności odbiór krwi żyłnej nerkowej.

Najtrudniejszym elementem w przygotowaniu królików do doświadczenia było kaniulowanie żyły nerkowej, do którego przystępowano natychmiast po zakaniulowaniu żyły szyjnej. Zabieg rozpoczynało nakropienie niewielkiej ilości - do 0,5 ml roztworu 1% polokainy na powierzchnię naczyń nerkowych w pobliżu wnęki nerkowej. Miało to na celu zapobieżenie skurczowi naczyń nerkowych /głównie tętnicy/ w czasie manipulacji. Następnie pod żyłę nerkową podkładano dwie nitki: jedną od strony nerki, drugą od strony żyły głównej dolnej. Zabieg kaniulowania wykonywano z asystentem, a kolejność czynności była następująca: nacięcie poprzeczne żyły nerkowej, wprowadzenie kaniuli /cienkościenna, specjalnie uformowana rurka szklana o średnicy ok. 1,5 mm w najwęższym miejscu/, zawiązanie nitki na kaniuli tak, aby nie wysunęła się z żyły, zawiązanie żyły nerkowej od strony żyły głównej. Przedstawiony sposób kaniulowania żyły nerkowej nie wymagał czasowego zaciśnięcia tętnicy nerkowej i przerwania krążenia krwi w nerce; chwilowe naciągnięcie szypuły nerkowej w momencie kaniulowania wywoływało jedynie przejściowy spadek przepływu krwi. Ponieważ kaniula połączona była z układem odprowadzającym krew do żyły szyjnej, nie występował także zastój żyłny w nerce; krew natychmiast zaczynała odpływać wypełniając rurkę przepływomierza, a po osiągnięciu w niej pewnego poziomu /por. niżej: pkt.3.3/ tłoczona była do żyły szyjnej za pomocą pompy rolkowej o płynnej regulacji szybkości. Dzięki opisanej metodzie w większości przypadków obserwowano względnie wysokie wartości przepływu krwi przez nerkę już

bezpośrednio po uruchomieniu krążenia pozaustrojowego.

Dosyć często na wewnętrznych ścianach kaniul i łączących je drenów obserwowano osadzanie się bezpostaciowej bliżej niezidentyfikowanej białawej masy białkowo-lipidowej, która czasami, gdy występowała w dużych ilościach, utrudniała odpływ krwi z nerki, co zmuszało do zrezygnowania z eksperymentu. Nie kontynuowano doświadczeń, w których w okresie przygotowawczym napotymano na istotne trudności techniczne lub obserwowano niskie wartości przepływu krwi przez nerkę.

3.3. Pomiar przepływu krwi przez nerkę /RBF/

Przepływ krwi przez nerkę określano mierząc wypływ krwi żyłą nerkową. Należy zwrócić uwagę, że przepływ krwi tętnicą nerkową jest wyższy od zmierzonego wypływu żylnego o objętość wydalanego moczu plus objętość odpływającej z nerki chłonki. Można się spodziewać, że rozbieżność ta zagnanoży się szczególnie w warunkach zwiększonej diurezy, gdy objętość wydalanego moczu wzrasta. Tak więc, przepływ krwi mierzony jako wypływ żylny u zwierząt w czasie trwania diurezy ma wartość zaniżoną w stosunku do rzeczywistej. Dla doświadczeń prezentowanych w niniejszej pracy różnicę tę oszacowano jako nie przekraczającą 4% mierzonej wartości przepływu /najwyższa w czasie diurezy wywołanej dużą dawką furosemidu i infuzją mannitolu/.

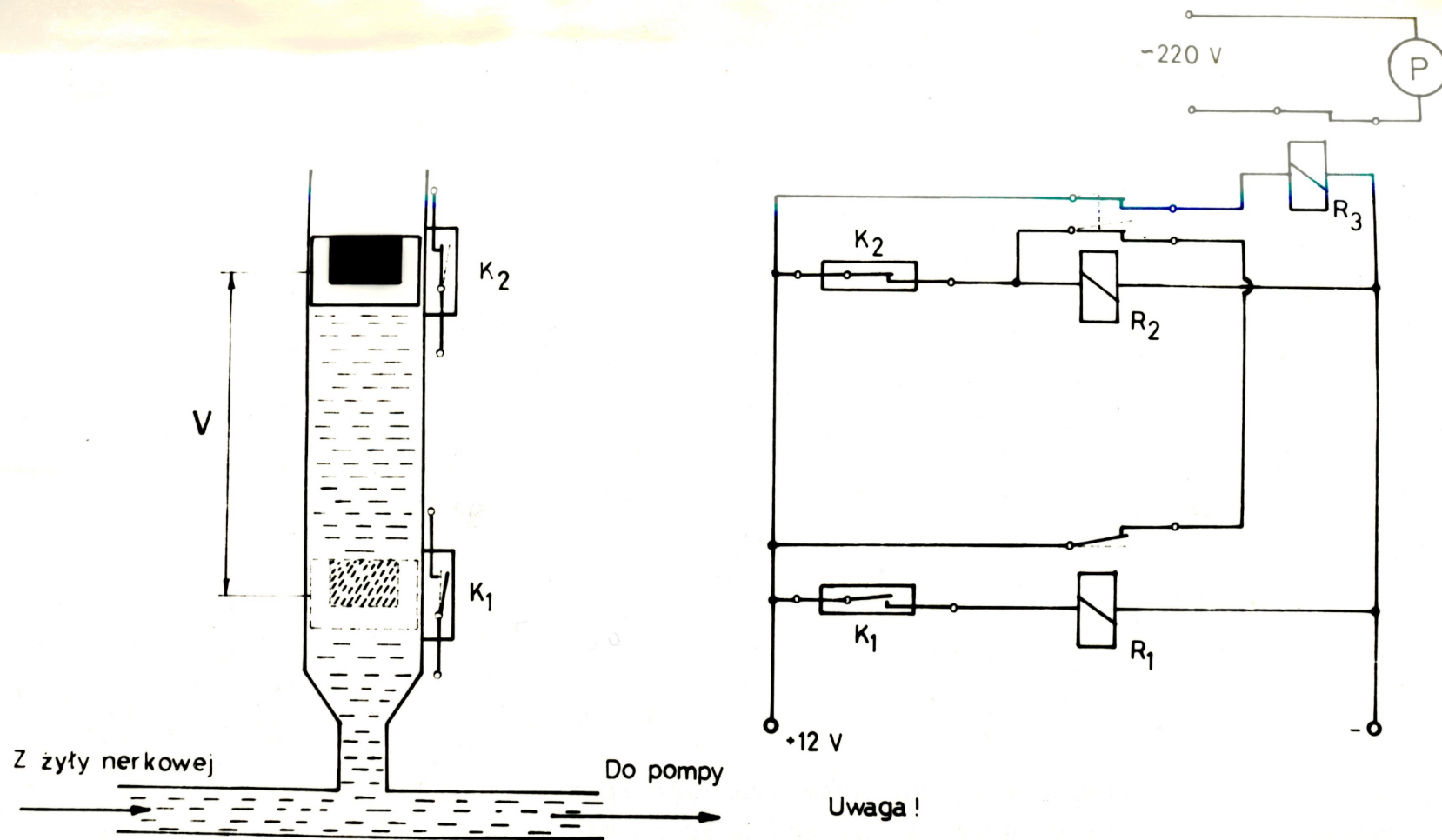
Schemat układu zastosowanego do pomiaru przepływu krwi /opracowanego przez Sadowskiego i Kosowskiego - dane nie o-
publikowane/ przedstawiono na ryc.2. Krew wypływająca żyłą
nerkową wypełnia szklaną kalibrowaną rurkę stanowiącą pod-
stawowy element przepływomierza, skąd okresowo wypompowywa-
na jest do żyły szyjnej wspólnej w kierunku prawego przed-
sionka serca. Na zewnętrznej ścianie rurki umocowano styki
magnetyczne, zaś wewnątrz rurki, na powierzchni zbierającej
się krwi unosi się pływak korkowy z magnesem. Zwieranie i
rozwieranie styków zależnie od położenia pływaka powoduje
włączanie i wyłączanie pomp za pośrednictwem układu elek-
tronicznego /ryc.2/.

Cykl pracy miernika wypływu żylnego przedstawia się na-
stępująco:

a/ faza opróżniania rurki przepływomierza - pływak na-
przeciw górnego styku - magnes zwiera styki, pompa włącza
się, krew z rurki odpływa, poziom krwi w rurce obniża się;

b/ faza pomiaru przepływu - pływak naprzeciw dolnego
styku - magnes zwiera styki, pompa ^{wyłącza} się, krew napływa
do rurki do momentu, gdy pływak znajdzie się naprzeciw gór-
nego styku i uruchomi pompę. Faza napełniania się rurki
przepływomierza krwią z żyły nerkowej sygnalizowana była
zapalaniem się żarówki włączonej w obwód.

Znając objętość krwi zbierającej się w rurce w czasie
gdy pompa nie pracowała /objętość kalibracyjna/ i odpowia-
dający temu czas /mierzony każdorazowo stoperem lub rejes-
trowany/, można było określić wielkość przepływu krwi przez
nerkę w ml/min.



Uwaga!

Na schemacie zaznaczono pracę układu przy zwartym przełączniku K_2

Ryc.2. Schemat zastosowanego w badaniach przepływomierza /według Sadowskiego i Kosowskiego/. Krew z żyły nerkowej napływa do kalibrowanej rurki przepływomierza, na ścianach której umocowano styki elektromagnetyczne $/K_1, K_2/$. Unoszący się na powierzchni krwi korkowy pływak z umieszczonym w nim magnesem zwiiera kolejno styki K_2 i K_1 odpowiednio włączając i wyłączając pompę. V - objętość kalibracyjna. Przedstawiono również schemat elektryczny urządzenia.

3.4. Protokół doświadczenia

Z chwilą uruchomienia krążenia pozaustrojowego i układu do pomiaru przepływu krwi przez nerkę wkluwano w odsłoniętą nerkę cztery pary elektrod do pomiaru admitancji elektrycznej tkanki /por.niżej - pkt.3.5/. Stwierdzono, że wkłucie elektrod w nerkę nie powodowało zmian przepływu krwi przez nerkę ani jej czynności wydalniczych.

Podczas stabilizowania się zapisu admitancji królikom wstrzykiwano do żyły brzożnej ucha dawkę wstępną substancji klirensowych: 40 mg kwasu para-aminhippurowego /PAH/ i 200 mg kreatyniny, a następnie rozpoczynano infuzję soli izotonicznej /szybkość infuzji: 0,6 ml/min/, zawierającej obydwie te substancje w takim stężeniu, że królik otrzymywał 0,35 mg/min · kg ciężaru ciała PAH i 1,75 mg/min · kg kreatyniny. Po upływie około 30 minut koniecznych dla ustabilizowania się stężeń tych substancji w osoczu krwi rozpoczynano pierwszą zbiórkę moczu /kontrolny okres klirensowy/ trwającą 15-20 min. W środku okresu pobierano próbki krwi z tętnicy szyjnej i żyły nerkowej, zaś po jego zakończeniu królikom podawano środek diuretyczny.

Zwierzęta podzielono na cztery grupy doświadczalne:

- I grupa: kontrolna /pomiar admitancji tkanki nerkowej, RBF, ciśnienia tętniczego i klirensów bez stosowania środków diuretycznych/,

- II grupa: po okresie kontrolnym królikom wstrzykiwano dożylnie furosemid /N-4-Furfuryl-2-chlor-5-karboksylsulfanilamid/ w jednorazowej dawce 1,5 mg/kg ciężaru ciała,

- III grupa: po okresie kontrolnym królikom wstrzykiwano dożylnie furosemid w jednorazowej dawce 3,0 mg/kg ciężaru ciała,

- IV grupa: po okresie kontrolnym króliki otrzymywały dożylną infuzję 15% roztworu mannitolu; w czasie doświadczenia szybkość infuzji modyfikowano w ten sposób, aby uzyskać wzrost diurezy podobny do wzrostu obserwowanego w II grupie doświadczalnej.

Mocz zbierano przez cztery okresy doświadczalne trwające po 10-15 minut, zaś w środku drugiego i czwartego okresu pobierano próbki krwi tętniczej i żyłnej nerkowej.

Po zakończeniu czwartej zbiórki moczu wycinano lewą nerkę i po jej przecięciu wzdłuż mierzono najdłuższą parą elektrod admittancję tkanki na przekroju: od kory do brodawki nerkowej, a następnie pobierano skrawki tkanki do analizy. Podobnie postępowano z prawą nerką.

W kilku doświadczeniach po zakończeniu czwartej zbiórki moczu nerek nie wycinano, a zwierzętom podawano dożylną infuzję 3% roztworu NaCl, kontynuując obserwacje doświadczalne.

W czasie wszystkich doświadczeń rejestrowano w sposób ciągły admittancję tkanki nerkowej, zaś w odstępach 2-minutowych mierzono przepływ krwi przez nerkę i odczytywano wartość średniego ciśnienia krwi w tętnicy szyjnej wspólnej. Każdorazowo przed pobraniem krwi podawano królikom równoważącą ubytek objętość dekstranu, a płyny tracone w moczu

uzupełniano co pewien czas izotonicznym roztworem NaCl.

3.5. Pomiar admitancji elektrycznej tkanki w nerce królika *in situ*

W doświadczeniach przeprowadzono pomiary impedancji elektrycznej tkanki nerkowej zawartej pomiędzy dwiema elektrodami stanowiącymi "komórkę impedancyjną". Miernik konduktometru współpracującego z elektrodami wyskalowany był w jednostkach admitancji $/\mu S/$ będącej odwrotnością impedancji i w tych to jednostkach przedstawiano wyniki pomiarów. Poszczególne pary elektrod mierzyły admitancję różnych warstw nerki:

W skład układu pomiarowego wchodziły /ryc.1/:

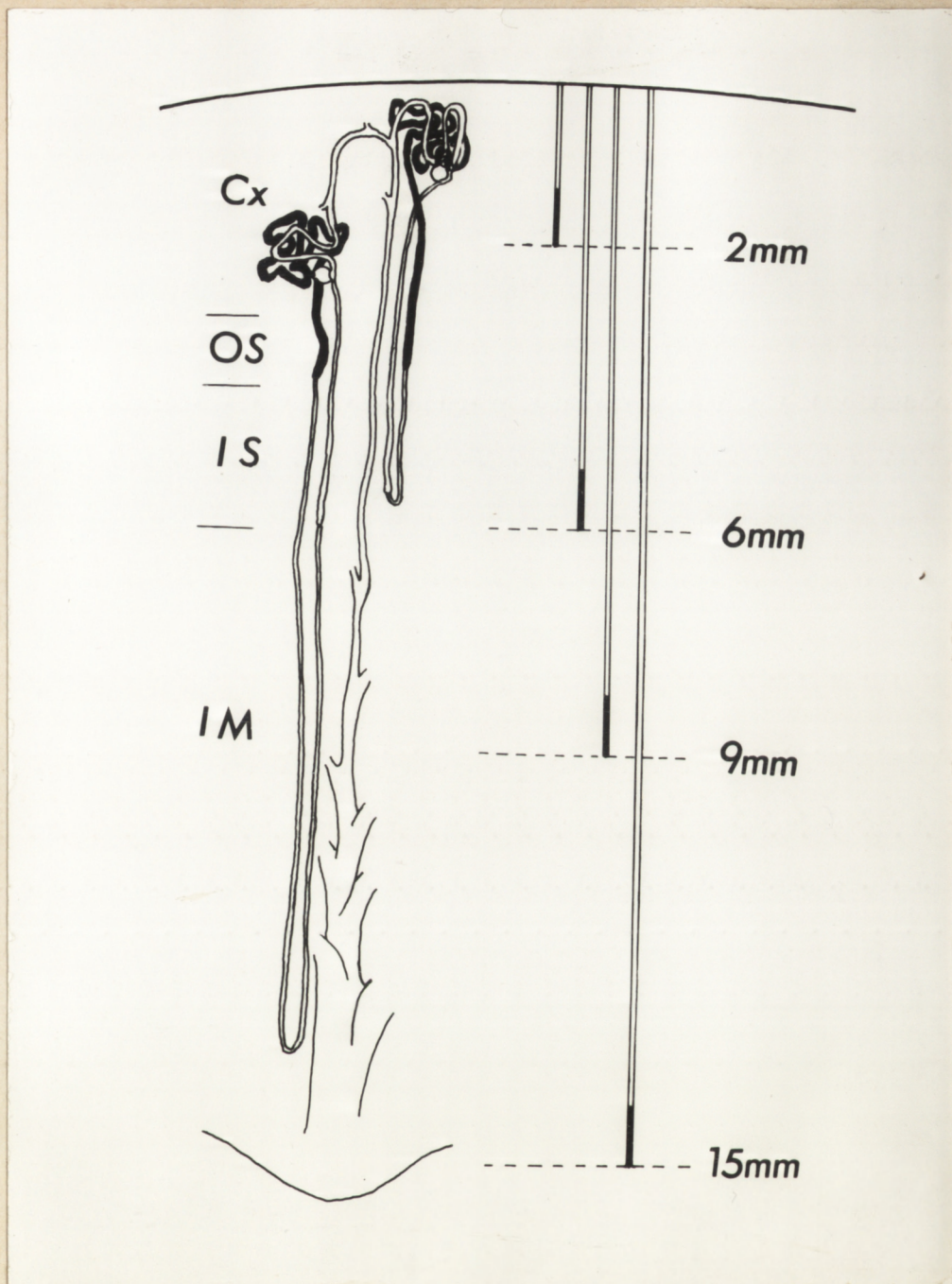
- 4 pary elektrod w dwóch zestawach po dwie pary w każdym,
- programator /Lema, Medical Academy, Bulgaria/ włączający do pracy kolejne pary elektrod,
- konduktometr laboratoryjny N572 /Mera-Elwro/ mierzący impedancję przy częstotliwości 400 Hz,
- rejestrator potencjometryczny jednokanałowy, o ciągłym zapisie liniowym /TZ21S, Laboratorni Pristroje, Praha/.

Elektrody wykonane z drutu irydo-platynowego /25% Ir/ o średnicy 0,5 mm pokryte były izolującą warstwą lakieru na całej długości z wyjątkiem 1-milimetrowego zaostrego końca, stanowiącego powierzchnię czynną. W celu zmniejsze-

nia impedancji własnej elektrod starano się zwiększyć maksymalnie na ile to było możliwe ich powierzchnią czynną przez zarysowanie powierzchni drutu. W przypadku elektrod przeznaczonych do wkłuwania w tkankę nie można było zastosować powierzchni czynnej z czerni platynowej używanej w elektrodach pracujących w roztworach, gdyż uległaby szybkiemu zniszczeniu. Elektrody obsadzone były w płytce podstawnej z dentystycznej żywicy metakrylanowej /Duracryl/, tak że zachowane były stałe odległości między nimi. Dzięki odpowiedniemu dobraniu długości /2,6,9 i 15 mm/ elektrody po wkłuciu w nerkę mierzyły admitancję kory, rdzenia zewnętrznego /na poziomie grubego odcinka ramienia wstępującego pętli Henle'go/, rdzenia wewnętrznego /na poziomie cienkiego odcinka ramienia wstępującego pętli Henle'go/ i okolicy brodawki rdzenia wewnętrznego /ryc.3/.

Prawidłowość umiejscowienia najdłuższej pary elektrod w nerce sprawdzano śledząc wskazania konduktometru podczas jej wkłuwania. Gdy elektrody przebijały szczyt brodawki i wchodziły do światła miedniczki nerkowej zaznaczał się wyraźny spadek admitancji, której wartość wykazywała znaczne oscylacje. Wówczas elektrody nieznacznie wysuwano z nerki, tak aby ich końce znajdowały się w tkance brodawki nerkowej.

W czasie doświadczenia elektrody połączone były z programatorem, który kolejno włączał poszczególne pary do pracy. Pomiar i zapis admitancji dla jednej pary elektrod trwał 10 s., po czym pracę rozpoczynały kolejno: druga, trzecia i czwarta para. Po 30-sekundowej przerwie ponownie włączała się pierwsza para tak, że cykl powtarzał się co 70 sekund.



Ryc.3. Lokalizacja elektrod w nerce. Dla uproszczenia zaznaczono po jednej elektrodzie z każdej pary /powierzchnię czynną zaznaczono kolorem czarnym/. Naszkicowano schemat nefronów: korowego i przyrdzeniowego u królika według Kaisslinga i Kriza /47/. Część nefronu przedstawiającą kanalik proksymalny oznaczono kolorem czarnym. Cx - kora nerkowa, OS - zewnętrzna warstwa rdzenia zewnętrznego, IS - wewnętrzna warstwa rdzenia zewnętrznego, IM - rdzeń wewnętrzny.

**3.6. Analiza zawartości substancji
osmotycznie czynnych i jonu Na^+
w płynie tkanki nerkowej**

Analizę tkanek przeprowadzono posługując się metodą Appelbooma i wsp. /2/ z nieistotnymi modyfikacjami. Wspomniana metoda polega na ekstrahowaniu wodą destylowaną substancji tkankowych po uprzednim zatrzymaniu procesów enzymatycznych w tkance przez zalanie jej natychmiast po pobraniu wrzącą wodą. Przy założeniu, że w czasie jednogodzinnego gotowania ustala się stan równowagi stężeń substancji między skrawkiem tkanki a otaczającym płynem, a więc że zachodzi swobodne przemieszczanie się cząsteczek, można przyjąć, że mierzone stężenie jonu Na^+ i wszystkich substancji osmotycznie czynnych w "zrównoważonym" z tkanką płynie odpowiada ich stężeniu w płynie tkankowym. Metoda nie uwzględnia jednak faktu, że substancje osmotycznie czynne przechodzące z tkanki do otaczającego ją płynu są tam rozcieńczone większą jego ilością niż ma to miejsce w tkance. Wiadomo, że wraz ze wzrostem rozcieńczenia rośnie współczynnik aktywności osmotycznej substancji rozpuszczonej i wyniki są zawyżane w stosunku do wyjściowych. Metoda zakłada również, że wszystkie cząsteczki aktywne osmotycznie w badanym płynie są również aktywne /całkowicie zjonizowane/ w płynie tkankowym, co niekoniecznie musi być prawdą. Przystępując do analiz skrawków tkankowych należy więc zdawać sobie sprawę z pewnych niedokładności

stosowanej metody /49/.

Zgodnie z przedstawionymi założeniami metody skrawki tkanki pobrane /po zakończeniu doświadczenia/ z kory, rdzenia wewnętrznego i brodawki nerkowej pewnej liczby zwierząt z osterch grup doświadczalnych szybko ważono z dokładnością 0,5 mg /średni ciężar skrawków: 100-200 mg/, a następnie przenoszono do wytarowanych probówek i salewano wrzącą wodą destylowaną. Probówki umieszczano we wrzącej łaźni wodnej na 60 min. po czym wyjmowano je, ochłodzono i ważono. Następnie oznaczano osmolalność płynu "zrównoważonego" z tkanką w oparciu o pomiar obniżenia punktu zamarzania /osmometr Fiske G-66, USA/ oraz stężenie jonu sodowego za pomocą fotometru płomieniowego /Zeiss III, NRD/.

Skrawki tkanki nerkowej pobrane od innych zwierząt z osterch grup doświadczalnych /ważące również 100-200 mg/ umieszczano w probówkach i suszono przez 24 godziny w temperaturze 110°C, a następnie ważono. Znając ciężar mokrej i suchej tkanki określano zawartość wody w tkance. Stanowiło to również podstawę do oszacowania zawartości wody i ciężaru suchej tkanki w skrawkach, w których przeprowadzano oznaczenie osmolalności i stężenia jonu sodowego.

Stężenie w płynie tkankowym substancji osmotycznie czynnych /osmolalność/ lub jonu sodowego obliczane wg wzoru:

$$[\text{Osm}, \text{Na}^+]_{\text{tk}} = \left(\frac{T_{\text{H}_2\text{O}} + D_{\text{H}_2\text{O}}}{T_{\text{H}_2\text{O}}} \right) \cdot [\text{Osm}, \text{Na}^+]_{\text{obs}}$$

gdzie:

$T_{\text{H}_2\text{O}}$ - ciężar wody tkankowej /z oszacowania/

D_{H_2O} - ciężar dodanej wody destylowanej
 $[Osm, Na^+]_{obs}$ - osmolalność lub stężenie jonu sodowego
zmierzone w płynie "zrównoważonym" z tkanką.

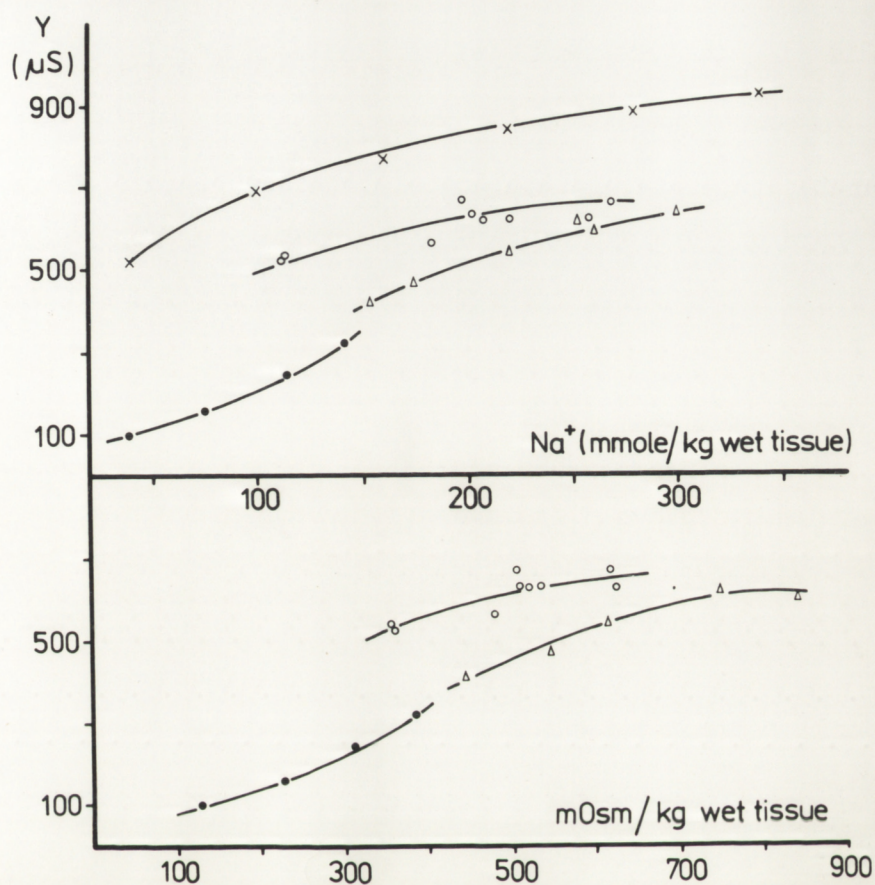
Zastępując T_{H_2O} w mianowniku ciężarem mokrej lub suchej tkanki otrzymano wartości stężeń odpowiednio w przeliczeniu na mokrą i suchą tkankę.

3.6.1. Zależność między admitancją mierzoną w świeżych skrawkach nerkowych a ich osmolalnością i stężeniem Na^+ /Próba kalibracji/

Celem przeprowadzonych badań było ustalenie, czy mierzona admitancja jest po prostu funkcją stężenia elektrolitów w tkance, czy zależy także od rodzaju tkanki /kora, rdzeń wewnętrzny, brodawka/ i w związku z tym, czy wartości admitancji mierzone w obrębie różnych warstw tkanki nerkowej mogą być bezpośrednio między sobą porównywane.

Skrawki tkanki pochodzące z trzech warstw nerki: kory, rdzenia wewnętrznego i brodawki nerkowej królika, ważące od 80 do 150 mg, umieszczono w roztworach NaCl o narastających stężeniach: 40, 100, 160, 220, 280, 340 mmoli/l. Po 90-minutowym wytrząsaniu skrawki wyjmowano i mierzono ich admitancję, a następnie oznaczano ich osmolalność i stężenie Na^+ w sposób opisany powyżej. Tą samą parą elektrod, której używano w badaniach tkankowych, zmierzono również admitancję wspomnianych wyżej roztworów NaCl.

Wyniki badań, przedstawione na ryc.4, wskazują na niewątpliwą zależność admitancji wraz ze wzrostem osmolalności



Ryc.4. Zależność między stężeniem jonu sodowego lub osmolalnością w sztucznie nasycanych NaCl skrawkach tkanki nerkowej królika a wartością admitancji. Tkanka pochodziła z trzech warstw nerki: kory /●/, rdzenia wewnętrznego /○/ i okolicy brodawki rdzenia wewnętrznego /Δ/.

Wartości stężeń wyrażono w milimolach na kg mokrej tkanki /mmole/kg wet tissue/. Podano także zależność między stężeniem jonu sodowego w roztworze NaCl /mmole/kg H₂O/ a wartością admitancji tego roztworu /x/.

i stężenia Na^+ . Jest jednak rzeczą charakterystyczną, że mamy do czynienia z odrębnymi zależnościami dla trzech warstw tkanki nerkowej. Również punkty przedstawiające zależność między stężeniem jonu sodowego w roztworze NaCl a wartością admitancji tego roztworu układają się w niezależną krzywą. Spostrzeżenie to wskazuje, że wartości admitancji mierzone w obrębie różnych warstw tkanki nerkowej nie mogą być bezpośrednio porównywane między sobą. Dotyczy to zarówno wartości absolutnych /wg ryciny stężenie Na^+ równe 115 mmol/l odpowiada admitancji równej około 250 μS dla kory, ale ponad 500 μS dla rdzenia wewnętrznego/ jak i - chociaż w mniejszym stopniu - zmian admitancji /różne nachylenia krzywych dla kory i rdzenia/.

3.7. Badania klirensowe

Po zmierzeniu objętości moczu w poszczególnych okresach i wyliczeniu diurezy minutowej V oznaczano osmolalność moczu U_{osm} i osocza krwi tętniczej P_{osm} za pomocą osmometru Fiske'go typu G-66 oraz stężenie jonu sodowego w moczu U_{Na} i w osoczu P_{Na} za pomocą fotometru płomieniowego Zeiss III.

Poziom kreatyniny w osoczu krwi tętniczej P_{or} i w moczu U_{or} oznaczano metodą Poppera i wsp. /68/. Klirens kreatyniny egzogennej równy $\frac{U_{\text{or}} V}{P_{\text{or}}}$ przyjmowano jako miarę filtracji kłębkowej GFR .

Początkowe wątpliwości autorów dotyczące przydatności inuliny i kreatyniny egzogennej do pomiaru filtracji kłębkowej u królika nie potwierdziły się w późniejszych badaniach /13/.

PAH oznaczano w osoczu krwi tętniczej A_{PAH} i żyłnej nerkowej V_{PAH} metodą Waugh'a i Bealla /83/ i obliczano jego współczynnik ekstrakcji E_{PAH} równy -

$$\frac{A_{PAH} - V_{PAH}}{A_{PAH}}$$

Z otrzymanych wartości wyliczano dalsze wskaźniki:

- wydalanie substancji osmotycznie czynnych $U_{osm} V$
- wydalanie jonu sodowego $U_{Na} V$
- wydalanie jonu sodowego w przeliczeniu na 100 ml przesączu kłębkowego $\frac{U_{Na} V}{C_{cr}}$
- klirens osmotyczny $C_{osm} = \frac{U_{osm} V}{P_{osm}}$
- klirens wolnej wody $C_{H_2O} = V - C_{osm}$
- klirens wolnej wody w przeliczeniu na 100 ml przesączu kłębkowego $\frac{C_{H_2O}}{C_{cr}}$

3.8. Statystyczne opracowanie danych

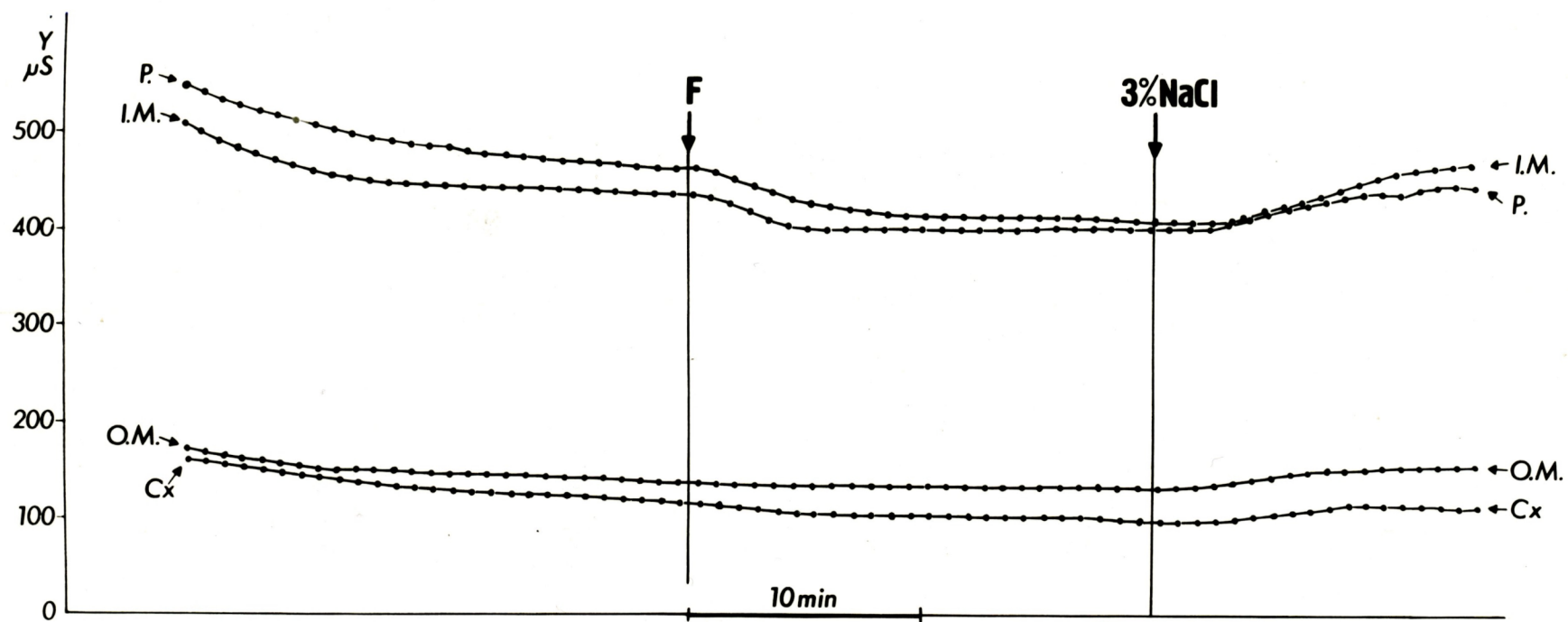
W niniejszej pracy miarą odchylenia wyników od wartości średniej był błąd standardowy /SE/. Analizując zmienność w czasie badanych wskaźników stosowano analizę wariancji dla powtarzalnych oznaczeń, a następnie test t-Studenta dla

zmiennych zależnych /82/. Porównując wielkości wskaźników otrzymane dla zwierząt należących do różnych grup doświadczalnych stosowano test t-Studenta dla zmiennych niezależnych poprzedzony klasyczną analizą wariancji. Przeprowadzono również analizę korelacji i regresji liniowej wybranych danych standardowymi metodami.

4. W Y N I K I

4.1. Admitancja elektryczna /Y/ mierzona w tkance nerki królika in situ

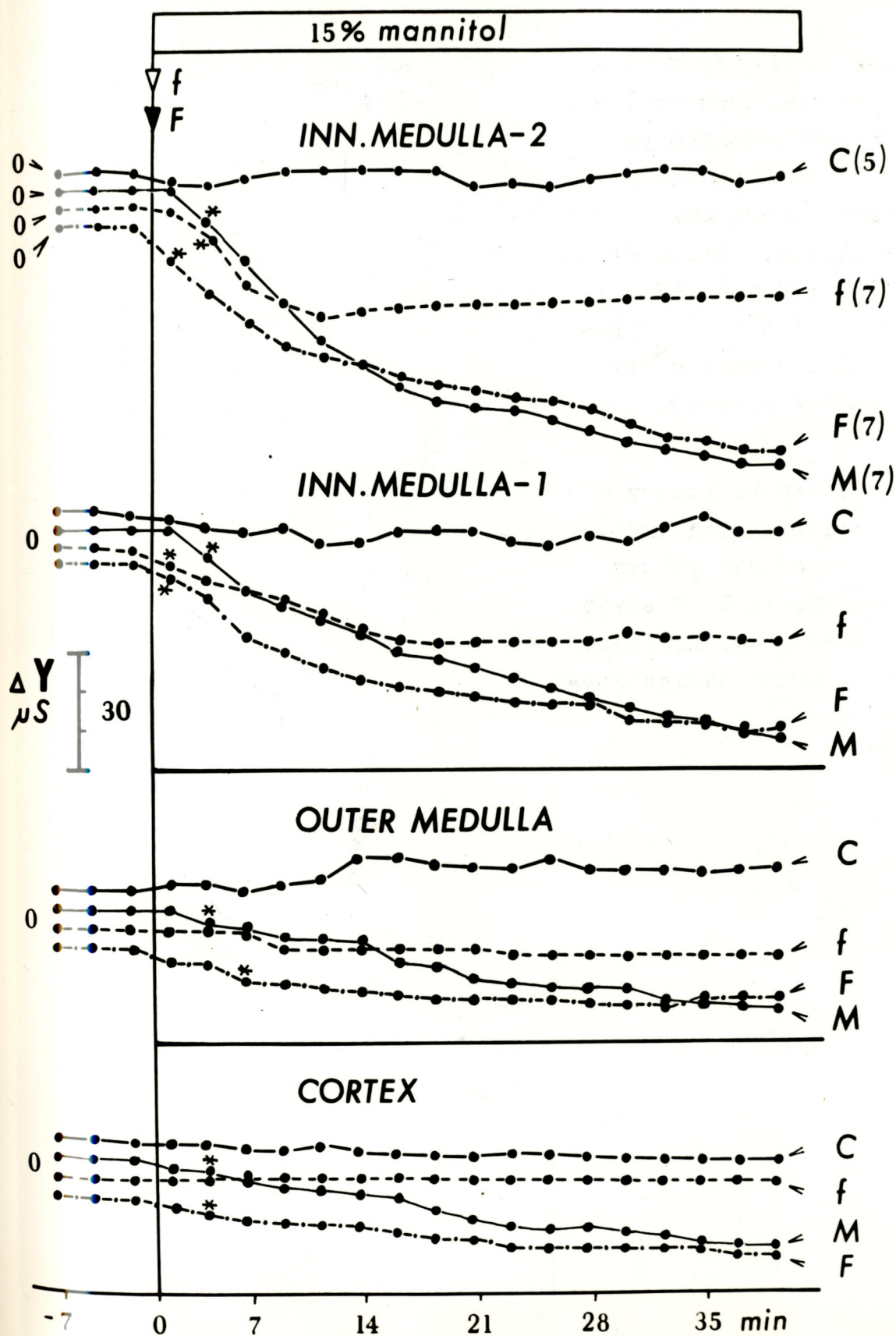
Rycina 5 - przedstawiająca zmiany admitancji tkanki nerkowej bezpośrednio po wkluciu elektrod w nerkę, a następnie po wstrzyknięciu 1,5 mg/kg furosemidu i infuzji soli hipertonicznej - jest dokładnym przeniesieniem zapisu wyników pojedynczego doświadczenia. Bezpośrednio po wkluciu elektrod obserwowano zwykle raptowny spadek admitancji tkanki nerkowej i dopiero po paru minutach, gdy doszło do stabilizacji, można było przystąpić do właściwego doświadczenia. Wstrzyknięcie dożylnie furosemidu znajdowało prawie natychmiastowe odbicie w zapisie admitancji czterech badanych warstw tkanki nerkowej. Po fazie stopniowego spadku admitancja osiągała wartość minimalną i ustalała się na nowym poziomie. W przedstawionym doświadczeniu rozpoczęto wówczas dożylną infuzję 3% roztworu NaCl i już po chwili można było obserwować stopniowe narastanie admitancji kory, rdzenia zewnętrznego, rdzenia wewnętrznego i okolicy brodawki rdzenia wewnętrznego nerki.



Ryc.5. Zmiany admitancji /Y/ w czterech warstwach tkanki nerkowej królika: korze /Cx/, rdzeniu zewnętrznym /O.M./, rdzeniu wewnętrznym /I.M./ i okolicy brodawki rdzenia wewnętrznego /P./ bezpośrednio po wkluciu elektrod, po dożylnym wstrzyknięciu 1,5 mg/kg furosemidu - F i w czasie dożylnnej infuzji 3% roztworu NaCl.
Zapis pojedynczego doświadczenia.

Należy zaznaczyć, że wykres na ryc.5 przedstawia tylko jeden z zastosowanych wariantów doświadczenia.

Rycina 6 przedstawia średnie wartości zmian admitancji zewnętrznych badanych warstw tkanki nerkowej po wstrzyknięciu furosemidu /1,5 mg/kg lub 3,0 mg/kg/ lub w czasie trwania infuzji 15% roztworu mannitolu, a także zmiany admitancji w doświadczeniach kontrolnych, czyli u zwierząt "nieleczonych". Dokładne dane i analiza statystyczna, stanowiące uzupełnienie do ryc.6, podane zostały w tabelach I a,b,c,d. Wyniki doświadczeń kontrolnych wykazały, że w czasie odpowiadającym czasowi trwania właściwego doświadczenia nie zachodziły żadne istotne zmiany admitancji tkanki nerkowej. Po upływie 2-5 minut od wstrzyknięcia furosemidu /1,5 mg/kg lub 3,0 mg/kg/ lub rozpoczęcia infuzji 15% roztworu mannitolu obserwowano znamienne statystycznie spadki admitancji rdzenia wewnętrznego i okolicy brodawki rdzenia wewnętrznego nerki. We wszystkich trzech grupach doświadczalnych tempo tego spadku było największe w ciągu pierwszych 15 minut, po czym w grupie mannitolowej i w grupie, której wstrzyknięto 3,0 mg/kg furosemidu admitancja obniżała się nadal, choć już nieco wolniej. U zwierząt, którym wstrzyknięto 1,5 mg/kg furosemidu nie następowało dalsze obniżenie admitancji rdzenia wewnętrznego, a nawet można było zaobserwować pewną tendencję do jej podwyższenia. Rdzeń zewnętrzny i kora nerkowa reagowały istotnymi statystycznie i równomiernie rozłożonymi w czasie zmianami admitancji na wstrzyknięcie 3,0 mg/kg furosemidu i na infuzję 15% roztworu mannitolu, podczas gdy wstrzyknięcie mniejszej dawki furosemidu



Ryc.6. Zmiany admitancji ΔY w czterech warstwach tkanki nerkowej królika: korze /cortex/, rdzeniu zewnętrznym /outer medulla/, rdzeniu wewnętrznym /inn.medulla-1/, okolicy brodawki rdzenia wewnętrznego /inn.medulla-2/ w doświadczeniach kontrolnych /C/, po wstrzyknięciu dożylnym 1,5 mg/kg furosemidu /f/, 3,0 mg/kg furosemidu /F/ lub w czasie infuzji 15% roztworu mannitolu /M/.

Liczebność grup w nawiasach. Punkty przedstawiają wartości średniej arytmetycznej. Gwiazdki oznaczają punkty począwszy od których wartości ΔY stają się znacząco różne od zera. Dokładne dane i analizę statystyczną zamieszczono w tabeli Ia, b, c, d.

TABELA Ib

Zmiany admittancji μS rdzenia wewnętrznego nerki królika
w następstwie działania
1,5 mg/kg furosemidu /F/, 3,0 mg/kg furosemidu /P/ i 15% roztworu mannitolu /M/

Wartości średnie \pm błąd standardowy
Objaśnienia symboli przy tabeli Ia

Grupa	Kontrola	Czas po podaniu środka diuretycznego /min/																
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34
F /7/	372,9 $\pm 17,1$	370,0 $\pm 16,9$	366,4 $\pm 16,5$	363,4 $\pm 16,3$	358,7 $\pm 16,8$	356,3 $\pm 16,4$	352,2 $\pm 15,8$	349,8 $\pm 15,2$	349,2 $\pm 15,4$	349,8 $\pm 15,9$	349,8 $\pm 15,9$	349,8 $\pm 15,9$	349,8 $\pm 15,9$	352,2 $\pm 18,1$	351,0 $\pm 18,3$	351,0 $\pm 18,3$	350,4 $\pm 18,7$	350,4 $\pm 18,7$
p		<0,05	<0,02	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
P /7/	376,5 $\pm 25,7$	372,3 $\pm 25,3$	366,4 $\pm 24,6$	357,0 $\pm 22,9$	352,8 $\pm 23,4$	349,2 $\pm 22,3$	346,3 $\pm 23,0$	343,9 $\pm 22,8$	342,7 $\pm 23,0$	341,5 $\pm 22,3$	340,3 $\pm 23,7$	340,3 $\pm 23,7$	340,3 $\pm 23,7$	335,0 $\pm 26,2$	335,0 $\pm 27,6$	335,0 $\pm 27,6$	332,6 $\pm 29,1$	332,6 $\pm 29,1$
p		<0,02	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
M /7/	406,7 $\pm 18,5$	406,7 $\pm 18,5$	399,6 $\pm 18,4$	391,3 $\pm 17,0$	387,2 $\pm 16,4$	383,6 $\pm 16,1$	380,0 $\pm 14,8$	374,7 $\pm 16,3$	374,1 $\pm 15,3$	371,7 $\pm 17,6$	369,4 $\pm 17,6$	367,0 $\pm 17,7$	364,0 $\pm 17,5$	362,3 $\pm 17,7$	359,3 $\pm 18,3$	358,1 $\pm 18,7$	356,3 $\pm 18,8$	353,9 $\pm 19,4$
p		NS	<0,01	<0,05	<0,02	<0,02	<0,02	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

TABELA Ia

Zmiany admittancji μS rdzenia wewnętrznego /okolicy brodawki/ nerki królika
w następstwie działania: 1,5 ng/kg furosemidu /I/, 3,0 ng/kg furosemidu /P/
i 15% roztworu mannitolu /M/

Wartości średnie \pm błąd standardowy

p - poziom istotności różnicy w stosunku do wartości kontrolnej

NS - brak istotnej różnicy w stosunku do wartości kontrolnej

Liczoność grup w nawiasach

Grupa	Kontrola	Czas po podaniu środka diuretycznego /min/																	
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	
I /1/	460,7 $\pm 18,1$	458,9 $\pm 18,2$	452,4 $\pm 17,0$	440,0 $\pm 18,9$	435,8 $\pm 18,1$	432,2 $\pm 18,3$	434,0 $\pm 17,4$	434,0 $\pm 17,4$	434,6 $\pm 16,4$	434,6 $\pm 16,5$	434,6 $\pm 16,6$	435,8 $\pm 17,3$	436,4 $\pm 17,0$	437,0 $\pm 16,8$	437,0 $\pm 16,6$	437,0 $\pm 16,5$	437,0 $\pm 16,5$	437,0 $\pm 16,7$	
p		NS	< 0,05	= 0,05	< 0,05	< 0,02	< 0,05	< 0,05	= 0,05	= 0,05	= 0,05	= 0,05	= 0,05	= 0,05	= 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
P /1/	467,8 $\pm 22,0$	460,1 $\pm 21,6$	450,6 $\pm 22,0$	443,5 $\pm 21,4$	437,0 $\pm 22,5$	434,6 $\pm 21,0$	432,2 $\pm 21,8$	429,3 $\pm 20,9$	427,0 $\pm 21,7$	426,3 $\pm 21,1$	423,3 $\pm 21,7$	423,3 $\pm 21,7$	420,9 $\pm 23,0$	416,8 $\pm 24,0$	413,8 $\pm 24,7$	412,6 $\pm 24,9$	410,3 $\pm 26,3$	410,3 $\pm 26,9$	
p		< 0,05	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	
M /1/	474,9 $\pm 12,7$	474,9 $\pm 12,7$	467,2 $\pm 11,7$	456,5 $\pm 10,1$	444,7 $\pm 10,2$	435,2 $\pm 10,9$	429,8 $\pm 11,6$	423,9 $\pm 12,0$	420,9 $\pm 12,3$	418,6 $\pm 12,4$	418,6 $\pm 12,4$	416,2 $\pm 12,5$	413,2 $\pm 12,5$	409,7 $\pm 12,4$	407,9 $\pm 12,5$	406,7 $\pm 12,4$	404,4 $\pm 12,7$	404,4 $\pm 12,7$	
p		NS	< 0,02	< 0,02	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	

TABELA Ic

Zmiany admittancji μS / rdzenia zewnętrznego nerki królika
w następstwie działania:

1,5 mg/kg furosemidu /f/, 3,0 mg/kg furosemidu /F/ i 15% roztworu mannitolu /M/

Wartości średnie \pm błąd standardowy
Objaśnienia symboli przy tabeli Ia

Grupa	Kontrola	Czas po podaniu środka diuretycznego /min/																
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34
f /f/	231,2 $\pm 20,9$	231,2 $\pm 20,6$	231,2 $\pm 20,6$	231,2 $\pm 20,6$	227,1 $\pm 19,5$	227,1 $\pm 19,5$	227,1 $\pm 19,5$	227,1 $\pm 19,5$	227,1 $\pm 19,5$	227,1 $\pm 19,5$	225,9 $\pm 22,2$	225,9 $\pm 22,2$	225,9 $\pm 22,2$	225,9 $\pm 22,2$	225,9 $\pm 22,2$	225,9 $\pm 22,2$	225,9 $\pm 22,2$	225,9 $\pm 22,2$
P		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
F /F/	209,9 $\pm 20,4$	206,9 $\pm 20,9$	206,9 $\pm 20,9$	202,2 $\pm 20,8$	202,2 $\pm 20,8$	200,4 $\pm 21,0$	200,4 $\pm 21,0$	199,2 $\pm 21,3$	198,0 $\pm 20,9$	198,0 $\pm 20,9$	198,0 $\pm 20,9$	198,0 $\pm 20,9$	197,4 $\pm 21,2$	197,4 $\pm 21,8$	197,4 $\pm 21,8$	198,0 $\pm 23,2$	198,0 $\pm 23,2$	198,0 $\pm 23,2$
P		NS	NS	< 0,05	< 0,05	< 0,02	< 0,05	< 0,02	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,02	< 0,05	< 0,05
M /M/	236,6 $\pm 10,2$	236,6 $\pm 10,2$	233,0 $\pm 10,2$	230,6 $\pm 11,3$	229,4 $\pm 10,8$	229,4 $\pm 10,8$	229,4 $\pm 10,8$	222,9 $\pm 11,2$	222,9 $\pm 11,2$	219,4 $\pm 11,1$	218,2 $\pm 11,4$	217,0 $\pm 11,8$	217,0 $\pm 11,8$	217,0 $\pm 11,8$	213,4 $\pm 12,0$	213,4 $\pm 12,0$	211,7 $\pm 12,0$	211,7 $\pm 12,0$
P		NS	< 0,02	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

TABELA Ia

Zmiany admittancji μS / kory nerkowej królika
w następstwie działania:
1,5 mg/kg furosemidu /F/, 3,0 mg/kg furosemidu /F/ i 15% roztworu mannitolu /M/

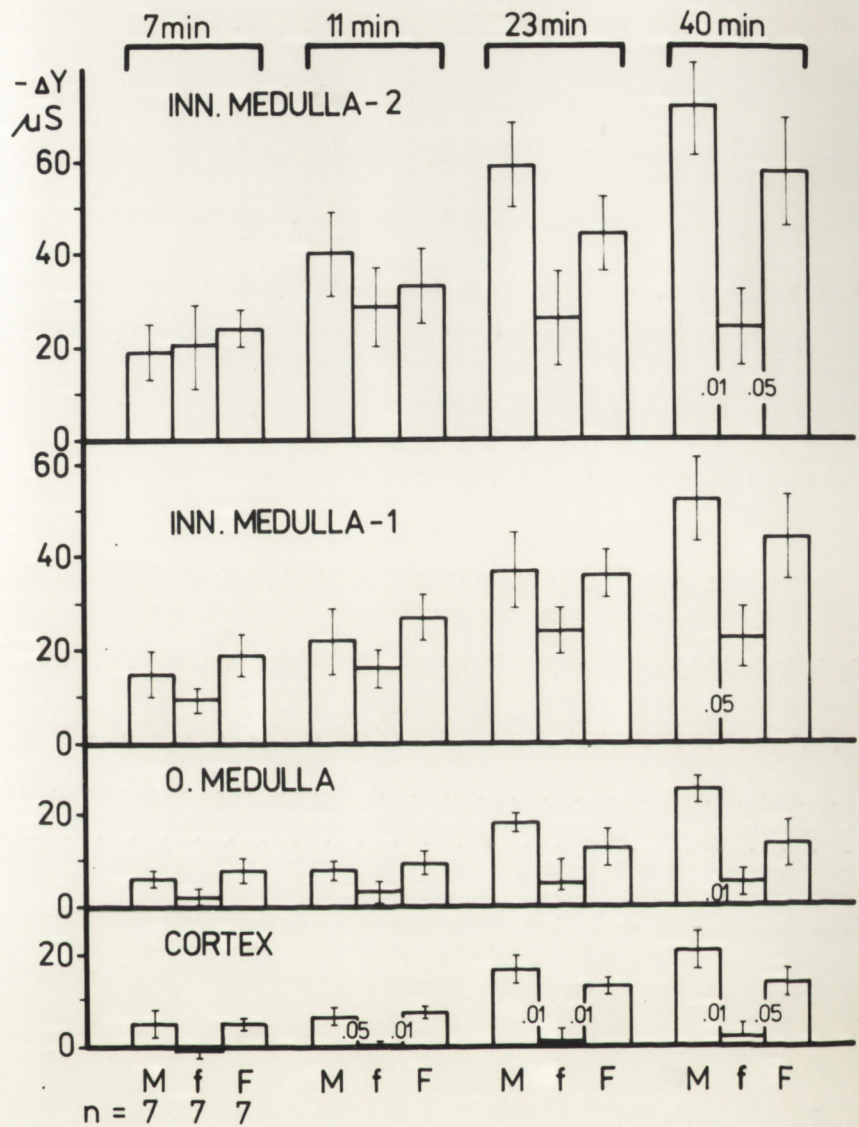
Wartości średnie \pm błąd standardowy
Objaśnienia symboli przy tabeli Ia

Grupa	Kontrola	Czas po podaniu śródka diuretycznego /min/																
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34
F /F/	82,4 $\pm 15,1$	82,4 $\pm 15,1$	83,0 $\pm 14,1$	83,0 $\pm 14,8$	83,0 $\pm 14,8$	83,0 $\pm 14,8$	83,0 $\pm 14,8$	83,0 $\pm 14,8$	83,0 $\pm 14,8$	83,0 $\pm 14,8$	83,0 $\pm 17,3$	83,0 $\pm 17,3$	83,0 $\pm 17,3$	83,0 $\pm 17,3$	83,0 $\pm 17,3$	83,0 $\pm 17,3$	83,0 $\pm 17,3$	83,0 $\pm 17,3$
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
F /F/	112,1 $\pm 13,3$	110,3 $\pm 12,1$	108,5 $\pm 13,0$	107,3 $\pm 12,5$	106,1 $\pm 12,9$	106,1 $\pm 12,9$	105,6 $\pm 12,2$	103,8 $\pm 16,7$	102,6 $\pm 12,3$	102,6 $\pm 12,3$	99,6 $\pm 13,8$	99,6 $\pm 13,8$	99,6 $\pm 13,8$	99,6 $\pm 13,8$	99,6 $\pm 13,8$	99,6 $\pm 13,9$	98,4 $\pm 14,1$	98,4 $\pm 14,1$
P		NS	< 0,01	< 0,02	< 0,01	< 0,01	< 0,02	< 0,02	< 0,01	< 0,01	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
M /F/	90,1 $\pm 9,8$	87,8 $\pm 10,2$	87,2 $\pm 9,7$	84,8 $\pm 10,3$	83,0 $\pm 10,5$	83,0 $\pm 10,5$	80,7 $\pm 10,3$	80,7 $\pm 10,3$	77,1 $\pm 10,2$	74,7 $\pm 10,8$	72,9 $\pm 10,9$	73,2 $\pm 10,2$	73,5 $\pm 10,2$	72,3 $\pm 10,3$	71,2 $\pm 10,2$	68,8 $\pm 10,0$	68,8 $\pm 10,0$	68,8 $\pm 10,0$
P		NS	< 0,05	< 0,05	< 0,02	< 0,05	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

/1,5 mg/kg/ nie wywoływało żadnych widocznych zmian.

Na podstawie danych z ryc.6 nie jest możliwe ściśle ilościowe porównanie zmian admitancji tkanki nerkowej zwierząt z trzech grup doświadczalnych. Można tu jednak zauważyć istnienie podobieństwa przebiegu krzywych charakteryzujących dwie grupy: mannitolową i grupę, której wstrzyknięto większą dawkę furosemidu /3,0 mg/kg/.

Rycina 7 przedstawia w inny sposób zilustrowane już na ryc.6 zmiany admitancji tkanki nerkowej zwierząt z trzech grup doświadczalnych. Pokazano tu spadki Y w stosunku do wartości wyjściowej Y_0 po upływie 7, 11, 23 i 40 minut od wstrzyknięcia furosemidu lub początku infuzji mannitolu. Punkty czasowe wybrano do obliczeń w sposób nieprzypadkowy. Zgodnie z danymi przedstawionymi na ryc.6 już po upływie 7 minut zaznaczało się zmniejszenie admitancji we wszystkich badanych warstwach tkanki nerkowej zwierząt z trzech grup doświadczalnych, analizując admitancję w 11 i 23 minucie można było lepiej ocenić dynamikę zmian, zaś w 40 minucie kończono doświadczenie. Ryc.7 ujawnia, jak to już sugerowano wcześniej, istnienie podobieństwa zmian admitancji tkanki nerkowej w dwóch grupach zwierząt: mannitolowej i w grupie, której wstrzyknięto 3,0 mg/kg furosemidu. Podobieństwo to zaznaczyło się we wszystkich czterech warstwach tkanki nerkowej już po upływie 7 minut i utrzymywało się do końca trwania doświadczenia /40 minuta/. Natomiast wstrzyknięcie mniejszej dawki furosemidu nie powodowało zmian admitancji kory i rdzenia zewnętrznego /por. też ryc.6/ - co znamienne odróżniało tę grupę doświadczalną od dwóch pozostałych. Także dla pozost-



Ryc.7. Zmiany admitancji $-\Delta Y$ w czterech warstwach tkanki nerkowej królika: korze /cortex/, rdzeniu zewnętrznym /outer medulla/, rdzeniu wewnętrznym /inner medulla-1/, okolicy brodawki rdzenia wewnętrznego /inner medulla-2/ po upływie 7, 11, 23 i 40 minut od wstrzyknięcia 1,5 mg/kg furosemidu /f/, 3,0 mg/kg furosemidu /F/ lub rozpoczęcia infuzji 15% roztworu mannitolu /M/.

Przedstawiono wartości średniej arytmetycznej i błęd standardowego, oraz zaznaczono poziomy istotności różnic między grupami doświadczalnymi.

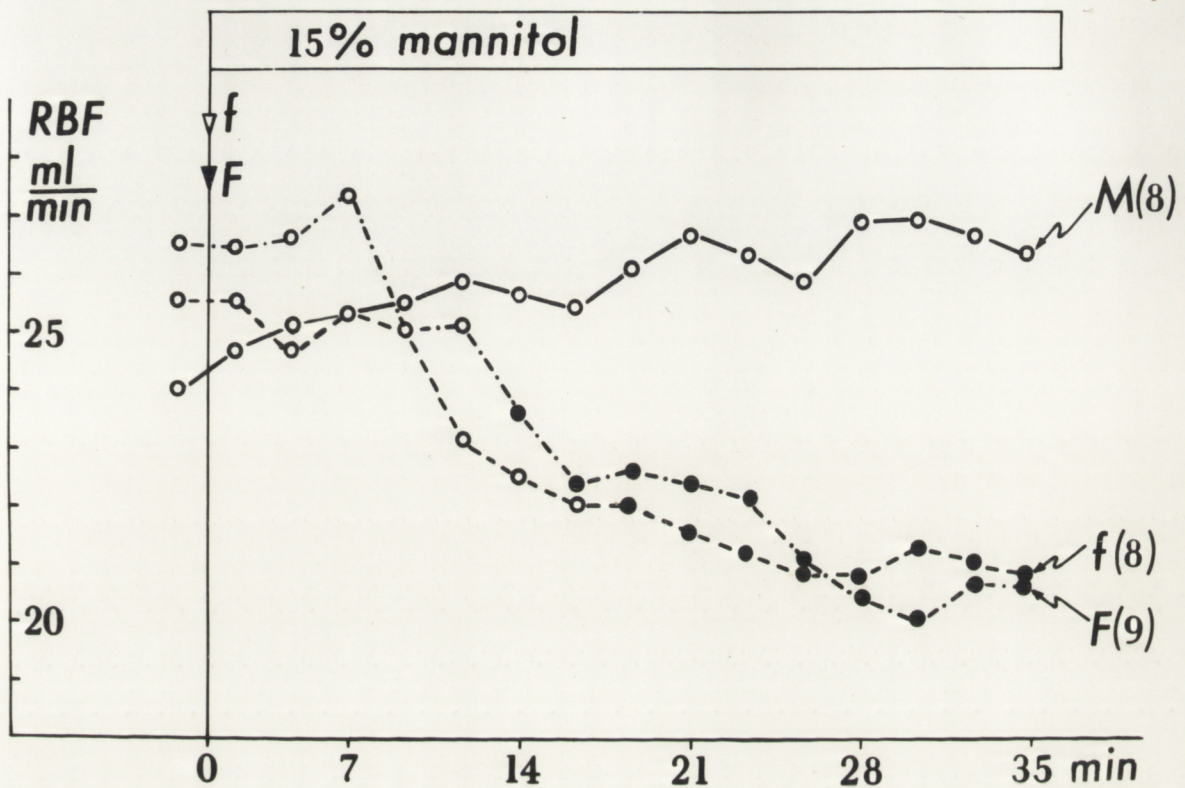
stałych warstw tkanki obniżenie admitancji po małej dawce furosemidu było pod koniec doświadczenia znamienne mniejsze od odpowiedniej reakcji na mannitol a także na dużą dawkę furosemidu /okolica brodawki rdzenia wewnętrznego/.

4.2. Przepływ krwi przez nerkę i ciśnienie tętnicze krwi

W czasie doświadczeń równoległe z rejestracją admitancji tkanki nerkowej prowadzono pomiary przepływu krwi przez doświadczalną nerkę /RBF/ i ciśnienia krwi^w tętnicy szyjnej wspólnej królika.

Zmiany przepływu krwi przedstawiono graficznie na ryc.8, a szczegółową dokumentację i analizę statystyczną zebrano w tabeli II. Wstrzyknięcie zwierzętom furosemidu powodowało wyraźne /ok. 20%/ obniżenie przepływu krwi przez nerkę. W zależności od zastosowanej dawki spadek ten był znamienny już po 14 minutach /3,0 mg/kg/ lub po 18 minutach /1,5 mg na kg/ od wstrzyknięcia. Inna była reakcja na infuzję 15% roztworu mannitolu: przepływ krwi przez nerkę przejawiał tendencję do wzrostu, wykazując jednak znaczne wahania. Na ryc.8 i w tabeli II dla większej jasności prezentacji nie zamieszczono danych z doświadczeń kontrolnych, podczas których przepływ nie zmieniał się.

Średnie ciśnienie krwi mierzone w tętnicy szyjnej wspólnej nie uległo istotnym zmianom przez cały czas trwania



Ryc.8. Zmiany przepływu krwi przez nerkę królika /RBF/ po wstrzyknięciu 1,5 mg/kg furosemidu /f/, 3,0 mg/kg furosemidu /F/ lub w czasie infuzji 15% roztworu mannitolu /M/.

Liczebność grup w nawiasach. Wartości średnie. Czarnymi punktami zaznaczono istotność różnicy w stosunku do wartości wyjściowej. Dokładniejsze dane i analizę statystyczną podano w tabeli II.

TABELA II

Zmiany przepływu krwi /ml/min/ przez nerkę królika
w następstwie działania:
1,5 mg/kg furosemidu /f/, 3,0 mg/kg furosemidu /F/ i 15% roztworu mannitolu /M/

Wartości średnie \pm błąd standardowy
p - poziom istotności różnicy w stosunku do wartości kontrolnej
NS - brak istotnej różnicy w stosunku do wartości kontrolnej
Liczebność grup w nawiasach

Grupa	Kontrola	Czas po podaniu środka diuretycznego /min/														
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
f /8/	25,5 \pm 2,3	25,6 \pm 2,2	24,6 \pm 2,0	25,3 \pm 2,3	25,0 \pm 1,8	23,1 \pm 1,5	22,5 \pm 1,3	22,0 \pm 1,3	21,9 \pm 1,2	21,6 \pm 1,2	21,2 \pm 1,2	20,8 \pm 1,1	20,8 \pm 1,3	21,3 \pm 1,3	21,1 \pm 1,4	20,8 \pm 1,4
p		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	<0,05	<0,05	<0,02	<0,02	<0,02	<0,05	<0,02	<0,05
F /9/	26,5 \pm 2,2	26,4 \pm 2,1	26,6 \pm 2,1	27,3 \pm 2,4	25,0 \pm 2,7	25,1 \pm 1,9	23,5 \pm 1,7	22,4 \pm 1,4	22,6 \pm 1,4	22,4 \pm 1,4	22,1 \pm 1,5	21,1 \pm 1,4	20,4 \pm 1,2	20,0 \pm 1,2	20,7 \pm 1,3	20,6 \pm 1,3
p		NS	NS	NS	NS	NS	<0,05	<0,02	<0,05	<0,02	<0,01	<0,01	<0,01	<0,001	<0,01	<0,01
M /8/	23,9 \pm 3,0	24,7 \pm 3,3	25,1 \pm 2,9	25,3 \pm 3,1	25,5 \pm 3,3	25,9 \pm 3,3	25,7 \pm 3,0	25,4 \pm 2,6	26,1 \pm 3,0	26,7 \pm 3,1	26,3 \pm 3,2	25,8 \pm 2,7	25,9 \pm 3,2	26,9 \pm 3,1	26,6 \pm 3,0	26,4 \pm 3,1
p		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

doświadczenia i wynosiło: u zwierząt kontrolnych $71,2 \pm SE/$
 $1,9$ mm Hg, u zwierząt w czasie infuzji mannitolu $74,1 \pm 1,6$ mm
Hg, u zwierząt po $1,5$ mg/kg furosemidu $80,4 \pm 0,9$ mm Hg i po
 $3,0$ mg/kg furosemidu $81,8 \pm 1,4$ mm Hg. Średnie wartości ciś-
nienia krwi dla wspomnianych grup doświadczalnych nie różniły
się znacząco między sobą.

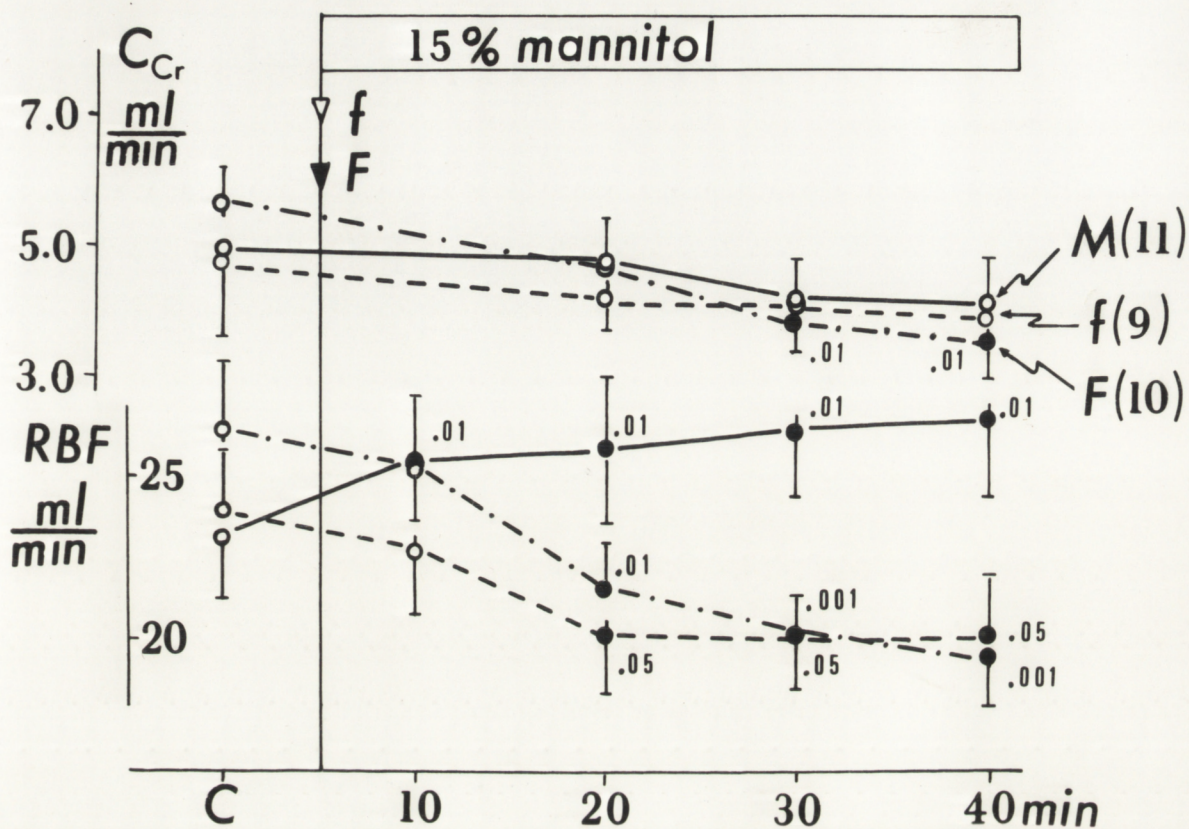
4.3. Wyniki badań klirensowych

Wyniki pomiarów admitancji tkanki nerkowej królika uzu-
pełniono danymi z przeprowadzonych równocześnie badań kliren-
sowych /ryc.9,10,11/.

4.3.1. Wskaźniki hemodynamiczne

Rycina 9 przedstawia zmiany parametrów opisujących hemo-
dynamikę nerki: filtracji kłębkowej /GFR/ mierzonej jako
klirens kreatyniny egzogennej / C_{cr} / i bezpośrednio mierzone-
go przepływu krwi przez nerkę /RBF/.

Wykres zmian przepływu krwi narysowano na podstawie tych
samych danych, które przedstawiono na ryc.8 i w tabeli II;
pokazuje on średnie wartości przepływu w kolejnych 10-minu-
towych okresach klirensowych. Zgodnie z tym, co zostało napi-
sane podczas omawiania ryc.8, furosemid znacząco obniżał
przepływ krwi przez nerkę, mannitol zaś wywierał działanie
przeciwnie. Wzrost RBF podczas infuzji mannitolu, jak zasn-



Ryc.9. Filtracja kłębkowa C_{Cr} - klirens kreatyniny egzogennej/ i przepływ krwi przez nerkę królika /RBF/ mierzone przed i po wstrzyknięciu 1,5 mg/kg furosemidu /f/, 3,0 mg/kg furosemidu /F/ lub podaniu infuzji 15% roztworu mannitolu /M/.

Liczebność grup w nawiasach. Wartości średnie \pm błąd standardowy. Czarne punkty i towarzyszące im cyfry oznaczają poziomy istotności różnic w stosunku do wartości kontrolnych /C/.

ozono na ryc.9, był znamieny statystycznie już po pierwszych 10 minutach. Jak pamiętamy /ryc.8, tabela II/ analiza statystyczna pełnego przebiegu zmian przepływu krwi przez nerkę w czasie infuzji mannitolu dała odpowiedź negatywną. Śledząc uważnie przebieg krzywej RBF /ryc.8/ zauważyliśmy, że na tle postępującego niewielkiego wzrostu przepływu zaznaczyły się krótkotrwałe okresy jego spadku. Zostało to niewątpliwie wykryte i uwzględnione przez naszą analizę wariancji i w ten sposób tendencja do wzrostu RBF oceniona została jako nieznamienna. Natomiast analiza wyników "uśrednionych" dla kolejnych 10-minutowych okresów klirensowych /ryc.9/ dotyczyła już "wygładzonej" krzywej RBF; przejściowe spadki przepływu stały się niewidoczne, a wzrost RBF uznany został za istotny.

Jest rzeczą ogólnie znaną, że analiza statystyczna zmian dowolnego wskaźnika w czasie daje odpowiedź bliższą prawdzie jeśli liczba danych jest większa. Dlatego też należałoby przyjąć za właściwy wynik analizy statystycznej pełnego a nie "uśrednionego" przebiegu zmian przepływu krwi przez nerkę i uznać jego wzrost za nieistotny. Należy jednak przypomnieć /por. pkt.3.3/, że mierzony przepływ krwi przez nerkę w warunkach zwiększonej diurezy ma wartość zaniżoną. Możliwe jest więc, że rzeczywisty wzrost przepływu krwi w czasie infuzji mannitolu był istotny, a jego spadek po wstrzyknięciu furosemidu mniejszy niż wykazał to pomiar.

Przepływ krwi przez nerkę przeliczano również na gram tkanki nerkowej. Dane te nie mogły jednak wnieść nowych, znaczących informacji o przepływie; można się było spodziewać, że w czasie doświadczeń ciężar nerek ulegał zmianom,

czego nie można było uwzględnić ponieważ ważenie przeprowadzane tylko raz, po zakończeniu doświadczenia.

Druga zmienna charakteryzująca hemodynamikę nerki - filtracja kłębkowa /GFR/ - nie ulegała modyfikacji po wstrzyknięciu 1,5 mg/kg furosemidu, w czasie infuzji 15% roztworu mannitolu, jak również w doświadczeniach kontrolnych. Natomiast wstrzyknięcie 3,0 mg/kg furosemidu obniżało znacznie GFR, lecz dopiero po upływie 30 minut /ryc.9/. Jak wiadomo, pomiar klirensu jest wiarygodny tylko w warunkach zachowania równowagi /"steady state"/ między dopływem i eliminacją badanej substancji przez nerkę, a warunek ten nie jest spełniony, gdy zmienia się diureza. To samo odnosi się do C_{cr} jako miary GFR i dlatego na ryc.9 nie podano wartości klirensu kreatyniny dla pierwszego okresu doświadczenia.

Kolejnym wskaźnikiem przydatnym dla oceny hemodynamiki nerki był w tych doświadczeniach współczynnik ekstrakcji PAH / E_{PAH} /, będący pewnym miernikiem zmian rozdziału przepływu krwi wewnątrz nerki. Wartości E_{PAH} zostały zamieszczone w tabeli III. Już pierwszy rzut oka na wyniki pozwala stwierdzić, że współczynnik ekstrakcji PAH nie zmieniał się w czasie trwania doświadczeń, co w pełni potwierdziła analiza statystyczna. Wartości E_{PAH} dla osterech grup zwierząt również między sobą nie różniły się znacznie.

TABELA III

Współczynnik ekstrakcji PAH / E_{PAH} /
 w doświadczeniach kontrolnych
 oraz przed i po wstrzyknięciu furosemidu /2 dawki/
 lub infuzji 15% roztworu mannitolu
 Wartości średnie \pm błąd standardowy

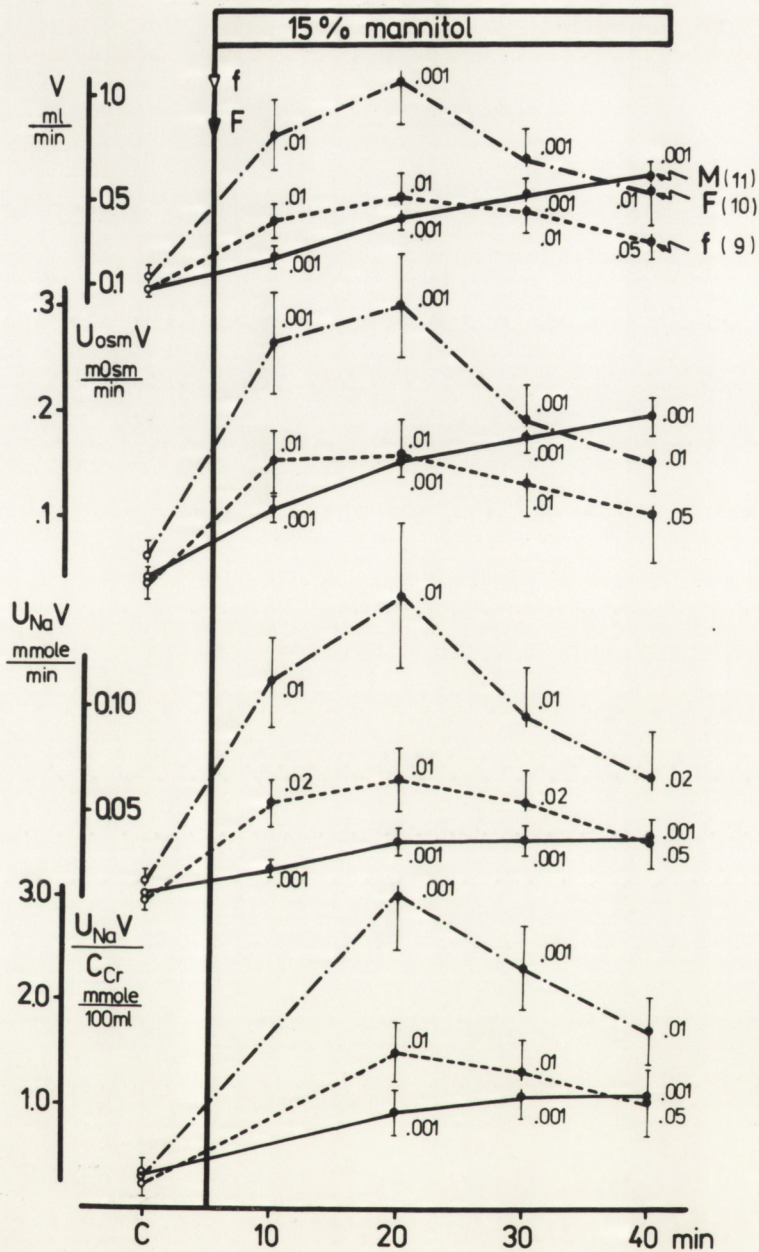
Kontrola Furosemid - 1,5 mg/kg	0,89 \pm 0,02 0,90 \pm 0,02	n = 7
Kontrola Furosemid - 3,0 mg/kg	0,91 \pm 0,01 0,91 \pm 0,02	n = 6
Kontrola Infuzja 15% roztworu mannitolu	0,82 \pm 0,05 0,84 \pm 0,05	n = 5
Kontrola Bez substancji diuretycznych	0,90 \pm 0,01 0,88 \pm 0,02	n = 4

4.3.2. Charakterystyka funkcji wydalniczej nerki

Rycina 10 przedstawia zmienne charakteryzujące reakcję wydalniczą nerki: diurezę minutową V , wydalanie substancji osmotycznie czynnych $U_{osm}V$, wydalanie jonu sodowego $U_{Na}V$ i wydalanie jonu sodowego przeliczone na 100 ml przesączu kłębkowego $\frac{U_{Na}V}{C_{cr}}$. Na wykresie ostatniego ze wspomnianych wskaźników zabrakło danych dla pierwszego 10-minutowego okresu doświadczalnego w związku z opisanymi wcześniej trudnościami zmierzenia GFR w czasie szybkiego wzrostu diurezy. Zmiany $\frac{U_{Na}V}{C_{cr}}$ przebiegały niemal równoległe do zmian $U_{Na}V$ ponieważ filtracja kłębkowa prawie nie ulegała zmianom w czasie trwania doświadczenia /ryc.9/.

W ciągu pierwszych 20 minut po wstrzyknięciu furosemidu /1,5 mg/kg lub 3,0 mg/kg/ obserwowano narastanie diurezy, wydalania substancji osmotycznie czynnych i wydalania jonu sodowego. Wartości tych zmiennych obniżały się następnie, ale były znacznie wyższe od wartości kontrolnych jeszcze po 40 minutach od wstrzyknięcia furosemidu. Infuzja 15% roztworu mannitolu spowodowała nasilającą się w czasie diurezę oraz wzrost wydalania substancji osmotycznie czynnych i jonu sodowego. Wszystkie te zmiany były istotne statystycznie.

W czasie doświadczeń z 15% mannitolem starano się tak manipulować szybkością infuzji aby uzyskać diurezę porównywalną z diurezą uzyskiwaną po małej dawce furosemidu. Chociaż nie można było na bieżąco kontrolować wydalania substancji



Ryc.10. Reakcja wydalinicza nerki królika na wstrzyknięcie 1,5 mg/kg furosemidu /f/, 3,0 mg/kg furosemidu /F/ lub infuzję 15% roztworu mannitolu /M/.

Liczebność grup w nawiasach. Wartości średnie \pm błąd standardowy. Zaznaczono /czarne punkty/ poziomy istotności różnic w stosunku do wartości kontrolnych /C/.

TABELA IV

Poziomy istotności dla różnic przyrostów zmiennych
charakteryzujących funkcję wydalniczą nerki.

Dane dla trzech grup doświadczalnych - po 10, 20, 30 i 40 minutach
od wstrzyknięcia 1,5 mg/kg furosemidu /f/, 3,0 mg/kg furosemidu /F/
lub od rozpoczęcia infuzji 15% roztworu mannitolu /M/

Liczebność grup podano na ryc.10

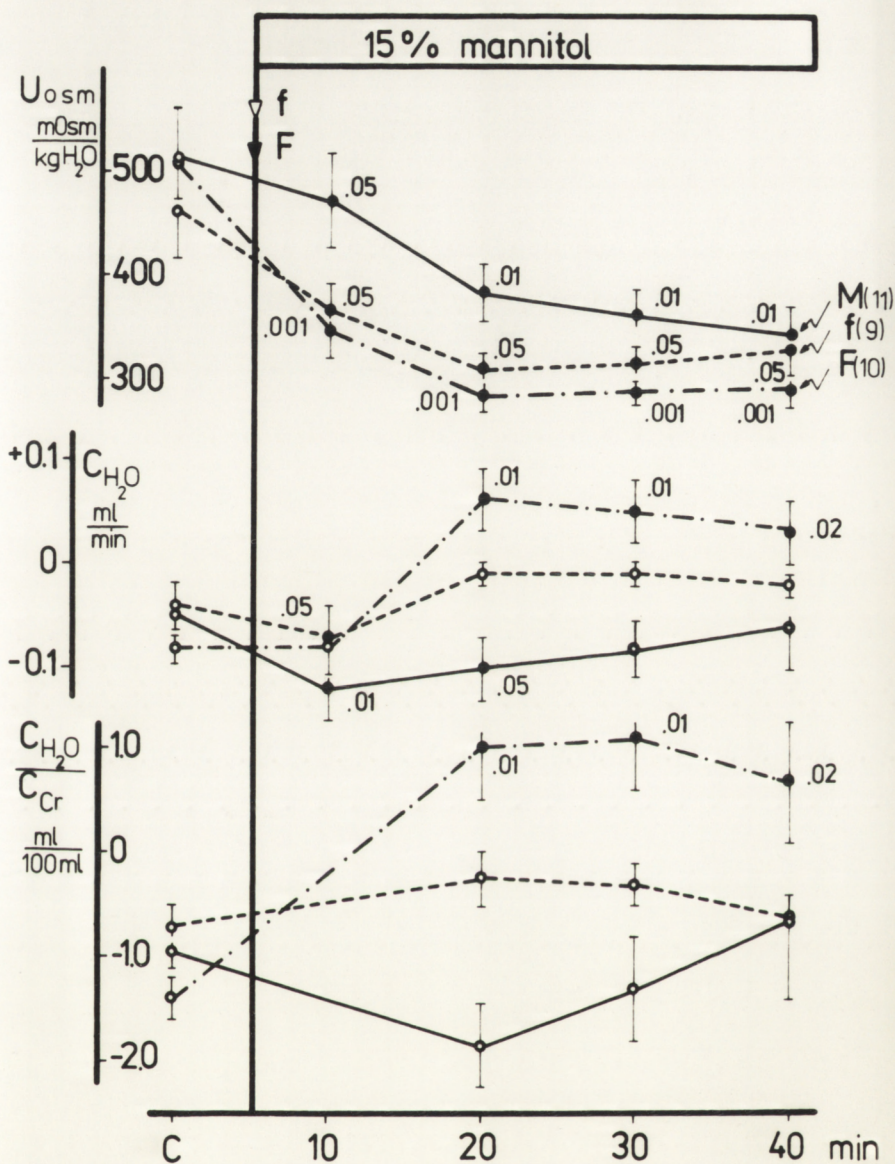
NS - brak istotności

Zmienna	Porównywane grupy doświadczalne	Czas po podaniu środka diuretycznego /min/			
		10	20	30	40
ΔV	M ↔ f	NS	NS	NS	NS
	M ↔ F	p < 0,01	p < 0,01	NS	NS
	f ↔ F	p < 0,05	p < 0,02	NS	NS
$\Delta U_{osn} V$	M ↔ f	NS	NS	NS	NS
	M ↔ F	p < 0,01	p < 0,01	NS	NS
	f ↔ F	p < 0,05	p < 0,02	NS	NS
$\Delta U_{Na} V$	M ↔ f	NS	NS	NS	NS
	M ↔ F	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01
	f ↔ F	p < 0,05	p < 0,02	p < 0,02	p < 0,01
$\Delta \frac{U_{Na} V}{C_{cr}}$	M ↔ f	NS	NS	NS	NS
	M ↔ F	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,02
	f ↔ F	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,02	p < 0,02

osmotycznie czynnych i jonu sodowego przez nerkę, okazało się jednak, że regulowana infuzja mannitolu wywołała odpowiedź wydalniczą podobną do tej jaką uzyskano po wstrzyknięciu 1,5 mg/kg furosemidu. Potwierdziła to analiza statystyczna wyników polegająca na porównaniu przyrostów wartości mierzonych zmiennych w trzech grupach doświadczalnych po 10, 20, 30 i 40 minutach /tabela IV/. Wstrzyknięcie 3,0 mg/kg furosemidu wywołało znamienne większe zmiany wspomnianych wskaźników. W doświadczeniach kontrolnych nie obserwowano zmian V , $U_{osm} V$, $U_{Na} V$ lub $\frac{U_{Na} V}{C_{or}}$ w czasie.

4.3.3. Zagęszczenie moczu

Na rysinie 11 przedstawiono zmienne charakteryzujące zagęszczanie moczu przez nerkę: osmolalność moczu $/U_{osm}/$, klirens wolnej wody $/C_{H_2O}/$ i klirens wolnej wody przeliczonej na 100 ml przesączu kłębkowego $\frac{C_{H_2O}}{C_{or}}$. Wstrzyknięcie furosemidu /1,5 mg/kg lub 3,0 mg/kg/, jak również infuzja 15% roztworu mannitolu powodowały szybkie obniżenie osmolalności moczu. Efekt ten był znamienno statystycznie już po 10 minutach i utrzymywał się do końca doświadczenia. Po 20 minutach od wstrzyknięcia 1,5 mg/kg lub 3,0 mg/kg furosemidu mocz stał się izotoniczny z osoczem krwi, którego osmolalność wynosiła odpowiednio $300 \pm SE/3$ lub 299 ± 4 mOsm/kg H_2O . Natomiast po 40 minutach infuzji 15% roztworu mannitolu osmolalność moczu przewyższała nieznacznie osmolalność osocza wynoszącą w tej grupie 302 ± 3 mOsm/kg H_2O .



Ryc.11. Zmienne charakteryzujące zagęszczanie moczu u królika przed i po wstrzyknięciu 1,5 mg/kg furosemidu /f/, 3,0 mg/kg furosemidu /F/ lub podaniu infuzji 15% roztworu mannitolu /M/.

Liczebność grup w nawiasach. Wartości średnie \pm błąd standardowy. Zaznaczono /czarne punkty/ poziomy istotności różnic w stosunku do wartości kontrolnych /C/.

Klirens wolnej wody zmieniał się w sposób bardziej zróżnicowany. Po 20 minutach od wstrzyknięcia 3,0 mg/kg furosemidu można było zaobserwować istotny statystycznie wzrost C_{H_2O} i $\frac{C_{H_2O}}{C_{cr}}$, który utrzymywał się do końca doświadczenia. Wstrzyknięcie mniejszej dawki furosemidu nie dawało podobnego efektu; klirens wolnej wody i klirens wolnej wody w przeliczeniu na 100 ml przesączu kłębkowego utrzymywały się w tej grupie na niezmiennym poziomie, jeśli nie brać pod uwagę przejściowego lecz znamionego statystycznie spadku po 10 minutach $/C_{H_2O}/$. Także infuzja 15% roztworu mannitolu powodowała przejściowy spadek klirensu wolnej wody $/C_{H_2O}/$, który okazał się istotny po 10 i 20 minutach. U zwierząt kontrolnych nie obserwowano istotnych zmian U_{osm} , C_{H_2O} i $\frac{C_{H_2O}}{C_{cr}}$ w czasie. Zwraca uwagę duża zmienność klirensu wolnej wody u zwierząt w poszczególnych grupach doświadczalnych.

Należy tu podkreślić, że mierzone w tych doświadczeniach wskaźniki zagęszczenia moczu mają ograniczoną wartość, ponieważ nie zostały uzyskane w standardowych warunkach /np. maksymalnej lub minimalnej aktywności antydiuretycznej/; stanowią one raczej uzupełnienie wskaźników opisujących czynność wydalniczą.

W czasie trwania doświadczeń uzupełniano płyny tracone z krwią i z moczem. Mierzone w osoczu stężenia jonu sodowego $/P_{Na}/$ i substancji osmotycznie czynnych $/P_{osm}/$ utrzymywały się na niezmiennym poziomie u zwierząt ze wszystkich grup doświadczalnych. Wartości tych wskaźników zostały zestawione w tabeli V.

TABELA V

Stężenie substancji osmotycznie czynnych / P_{osm} / i jonu sodowego / P_{Na} /
w osoczu krwi królików z czterech grup doświadczalnych
Wartości średnie \pm błąd standardowy

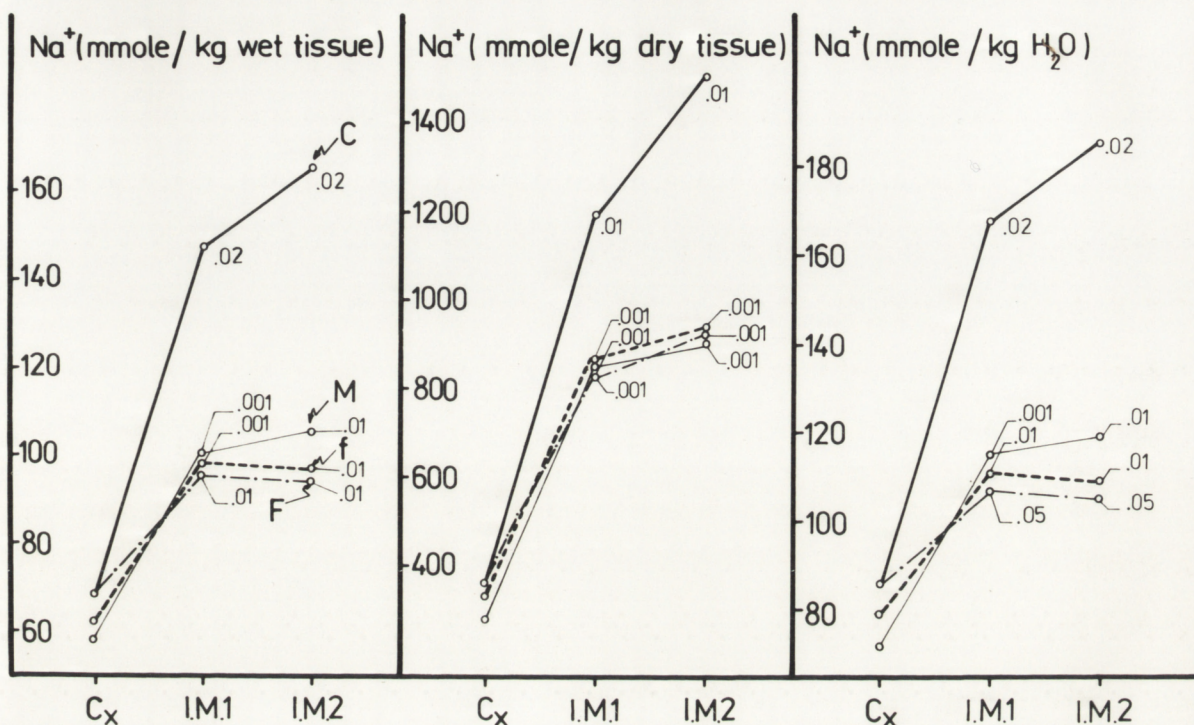
Grupa	Kontrola	Czas po podaniu środka diuretycznego /min/				
		10	20	30	40	
Kontrolna /n = 5/	P_{osm}	297 \pm 1	297 \pm 1	296 \pm 1	295 \pm 2	295 \pm 2
	P_{Na}	139 \pm 2	139 \pm 2	139 \pm 2	140 \pm 2	140 \pm 2
Furosemid, 1,5 mg/kg /n = 9/	P_{osm}	300 \pm 3	300 \pm 3	300 \pm 3	301 \pm 3	302 \pm 4
	P_{Na}	142 \pm 3	141 \pm 3	140 \pm 3	140 \pm 3	139 \pm 3
Furosemid, 3,0 mg/kg /n = 10/	P_{osm}	298 \pm 2	298 \pm 3	299 \pm 4	300 \pm 3	300 \pm 3
	P_{Na}	143 \pm 3	143 \pm 2	143 \pm 3	143 \pm 3	144 \pm 3
15% mannitol /n = 11/	P_{osm}	298 \pm 2	298 \pm 2	300 \pm 2	301 \pm 2	302 \pm 3
	P_{Na}	143 \pm 4	143 \pm 4	142 \pm 3	140 \pm 3	140 \pm 3

4.4. Badania skrawków tkanki nerkowej Korelacje z wartościami admitancji

Rycina 12 przedstawia stężenie jonu sodowego w trzech warstwach tkanki nerkowej: korze, rdzeniu wewnętrznym i okolicy brodawki rdzenia wewnętrznego przeliczone na kg mokrej tkanki, suchej tkanki i wody tkankowej. Badania przeprowadzono u zwierząt kontrolnych, u zwierząt po upływie 40 minut od wstrzyknięcia furosemidu /1,5 mg/kg lub 3,0 mg/kg/ i u zwierząt po trwającej 40 minut infuzji 15% roztworu mannitolu. Stężenie jonu sodowego w rdzeniu wewnętrznym nerki było dla wszystkich badanych zwierząt znacznie wyższe niż w korze nerkowej, bez względu na zastosowany sposób przeliczenia stężeń /na mokrą, suchą tkankę lub wodę tkankową/. W nerkach zwierząt kontrolnych obserwowano najbardziej stromy gradient stężeń jonu sodowego, podczas gdy w grupach doświadczalnych był on wyraźnie spłaszczony.

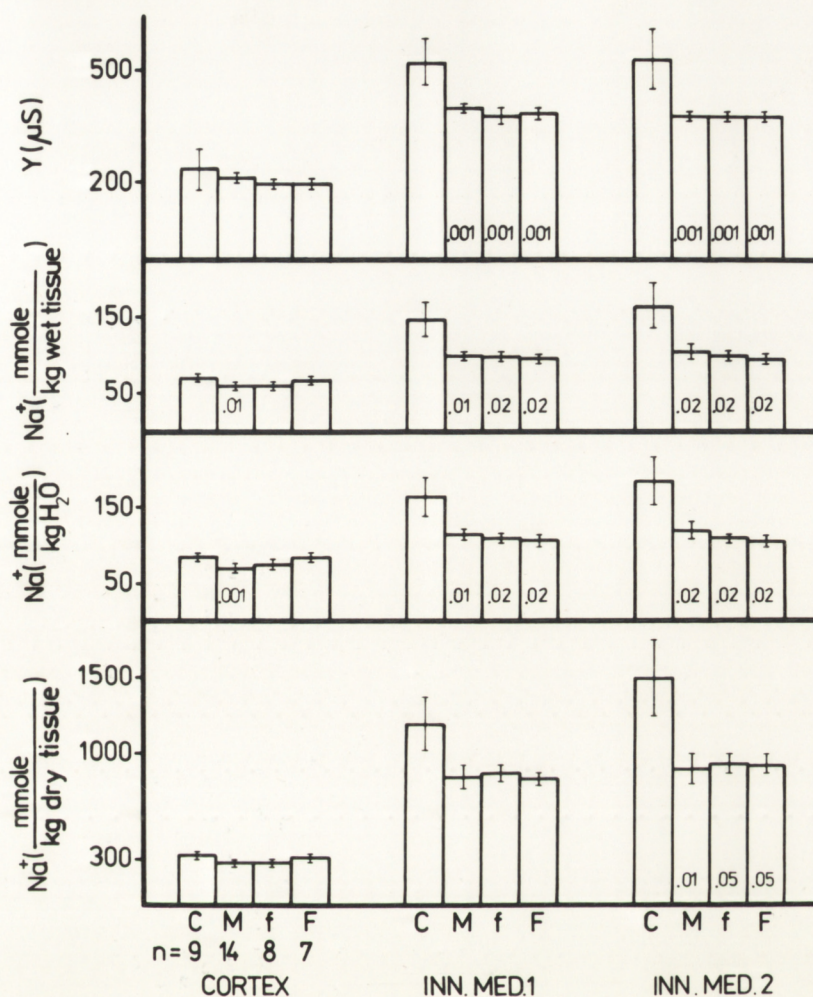
Podobną prawidłowość obserwowano w odniesieniu do stężenia wszystkich substancji osmotycznie czynnych w tkance nerkowej, co określono na podstawie pomiarów osmolalności. Danych tych nie przedstawiono na ryc.12, gdyż nie wniosły one żadnych istotnych informacji o gradiencie tkankowym ponad to, co zostało wcześniej opisane odnośnie jonu sodowego.

Na rycinie 13 porównano admitancję X i stężenie jonu sodowego w tkance nerkowej zwierząt z czterech grup doświadczalnych. Już na pierwszy rzut oka zwraca uwagę fakt, że



Ryc.12. Stężenie jonu sodowego w poszczególnych warstwach tkanki nerkowej: korze /C_x/, rdzeniu wewnętrznym /I.M.1/ i okolicy brodawki rdzenia wewnętrznego /I.M.2/ u królika w warunkach kontrolnych /C/, po wstrzyknięciu 1,5 mg/kg furosemidu /f/, 3,0 mg/kg furosemidu /F/ lub podaniu infuzji 15% roztworu mannitolu /M/.

Podano wartości średnie w przeliczeniu na kg mokrej tkanki /wet tissue/, suchej tkanki /dry tissue/ i wody tkankowej. Zaznaczono poziomy istotności różnic w stosunku do kory nerkowej. Wartości błędów standardowych i liczebność grup podano na ryc.13.

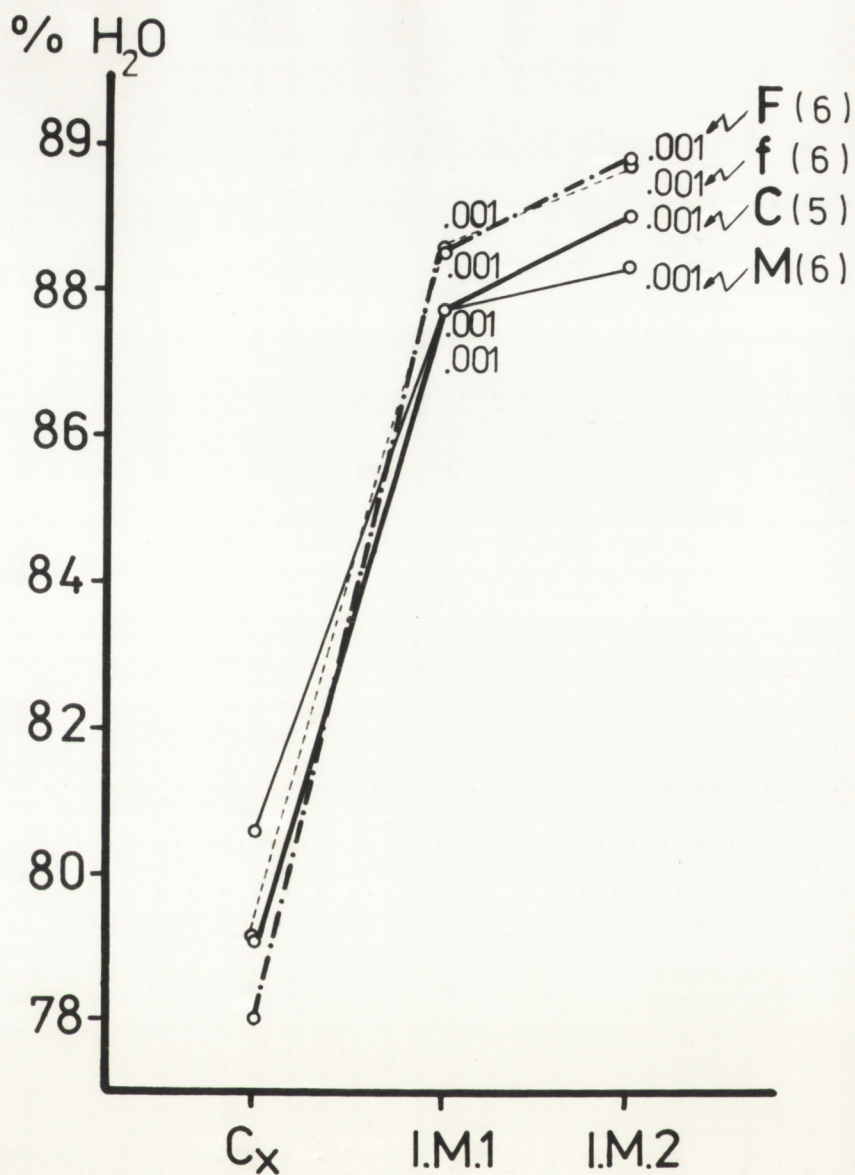


Ryc.13. Porównanie admitancji Y i stężenia jonu sodowego w poszczególnych warstwach tkanki nerkowej królika: korze /cortex/, rdzeniu wewnętrznym /inn.med.1/ i okolicy brodawki rdzenia wewnętrznego /inn.med.2/ dla czterech grup doświadczalnych: kontrolnej /C/, po wstrzyknięciu 1,5 mg/kg furosemidu /f/, 3,0 mg/kg furosemidu /F/ lub po podaniu infuzji 15% roztworu mannitolu /M/.

Wartości średnie \pm błąd standardowy. Zaznaczono poziomy istotności różnic w stosunku do grupy kontrolnej.

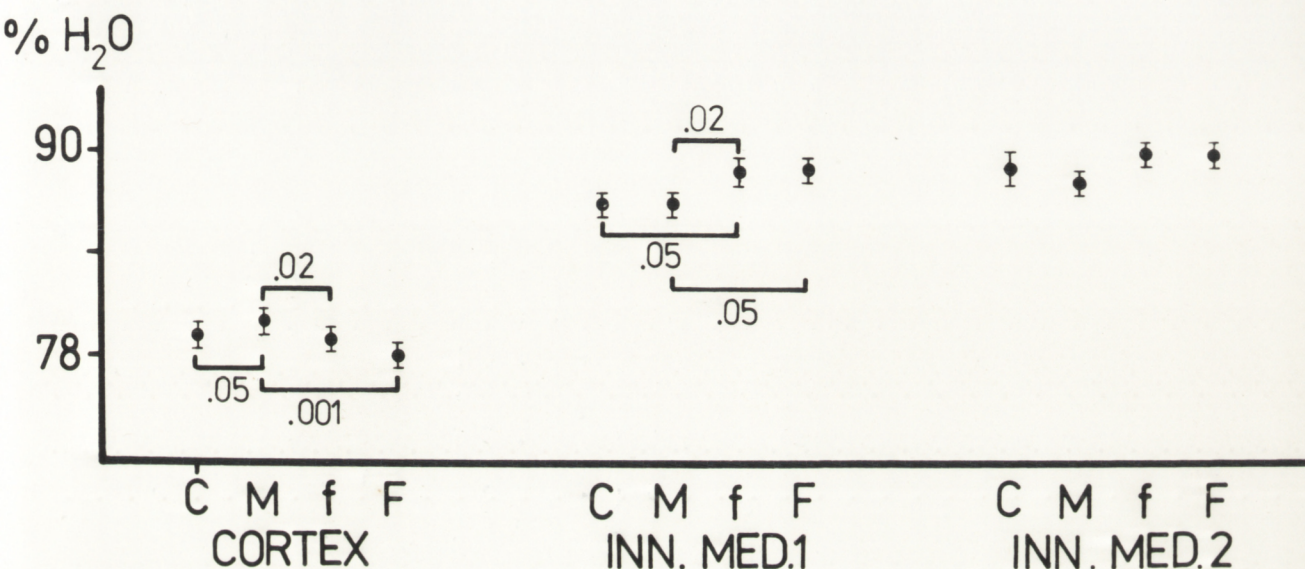
wartości admitancji dla różnych grup doświadczalnych i różnych warstw nerki były w przybliżeniu zgodne ze stężeniami jonu sodowego w tkance. Admitancja rdzenia wewnętrznego i okolicy brodawki rdzenia wewnętrznego była w grupie kontrolnej znacznie wyższa niż w pozostałych. Podobnie stężenie jonu sodowego w rdzeniu wewnętrznym było najwyższe w nerkach kontrolnych, chociaż w przypadku części rdzenia wewnętrznego bliższej kory /1.nn.međ.1/ różnica w stężeniu Na^+ na kg suchej tkanki nie osiągnęła znaczenia statystycznego. Stężenie jonu sodowego w korze nerkowej zwierząt po infuzji mannitolu było znacznie niższe niż u zwierząt kontrolnych, jednak ilościowa różnica ta była niewielka; znaczenie ta nie dotyczyła stężenia Na^+ w przeliczeniu na kg suchej tkanki. Nie było uderzających różnic w admitancji czy w stężeniu Na^+ między dwiema częściami rdzenia wewnętrznego bliższą i dalszą brodawce ani między trzema grupami doświadczalnymi /mannitol, mała i duża dawka furosemidu/.

Ryciny 14a i 14b stanowią uzupełnienie do rycin 12 i 13 i przedstawiają procentową zawartość wody w korze, rdzeniu wewnętrznym i okolicy brodawki nerkowej u zwierząt z czterech grup. Należy podkreślić, że zawartość wody określano w innych nerkach niż te, w których badano admitancję, stężenie jonu sodowego i substancji osmotycznie czynnych, co było podyktowane przyjętą metodyką /por. pkt.3.6/. Toteż stężenie jonu sodowego i osmolalność przeliczone na kg suchej tkanki lub wody tkankowej są tylko pewnym oszacowaniem /przybliżeniem/ wartości rzeczywistych. Jak widać /ryc.14a/ zawartość wody w korze była zawsze znacznie niższa niż w rdzeniu wewn-



Ryc.14a. Procentowa zawartość wody w korze nerkowej /C_x/, rdzeniu wewnętrznym /I.M.1/ i okolicy brodawki rdzenia wewnętrznego /I.M.2/ u królika w warunkach kontrolnych /C/, po wstrzyknięciu 1,5 mg/kg furosemidu /f/, 3,0 mg/kg furosemidu /F/ lub podaniu infuzji 15% roztworu mannitolu /M/.

Liczoność grup w nawiasach. Wartości średnie. Zaznaczono poziomy istotności różnic w stosunku do kory nerkowej. Wartości błędów standardowych podano na ryc.14b.



Ryc.14b. Porównanie procentowej zawartości wody w poszczególnych warstwach tkanki nerkowej królika: korze /cortex/, rdzeniu wewnętrznym /inn.med.1/ i okolicy brodawki rdzenia wewnętrznego /inn.med.2/ dla czterech grup doświadczalnych /por. ryc.14a/.

Wartości średnie \pm błąd standardowy. Zaznaczono poziomy istotności różnic między grupami.

trznym. Najbardziej uwodnioną korę nerkową miały zwierzęta po infuzji mannitolu, zaś najbardziej uwodniony rdzeń wewnętrzny zwierzęta po furosemidzie /ryc.14b/. Zawartość wody w okolicy brodawki rdzenia wewnętrznego nie różniła się istotnie u zwierząt z różnych grup.

Przeliczanie stężeń jonu sodowego i substancji osmotycznie czynnych na kg mokrej tkanki, suchej tkanki i wody tkankowej, z uwzględnieniem różnic w uwodnieniu tkanki nerkowej, miało w założeniu wyjaśnić, czy w następstwie podawania środków diuretycznych zachodziły zmiany w ilości substancji rozpuszczonych w wodzie tkankowej, czy też zmieniała się tylko ilość rozpuszczalnika /wody/. Należy zdawać sobie sprawę, że każdy ze sposobów wyrażania stężeń substancji w tkance posiada pewne ograniczenia i stwarza trudności w interpretacji. Stosowany niejednokrotnie /5,6,7,10,11/ sposób przeliczania stężeń na suchą tkankę wolną od mocznika prowadził często do zamaskowania istniejących różnic w stężeniach substancji w tkance /28,29,50/. Wydaje się, że lepszym sposobem wyrażania stężeń jest odnoszenie ich do mokrej tkanki lub wody tkankowej, jednak w celu otrzymania możliwie pełnego obrazu wskazane jest stosowanie wszystkich trzech sposobów przeliczania.

Pamiętając o ograniczeniach wynikających ze sposobu badania tkanek /por. pkt.3.6/ i przeliczania stężeń, dane przedstawione na ryc.13,14a,b można podsumować w następujący sposób:

- furosemid /obydwie dawki/ obniżał stężenie jonu Na^+ w rdzeniu wewnętrznym /w obydwu częściach/; wynikało to ze spadku ilości Na^+ w tkance, na co wskazuje obniżenie stężenia

Na^+ w przeliczeniu na suchą tkankę oraz ze wzrostu zawartości wody w tkance, która dodatkowo rozcieńczyła zmniejszoną ilość Na^+ ,

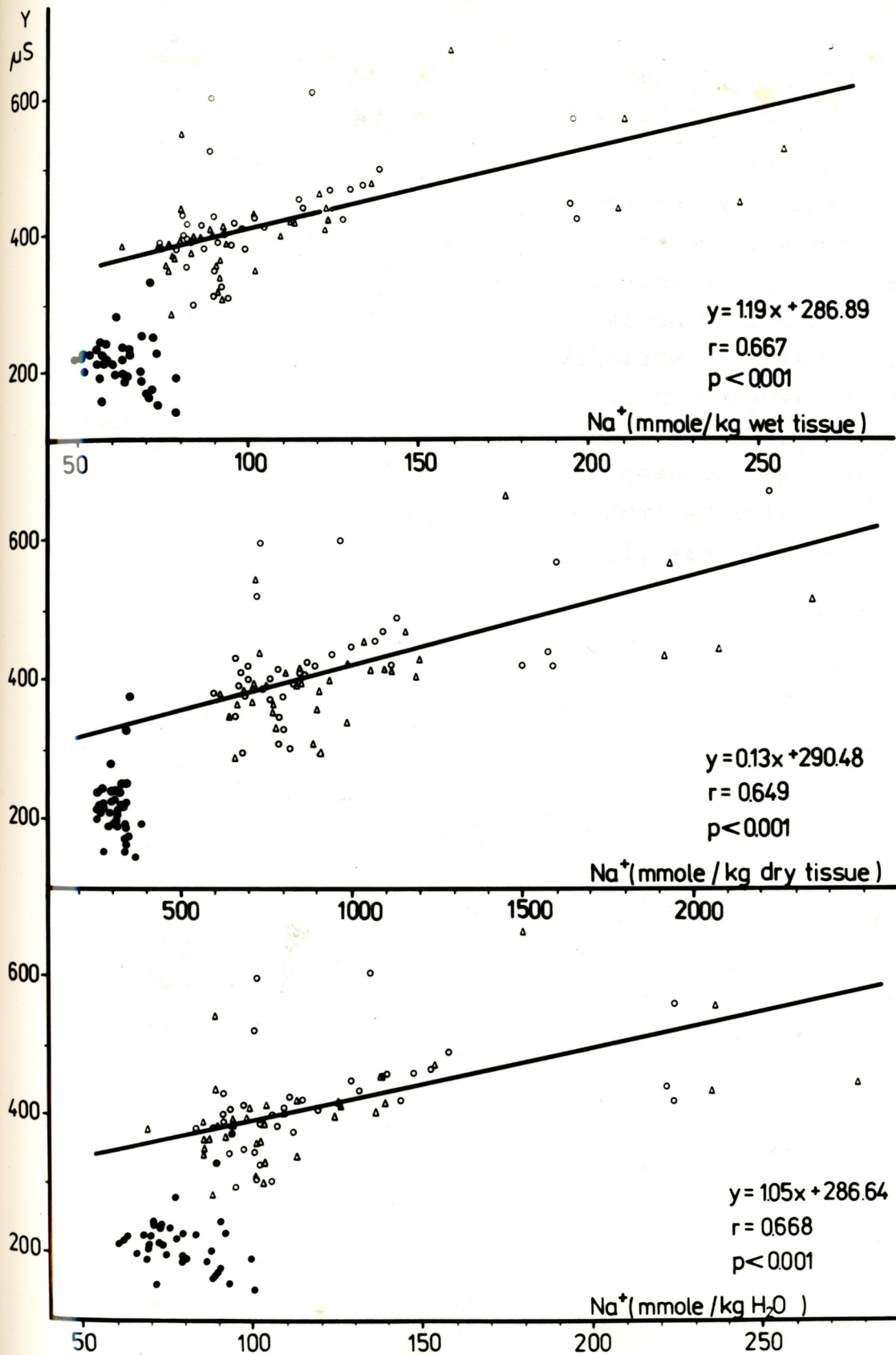
- infuzja mannitolu obniżała stężenie Na^+ w rdzeniu wewnętrznym /w obydwu częściach/; wynikało to jedynie ze spadku ilości jonu Na^+ w tkance /por. stężenie Na^+ w przeliczeniu na suchą tkankę/, ponieważ zawartość wody w tkance nie ulegała zmianie.

Ryciny 15 i 16 przedstawiają korelacje między stężeniami jonu sodowego i wszystkich substancji osmotycznie czynnych w tkance nerkowej a wartością admitancji świeżej tkanki /Y/.

Najbardziej uderzająca była obserwacja, że punkty reprezentujące zależności dla kory tworzą osobne zgrupowanie. Z tego też względu wartości te nie zostały włączone do analizy korelacji i regresji. Również badania tkanki sztucznie nasyconej NaCl sugerowały odrębność kory /por. pkt.3.6.1, ryc.4/ i przemawiały za wyłączeniem wspomnianych wartości z analizy statystycznej.

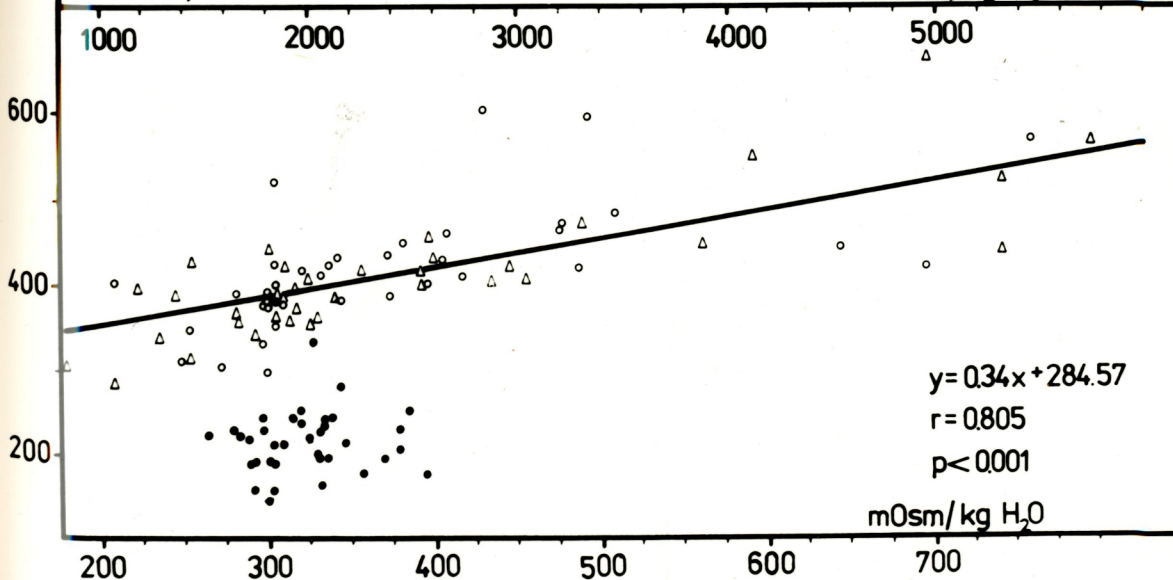
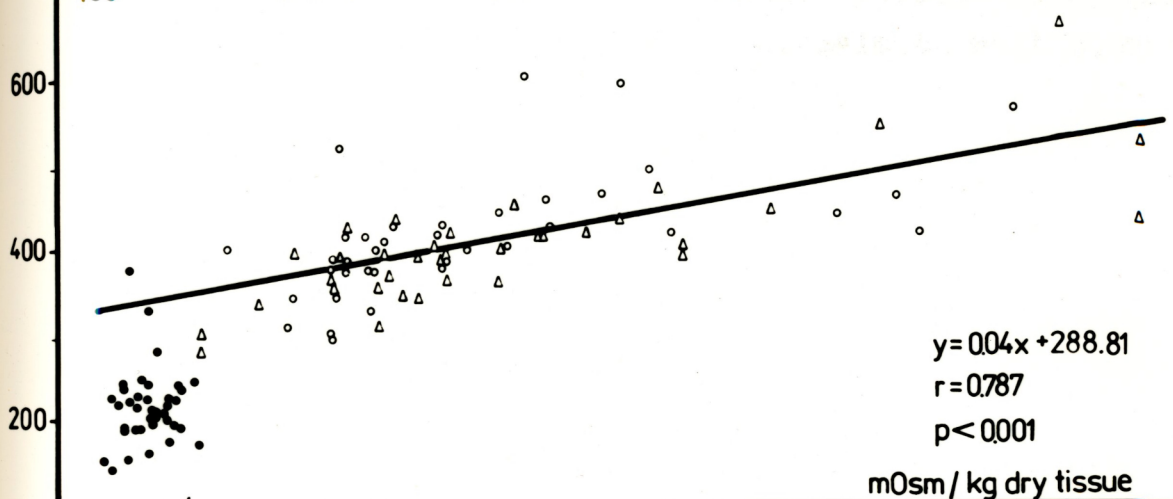
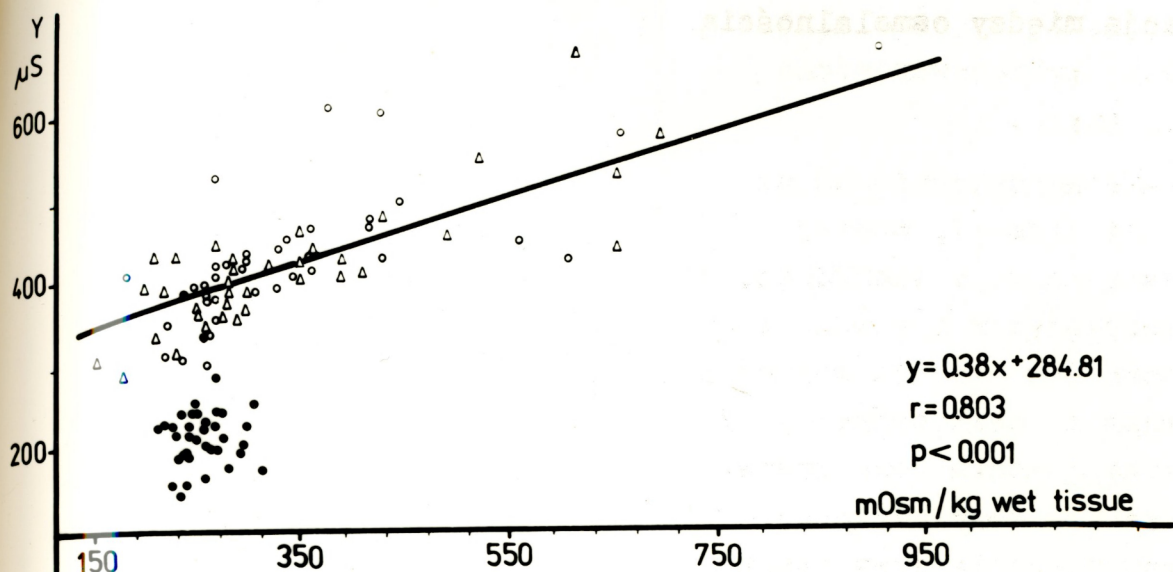
Nachylenia krzywych opisujących zależność Y od stężenia Na^+ i osmolalności w obrębie tkanki rdzeniowej były niewielkie, co oznacza, że dopiero większe różnice w stężeniach mogły być uchwycione jako zmiany admitancji. Jest to zgodne z "płaskim" przebiegiem krzywych kalibracyjnych Y dla roztworów o narastających stężeniach i sztucznie nasalanych tkanek /ryc.4/.

Wbrew przewidywaniom analiza korelacji wykazała wyższe współczynniki r dla zależności między Y a osmolalnością niż dla zależności między Y a stężeniem Na^+ . Interpretacja



Ryc.15. Korelacja między stężeniem jonu sodowego w tkance nerkowej królika a wartością admitancji /Y/.

Podano wartości w przeliczeniu na kg mokrej tkanki /wet tissue/, suchej tkanki /dry tissue/ i wody tkankowej. Współczynniki korelacji r i równania regresji obliczono łącznie dla wartości zmierzonych w rdzeniu wewnętrznym /O/ i okolicy brodawki rdzenia wewnętrznego /Δ/ z wyłączeniem kory nerkowej /●/. Podano prawdopodobieństwa braku istotności współczynników korelacji.



Ryc.16. Korelacja między osmolalnością tkanki nerkowej królika a wartością admitancji /Y/.

Podano wartości w przeliczeniu na kg mokrej tkanki /wet tissue/, suchej tkanki /dry tissue/ i wody tkankowej. Współczynniki korelacji r i równania regresji obliczono łącznie dla wartości zmierzonych w rdzeniu wewnętrznym /O/ i okolicy brodawki rdzenia wewnętrznego /Δ/ z wyłączeniem kory nerkowej /●/. Podano prawdopodobieństwa braku istotności współczynników korelacji.

tego zjawiska nie jest łatwa. Jak wiadomo, pomiar osmolalności poza stężeniami elektrolitów uwzględniał także stężenie mocznika, co powinno osłabiać korelację z admitancją. Z drugiej strony jednak, należy wziąć pod uwagę fakt, że w warunkach zwiększonej diurezy mocznik ulegał wypłukaniu z tkanki i jego udział w całkowitej osmolalności był niewielki. Natomiast pomiar osmolalności uwzględniał obok Na^+ i towarzyszących mu anionów także jony K^+ , NH_4^+ , Ca^{++} i inne, co mogło korzystnie odbić się na korelacji między sumą elektrolitów a admitancją.

Należy zwrócić uwagę, że admitancja mierzona przy częstotliwości 400 Hz, zgodnie z podaną wcześniej charakterystyką metody /por. pkt.1/, jest funkcją stężenia elektrolitów w płynie pozakomórkowym. Natomiast pomiary osmolalności i stężenia Na^+ w skrawkach tkankowych dotyczyły całej tkanki lub całego płynu tkankowego. Zmiany stężenia elektrolitów w przestrzeni wewnątrzkomórkowej /np. zależne od działania środków diuretycznych/ były najprawdopodobniej znacznie mniejsze niż w przestrzeni pozakomórkowej /14/. Różnice stężeń określone globalnie w całym płynie tkankowym musiały być więc również mniejsze niż różnice występujące w płynie pozakomórkowym. Wydaje się, że takie były główne - chociaż nie jedyny - przyczyny, dla których nie należało się spodziewać ścisłej zależności między wynikami badań tkankowych i pomiarów admitancji.

5. D Y S K U S J A

5.1. Rozważania metodyczne

Zastosowanie w przedstawionych badaniach pomiarów admittancji elektrycznej tkanki pozwoliło śledzić w sposób ciągły, *in vivo* i *in situ*, zmiany całkowitego stężenia elektrolitów w płynie pozakomórkowym czterech warstw nerki królika.

Bodźcem wywołującym te zmiany były środki diuretyczne /ryc.6/.

Należy podkreślić, że nigdy dotąd nie udawało się prowadzić minuta po minucie obserwacji zmian stężeń elektrolitów w tkance tej samej nerki. Tej luki metodycznej nie mogły wypełnić nawet badania skrawków tkanki nerkowej pobieranych od dużej liczby zwierząt zabijanych w różnych odstępach czasu od momentu zastosowania bodźca, jako że i te dane, dostarczone głównie przez grupę Athertona, dawały jedynie pewne przybliżenie rzeczywistej dynamiki zmian /7,8,10,11/.

Zastosowana tutaj metoda pomiaru admittancji jako miary stężenia łącznie wszystkich elektrolitów w tkance posiada również pewne istotne ograniczenia:

a/ wykrywa łącznie wszystkie rodzaje jonów, nie dostarczając informacji o ilościowym, czy procentowym udziale poszczególnych ich rodzajów;

b/ nie uwzględnia różnic w wartościach równoważników przewodności dla różnych rodzajów jonów;^{≠/}

c/ nie uwzględnia stężeń substancji nieelektrolitowych w płynie pozakomórkowym rdzenia, z których najważniejszym z fizjologicznego punktu widzenia jest mocznik;

d/ daje jedynie informację jakościową, a w najlepszym razie półilościową, o zmianach stężenia elektrolitów w płynie pozakomórkowym określonej warstwy tkanki nerkowej.

Mimo poważnych ograniczeń zastosowana w niniejszej pracy metoda dostarczyła szeregu interesujących danych. Należy podkreślić, że przedstawione tu badania poprzedzono całą serią przeprowadzonych w naszym laboratorium wstępnych doświadczeń prezentowanych wcześniej /31,32,69,73,74,75/.

Zgodnie z tym, co zostało już wcześniej powiedziane, znaczne obniżenie admitancji rdzenia wewnętrznego i okolicy brodawki nerkowej po wstrzyknięciu 1,5 mg/kg furosemidu oraz obniżenie admitancji dla wszystkich warstw tkanki nerkowej obserwowane po wstrzyknięciu 3,0 mg/kg furosemidu i w czasie infuzji 15% roztworu mannitolu wskazuje na obniżenie w płynie pozakomórkowym tych warstw globalnego stężenia elektrolitów, w tym niewątpliwie głównego składnika, którym jest kation Na^+ wraz

^{≠/} Równoważniki przewodności /ang. equivalent conductance/ stanowią wskaźniki zdolności do przewodzenia prądu charakteryzujące różne rodzaje jonów w pewnych standardowych warunkach /np. w roztworze wodnym w temperaturze 25°C wynoszą odpowiednio dla:

Na^+ - 50, Cl^- - 76, K^+ - 74, HCO_3^- - 45 $\text{ohm}^{-1}\text{cm}^2$ /84/.

z towarzyszącymi anionami. Badania skrawków tkankowych, stanowiące uzupełnienie do badań admitancji, ogólnie potwierdziły zmniejszenie stężenia jonu Na^+ w tkance po podaniu zwierzętom środków diuretycznych /ryc.12/. Nie wydaje się celowe szczegółowe porównywanie wyników uzyskanych dwiema tak różnymi metodami i nie należy się spodziewać ścisłej zgodności między nimi, co wyjaśnione już wcześniej /por. pkt.4.4/.

Wyniki doświadczeń, w których zwierzęta otrzymywały infuzję hipertonicznego roztworu mannitolu pozostają w zgodzie z wcześniejszymi obserwacjami poczynionymi w naszym laboratorium /31, 32/ wykazującymi istotne obniżenie admitancji rdzenia wewnętrznego i brodawki u królika podczas diurezy samotycznej. Zastępując mannitol hipertonicznym roztworem NaCl zaobserwowano następnie stopniowe narastanie admitancji rdzenia wewnętrznego i brodawki. W badaniach własnych efekt analogiczny do tego ostatniego udało się uzyskać, gdy po obniżeniu admitancji rdzenia w następstwie wstrzyknięcia furosemidu przeprowadzono infuzję 3% roztworu NaCl /ryc.5/. Należy sądzić, że wzrost stężenia Na^+ w płynie pozakomórkowym wszystkich badanych warstw tkanki nerkowej wynikał wówczas z dostarczenia do śródmiąższu zwiększonej ilości jonów sodowych reabsorbowanych w zwiększonej ilości ze światła kanalika nerkowego.

Pewną zagadką stanowił gwałtowny spadek admitancji rdzenia wewnętrznego i brodawki obserwowany natychmiast po wkluciu elektrod w tkankę /ryc.5/. Wydaje się, że było to spowodowane miejscowym urazem podczas wkluwania elektrod, zniszczeniem części struktur nerkowych znajdujących się na drodze elektrody i zmieszaniem się płynów pochodzących z różnych przedzia-

łów tkanki charakteryzujących się różnym stężeniem elektrolitów /np. płynu kanalikowego, osocza krwi, płynu śródmiąższowego/. Należy także dodać, że brodawka nerkowa jest tkanką szczególnie wrażliwą i reaguje nawet na mniej urazowe zabiegi /np. wstrzyknięcie środka narkotycznego lub zabieg chirurgiczny poza obrębem nerki/ szybkim obniżeniem osmolalności i stężenia jonu sodowego /4/.

Opisane zmiany admitancji różnych warstw tkanki nerkowej wynikające ze zmian stężenia elektrolitów w płynie pozakomórkowym stanowią odbicie zmian w transporcie jonów w różnych odcinkach kanalika nerkowego. Elektrody użyte w badaniach mierzyły admitancję w osterech warstwach tkanki nerkowej, z których każda zawiera inne odcinki kanalików nerkowych, różniące się zarówno pod względem budowy histologicznej jak i funkcji. Pomiar przeprowadzono na następujących poziomach /ryc.3/:

1. para elektrod - kanalik kręty proksymalny i dystalny oraz korowy odcinek kanalika zbiorczego;
2. para - ramię zstępujące pętli Henle'go, gruby odcinek ramienia wstępującego pętli Henle'go i podkorowy fragment odcinka rdzeniowego kanalika zbiorczego;
3. i 4. para - ramię zstępujące pętli Henle'go, cienki odcinek ramienia wstępującego pętli Henle'go i najgłębszy rdzeniowy odcinek kanalika zbiorczego.

5.2. Próba lokalizacji miejsca działania furosemidu w nefronie

5.2.1. Zmiany admitancji w świetle tradycyjnych poglądów na działanie furosemidu

Badania nad miejscem działania furosemidu w nefronie, prowadzone od wielu lat przez różne laboratoria metodami powszechnie stosowanymi w nefrologii doświadczalnej /klirensowymi, rozszczepionej kropli, "stop-flow", mikropunkcji/ wskazują, że głównym punktem uchwytu tego leku jest gruby odcinek ramienia wstępującego pętli Henle'go /18,26,26,33,64,65,81,85/. Początkowo powszechnie sądzono, że furosemid hamuje reabsorpcję sodu ze światła kanalika unieczynnijając Na-K-ATPazę zlokalizowaną w błonie bazolateralnej i "napędzającą" pompę metaboliczną aktywnie przenoszącą jony sodowe z komórek do przestrzeni okołokanalikowej /33,64,65/. Zgodnie z tą teorią lek ten mógł działać jedynie w takim odcinku kanalika, w którym ma miejsce aktywny transport jonów, a więc np. w bogatym w mitochondria grubym odcinku ramienia wstępującego pętli Henle'go. Pozostawało to w zgodzie z wysoką aktywnością Na-K-ATPazy jaką wykazano w komórkach nabłonkowych tej części kanalika nerkowego /53,65/.

W świetle tej teorii należało się spodziewać, że zahamowanie reabsorpcji NaCl w grubym odcinku ramienia wstępującego pętli Henle'go zaznaczy się przede wszystkim spadkiem stężeń

nia elektrolitów i wyraźnym obniżeniem admitancji w obrębie rdzenia zewnętrznego /por. ryc.3/. Jak się jednak okazało, duża dawka furosemidu obniżała admitancję wszystkich warstw tkanki nerkowej, zaś mała dawka obniżała admitancję rdzenia wewnętrznego i okolicy brodawki, ale - co było właśnie zaskakujące - nie powodowała podobnych zmian w rdzeniu zewnętrznym /ani w korze/.

Wyraźne obniżenie stężenia jonu sodowego w tkance rdzenia nerkowego i brodawki w wyniku działania furosemidu zaobserwowali, posługując się metodą badania skrawków tkankowych Hook i Williamson /41/ a następnie Fraser i wsp. /27/. Te odosobnione obserwacje sugerujące, że działanie furosemidu nie ogranicza się do grubego odcinka ramienia wstępującego pętli Henle'go, ale dotyczy także odcinków kanalika położonych w rdzeniu wewnętrznym, nie była szerzej brana pod uwagę i nie zdołała podważyć tradycyjnego poglądu.

Gdyby przyjąć założenie, że głównym punktem uchwytu furosemidu w nefronie jest rzeczywiście gruby odcinek ramienia wstępującego pętli Henle'go, próba wyjaśnienia stwierdzonych zmian admitancji w obrębie rdzenia wewnętrznego i brodawki musiałaby się oprzeć na jednej z niżej zaproponowanych hipotez:

H i p o t e z a I - Zahamowanie reabsorpcji NaCl w grubym odcinku ramienia wstępującego pętli Henle'go zwiększa szybkość przepływu moczu przez kanalik zbiorczy pogarszając warunki wychodzenia mocznika z jego odcinka rdzeniowego. Zgodnie z modelem biernego transportu soli zaproponowanym przez Kokko i Rectora /51/, wychodzący z kanalika zbiorczego

do śródmiaższu rdzenia mocznik stwarza dla jonów Na^+ , Cl^- gradient stężeń umożliwiający ich bierne wychodzenie z cienkiego odcinka ramienia wstępującego pętli Henle'go do śródmiaższu. Siłą napędową dla recyrkulacji mocznika stanowi aktywny transport jonów w grubym odcinku ramienia wstępującego. Zablokowanie tego transportu przez furosemid i w konsekwencji zmniejszenie ilości mocznika w rdzeniu wewnętrznym i brodawce utrudniałoby więc, zgodnie z tą hipotezą, wychodzenie jonów z cienkiego odcinka ramienia wstępującego pętli Henle'go i prowadziło do obniżenia stężenia NaCl a więc i admitancji tych warstw nerki.

Jednakże dokładniejsza analiza wyników własnych badań nie pozwala na przyjęcie tej hipotezy. Mała dawka furosemidu, jak wiadomo, nie zmieniła w ogóle admitancji rdzenia zewnętrznego a zmiany admitancji rdzenia zewnętrznego po dużej dawce furosemidu występowały z opóźnieniem w stosunku do zmian admitancji rdzenia wewnętrznego i brodawki. Nie sposób więc przyjąć, że zmiany w obrębie rdzenia wewnętrznego były wtórne w stosunku do zmian w obrębie rdzenia zewnętrznego. Trzeba również przypomnieć, że według teorii Kokko i Reatora wyjście mocznika z kanalika zbiorczego do śródmiaższu musi być poprzedzone aktywną reabsorpcją jonów w grubym odcinku ramienia wstępującego, a więc właśnie w rdzeniu zewnętrznym. Tam właśnie należałoby się spodziewać pierwotnych i najwcześniejszych zmian stężenia jonów po furosemidzie.

Należy również dodać, że u królika recyrkulacja mocznika odgrywa, jak się wydaje, znacznie mniejszą rolę w procesie reabsorpcji jonów z kanalika niż u innych gatunków zwierząt

/36,70/. Wykazano ponadto /56/, że nawet przy szybkim przepływie moczu przez kanalik zbiorczy dochodzi do pełnego zrównoważenia stężeń moczniaka w kanaliku i w śródmiąższu, a więc trudno zakładać, aby dyfuzja moczniaka uległa istotnemu upośledzeniu w przebiegu diurezy furosemidowej.

H i p o t e z a II - Zahamowanie reabsorpcji NaCl w grubym odcinku ramienia wstępującego pętli Henle'go prowadzi do spadku stężenia NaCl w śródmiąższu rdzenia zewnętrznego, co sprawia, że reabsorpcja wody z ramienia zstępującego pętli Henle'go ulega zmniejszeniu. W konsekwencji dopływający do cienkiego ramienia wstępującego pętli Henle'go płyn zawiera substancje osmotycznie czynne znacznie rozcieńczone niezreabsorbowaną wodą. W ten sposób warunki reabsorpcji substancji osmotycznie czynnych /w tym jonu sodowego/ w cienkim odcinku ramienia wstępującego pętli Henle'go ulegają pogorszeniu, co jest bezpośrednią przyczyną spadku admitancji rdzenia wewnętrznego i okolicy brodawki rdzenia wewnętrznego.

Tego typu rozumowanie wymagałoby jednak przyjęcia, że zmiany admitancji rdzenia wewnętrznego i brodawki są wtórne w stosunku do zmian w obrębie rdzenia zewnętrznego, co jak już wcześniej wyjaśniono, nie jest zgodne z wynikami własnych badań.

H i p o t e z a III - Zahamowanie reabsorpcji NaCl w grubym odcinku ramienia wstępującego pętli Henle'go prowadzi do spadku stężenia NaCl w śródmiąższu rdzenia zewnętrznego a w konsekwencji do zmniejszenia reabsorpcji H_2O w kanaliku

zbiorczym w obrębie rdzenia zewnętrznego. W rezultacie do dalszego odcinka kanalika zbiorczego dopływa więcej wody i przy odpowiednio wysokiej aktywności hormonu antydiuretycznego zwiększona jej ilość może być reabsorbowana do śródmiąższu rdzenia wewnętrznego i brodawki. Dochodzi wówczas do rozcieńczenia elektrolitów w płynie pozakomórkowym, a więc do spadku ich stężenia w śródmiąższu i obserwowanego spadku admitancji w obrębie rdzenia wewnętrznego i brodawki nerkowej.

Zgodnie z tą hipotezą należałoby się więc spodziewać zmniejszenia procentowej zawartości H_2O w rdzeniu zewnętrznym i zwiększenia tej zawartości w rdzeniu wewnętrznym i brodawce. Znaczny wzrost uwodnienia brodawki u zwierząt w czasie zwiększonej diurezy zaobserwował Atherton i podał ten fakt jako jedną z głównych przyczyn obniżenia osmolalności tej warstwy nerki /3/.

W niniejszych badaniach obserwowano istotnie pewien wzrost procentowej zawartości wody w rdzeniu wewnętrznym i brodawce nerkowej u zwierząt po wstrzyknięciu furosemidu /ryc.14a,b/. Jednakże trudno przyjąć, by tak duże zmiany stężeń elektrolitów w płynie pozakomórkowym rdzenia i brodawki jakie wykryto w doświadczeniach, mogły być wynikiem jedynie rozcieńczenia jonów wodą dostarczoną w nadmiarze do śródmiąższu. Przeciw takiemu rozumowaniu przemawia również istotne zmniejszenie wartości stężeń Na^+ w rdzeniu wewnętrznym i brodawce w przeliczeniu na kg suchej tkanki /ryc.12,13/. W oparciu o "mechanizm rozcieńczenia jonów" nie można również wytłumaczyć braku zmian admitancji w rdzeniu zewnętrznym u zwierząt, którym wstrzyknięto małą dawkę furosemidu.

Hipoteza III trudna jest ponadto do pogodzenia ze stwierdzeniem znacznego wzrostu klirensu wolnej wody $/C_{H_2O}/$, co obserwowano u zwierząt po dużej dawce furosemidu. Jak wiadomo, wartość klirensu wolnej wody zależy od: 1/ reabsorpcji NaCl z ramienia wstępującego pętli Henle'go, 2/ aktywności ADH, oraz 3/ stężenia substancji osmotycznie czynnych w rdzeniu nerkowym. Ponieważ niniejsze oznaczenia klirensu wolnej wody przeprowadzono w warunkach doświadczalnych, które zmieniły co najmniej dwa ze wspomnianych czynników /być może przy stałej aktywności ADH/, interpretacja wyników jest utrudniona. Można jednak sądzić, że wzrost klirensu /wydalania/ wolnej wody przy zmniejszonej produkcji wolnej wody w ramieniu wstępującym pętli Henle'go po furosemidzie był wynikiem znacznie zmniejszonej reabsorpcji wody w kanalik zbiorczym - podczas gdy hipoteza III zakłada zwiększoną reabsorpcję.

Zmniejszenie reabsorpcji wody w kanalik zbiorczym wynikałoby najprawdopodobniej ze zmniejszenia stężenia substancji osmotycznie czynnych w rdzeniu nerkowym. Aby łatwiej zrozumieć ten efekt przytoczmy przykład liczbowy. Załóżmy, że w warunkach kontrolnych generacja wolnej wody w ramieniu wstępującym pętli Henle'go wynosi 100 arbitralnych jednostek, zaś reabsorpcja w kanalik zbiorczym 120: obserwujemy wówczas reabsorpcję netto 20 jednostek wolnej wody, a C_{H_2O} ma wartość ujemną. Po małej dawce furosemidu generuje się mniej wolnej wody, np. 60 jednostek, reabsorpcja równoważy produkcję i wynosi także 60 jednostek, co w efekcie daje wartość C_{H_2O} równą zero /mocz izotoniczny/. Po dużej dawce furosemidu generuje się jeszcze mniej jednostek wolnej wody, np. 40,

reabsorbuje się również mniej - np. 20, co sprawia, że nerka wydała 20 jednostek wolnej wody i C_{H_2O} jest dodatni. Taki wzrost C_{H_2O} po dużej dawce furosemidu przemawia więc za spadkiem reabsorpcji wody z kanalika zbiorczego i zmniejszonym dostarczaniem wody do śródmiąższu - co pozostaje w sprzeczności z podstawowym założeniem hipotezy III postulującej zwiększony dopływ wody do śródmiąższu rdzenia wewnętrznego i brodawki.

Pozostaje jeszcze do rozważenia problem wpływu furosemidu na reabsorpcję NaCl w kanaliku krętym proksymalnym i ewentualnego znaczenia tego działania dla obserwowanych zmian admitancji kory nerkowej. Utrzymuje się pogląd, że furosemid hamuje reabsorpcję proksymalną tylko przy podawaniu dużych dawek jednorazowych lub przy przewlekłym stosowaniu /22,39, 64/. Niskie jednorazowe dawki furosemidu wywierają tu niewielkie działanie, które kompensowane jest wzrostem reabsorpcji w kanaliku dystalnym krętym /16,24,64/. Nie wydaje się, aby obniżenie admitancji kory nerkowej po zastosowanej w tych badaniach dużej dawce furosemidu miało bezpośredni związek z zahamowaniem reabsorpcji proksymalnej NaCl. Reabsorpcja w kanaliku proksymalnym ma charakter izotoniczny i "izoelektrolitowy", toteż zahamowanie wchłaniania NaCl w kanaliku nie mogłoby zmienić stężenia elektrolitów w płynie śródmiąższowym.

Nie jest również prawdopodobne, aby przyczyną zmian admitancji kory było zahamowanie reabsorpcji Na^+ w korowym odcinku kanalika zbiorczego, gdyż transport jonów przebiega tu na niewielką skalę /17,80/. Być może spadek admitancji

w korze nerkowej po dużej dawce furosemidu związany jest z zahamowaniem transportu jonów w kanalikach dystalnym krętym, gdzie procesy reabsorpcji i sekrecji jonów są dosyć intensywne /42/. Możliwe jest również, że obserwowany efekt wiąże się ze zjawiskami niezależnymi od stężenia jonów w płynie śródmiąższowym. Zahamowanie reabsorpcji proksymalnej przez furosemid prowadziłoby np. do wzrostu objętości płynów w kanalikach proksymalnych, które zajmowałyby większą objętość w korze nerkowej niż w warunkach kontrolnych. Elektrody mierzyłyby wówczas admitancję tkanki złożonej w większej części z kanalików nerkowych, przez które prąd o częstotliwości 400 Hz nie płynie, a w mniejszej części z dobrze przewodzącego płynu pozakomórkowego. Znalazłoby to niewątpliwie odbicie we wzroście impedancji i spadku admitancji tkanki korowej.

Reasumując wcześniejsze rozważania prowadzone w ramach trzech zaproponowanych wyżej hipotez należy wątpić, aby uderzające zmiany admitancji w obrębie rdzenia wewnętrznego i brodawki były zjawiskiem wtórnym w stosunku do pierwotnych zmian reabsorpcji NaCl w grubym ramieniu wstępującym pętli Henle'go, a więc na poziomie rdzenia zewnętrznego. Z drugiej strony nie należy wykluczać cząstkowego udziału opisanych zjawisk w obserwowanym obniżeniu stężeń jonów w śródmiąższu rdzenia wewnętrznego i brodawki.

5.2.2. Zmiany admitancji w świetle najnowszych poglądów na działanie furosemidu

Według najnowszych opublikowanych danych hamowanie przez furosemid reabsorpcji NaCl w grubym odcinku ramienia wstępującego związane jest z blokowaniem od strony światła kanalik nerkowego nośników Na^+ , Cl^- i prawdopodobnie także K^+ , znajdujących się w błonie luminalnej komórek kanalikowych /18,26,35,66,76/. Nośniki te mogą spełniać swoją rolę tylko wtedy, gdy stężenie Na^+ w komórce jest znacznie niższe niż w płynie kanalikowym, stąd aby jony mogły wchodzić bez przeszkód ze światła kanalika do komórki konieczne jest działanie Na-K-ATPazy dostarczającej energii dla "pompy" aktywnie usuwającej jony sodowe z komórki do przestrzeni śródmiąższowej okołokanalikowej /26,34/.

Jak już wspomniano, do niedawna sądzono, że furosemid unieczynnia ten enzym i na tej drodze hamuje reabsorpcję NaCl w ramieniu wstępującym pętli Henle'go. Ostatnio coraz więcej danych przeczy temu pogładowi, potwierdzając hipotezę o hamowaniu przez furosemid kotransportu jonów Na^+ , Cl^- & K^+ przez błonę luminalną komórki kanalikowej /15,26,84/. Niemniej nadal utrzymuje się pogląd, że głównym miejscem działania furosemidu jest gruby odcinek ramienia wstępującego pętli Henle'go, wpływający zapewne z zakorzenionego przekonania, że lek ten może działać tylko tam, gdzie istnieje aparat enzymatyczny "pompy sodowej" /Na-K-ATPaza/.

Po odrzuceniu przedstawionych w poprzednim podrozdziale trzech hipotez postulujących, że hamowanie reabsorpcji NaCl w cienkim odcinku ramienia wstępującego pętli Henle'go jest

zjawiskiem wtórnym w stosunku do blokowania reabsorpcji w grubym odcinku, pozostaje do przeanalizowania pierwotny wpływ furosemidu na transport NaCl na poziomie rdzenia wewnętrznego i brodawki. Należy tu rozważyć dwie możliwości: hamowanie reabsorpcji NaCl w rdzeniowym odcinku kanalika zbiorczego, lub w cienkim odcinku ramienia wstępującego pętli Henle'go /por. ryc.3/. Kanalik zbiorczy nie wydaje się być miejscem, w którym zahamowanie reabsorpcji sodu mogłoby wyraźnie obniżyć stężenie NaCl w śródmiąszu, gdyż procesy reabsorpcji jonów zachodzą tu na zbyt małą skalę i towarzyszy im zwrotna dyfuzja wody /44,70,73/; nie można jednak absolutnie wykluczyć pewnego cząstkowego udziału tej części nefronu. Wydaje się bardziej prawdopodobne, że spadek stężenia elektrolitów w rdzeniu wewnętrznym i brodawce zależy w głównej mierze od pierwotnego zahamowania reabsorpcji w cienkim odcinku ramienia wstępującego pętli.

Jak wskazują liczne badania histologiczne i mikropunkcyjne zestawione w pracach przeglądowych /44,52,53/ nie ma podstaw żeby przypuszczać, że w cienkim odcinku ramienia wstępującego zachodzi aktywny transport NaCl. Uważa się, że reabsorpcja Na^+ przebiega tu na drodze dyfuzji, zaś reabsorpcja Cl^- jest procesem bardziej skomplikowanym i opiera się na dwóch mechanizmach: dyfuzji i transporcie ułatwionym przez nośniki znajdujące się w błonie luminalnej komórek kanalikowych /52/. Według teorii biernego transportu soli wg Kokko i Rectora /51/ wychodzenie jonów Na^+ i Cl^- z cienkiego odcinka ramienia wstępującego pętli do śródmiąszu zgodnie z gradientem stężeń możliwe jest dzięki recyrkulacji mocznika

w nerce. Jeżeli furosemid unieczynniałby nośniki Cl^- znajdujące się w błonie luminalnej tego odcinka pętli, podobnie jak dzieje się to w grubym odcinku ramienia wstępującego, wówczas nawet przy niezakłóconej recyrkulacji mocznika i istnieniu różnicy stężeń sprzyjającej wychodzeniu jonów Na^+ i Cl^- z kanalika, reabsorpcja soli byłaby częściowo zahamowana, a stężenie jonów w płynie pozakomórkowym rdzenia wewnętrznego i brodawki obniżyłoby się.

Hipoteza ta nie wyklucza możliwości istnienia aktywnego transportu NaCl w cienkim odcinku ramienia wstępującego pętli, za czym pośrednio przemawiałyby okoliczność, że u królików, w związku z mniejszą przepuszczalnością ich kanalików zbiorczych dla mocznika /36,70/ rola biernego mechanizmu reabsorpcji jonów Na^+ i Cl^- zgodnie z modelem Kokko i Rectora wydaje się mniej prawdopodobna.

W oparciu o hipotezę zakładającą bezpośrednie działanie furosemidu zarówno w grubym jak i w cienkim odcinku ramienia wstępującego pętli Henle'go można podjąć próbę wyjaśnienia przyczyny zróżnicowania efektów furosemidu na admitancję tkanki zależnie od wielkości dawki. Furosemid znajdujący się w świetle kanalika nerkowego hamowałby najpierw reabsorpcję NaCl w cienkim odcinku ramienia wstępującego pętli. Do tego celu wystarczałaby już mniejsza dawka furosemidu /1,5 mg/kg/. Zwiększony dopływ jonów Na^+ i Cl^- do grubego odcinka ramienia wstępującego byłby przyczyną pewnego zwiększenia reabsorpcji w tej części nefronu, co kompensowałoby częściowe zahamowanie reabsorpcji zależne bezpośrednio od furosemidu. Wyższa dawka leku /3,0 mg/kg/ byłaby już wystarczająco duża,

aby skutecznie zahamować reabsorpcję NaCl wzdłuż całego ramienia wstępującego pętli Henle'go.

Dodatkową przyczyną znaczniejszych zmian stężenia elektrolitów w tkance i admitancji po wstrzyknięciu 3,0 mg/kg furosemidu mogło być zmniejszenie filtrowanego ładunku sodu spowodowane istotnym /po 30 minutach od wstrzyknięcia leku/ obniżeniem filtracji kłębkowej przy niezmiennym stężeniu jonu sodowego w osoczu.

5.3. Przepływ krwi przez nerkę /RBF/ a zawartość elektrolitów w tkance

Jak już wcześniej wspomiano, zróżnicowanie stężeń substancji osmotycznie czynnych w nerce wzdłuż osi kołowo-brodawkowej jest wynikiem równowagi dynamicznej między dostarczeniem tych substancji ze światła kanalików nerkowych do śródmiąższu oraz ewakuacją ich ze śródmiąższu przez przepływającą naczyniami prostymi krew. Zwiększony przepływ rdzeniowy krwi mógłby więc prowadzić do "wypłukiwania" elektrolitów z tkanki i tą drogą obniżyć jej admitancję.

5.3.1. Wpływ furosemidu na RBF

W wielu wcześniejszych badaniach obserwowano wzrost przepływu krwi przez nerkę po podaniu furosemidu, a także sugerowano zmiany w rozdziale krwi wewnątrz nerki /12,21,23,58,59/.

Ponieważ furosemid stymuluje syntezę endogennych prostaglandyn, rozważano możliwość pośredniego oddziaływania tego związku na mięśniówkę naczyń krwionośnych /20,60,79/. W świetle najnowszych badań wydaje się jednak, że furosemid może wpływać bezpośrednio na naczynia krwionośne /21/, natomiast prostaglandyny, których biosyntezę stymuluje, miałyby hamować reabsorpcję kanalikową NaCl, a także działać antagonistycznie do ADH na poziomie kanalika zbiorczego /57,79/. Furosemid mógłby także modyfikować rozdział krwi wewnątrz nerki poprzez stymulację uwalniania reniny i działanie powstającej angiotensyny II na mięśniówkę tętniczek odprowadzających /12,40, 43,48/ przy założeniu, że powstająca angiotensyna II w różnym stopniu działa na tętniczki odprowadzające kłębków korowych i przyrzeniowych.

W przedstawionych tutaj badaniach obserwowano spadek - nie zaś wzrost - przepływu krwi przez nerkę po wstrzyknięciu furosemidu /rys.8,9/, a współczynnik ekstrakcji PAH stanowiący wskaźnik, choć nie najlepszy, przepływu rdzeniowego nie zmienił się /tabela III/. Wyniki te pozostają w zgodzie z badaniami, w których nie wykazano zmian rozdziału krwi wewnątrz nerki po podaniu furosemidu /19/. Ponieważ całkowity przepływ krwi przez nerkę zmniejszył się, jest mało prawdopodobne aby mogło zachodzić zwiększone "wypłukiwanie" elektrolitów ze śródmiąższu rdzenia przez krew przepływającą naczyniami prostymi.

5.3.2. Wpływ mannitolu na REF

Ciekawych obserwacji dostarczyły doświadczenia, w których zwierzętom - zamiast furosemidu - podawano infuzję 15% roztworu mannitolu. Dobierając odpowiednią szybkość infuzji udawało się wywołać podobną diurezę i podobne tempo wydalania jonu sodowego i wszystkich substancji osmotycznie czynnych jakie uzyskiwano po wstrzyknięciu 1,5 mg/kg furosemidu - /ryc.10, tabela IV/.

Mannitol filtrowany bez przeszkód do przestrzeni Bowmana, nie ulega reabsorpcji w kanalikule nerkowym, na co wskazuje jego klirens zbliżony do klirensu inuliny /33/. Obecność niezreabsorbowanej substancji w kanalikule nerkowym prowadzi do zatrzymania w nim wody i w dalszej konsekwencji utrudnia wychodzenie jonu sodowego ze światła kanalika. Jest to jedną z przyczyn zmniejszenia gradientu elektrolitów w nerce - /9,10,36,61/.

Badania admitancji przeprowadzone w niniejszej pracy potwierdziły w całej rozciągłości te wcześniejsze wnioski; znalazły one także potwierdzenie w badaniach skrawków tkankowych /ryc.12,13/.

Ponieważ ani filtracja kłębkowa ani stężenie jonu sodowego w osoczu krwi nie zmieniały się w czasie infuzji mannitolu, nie ulegał również zmianie przesączony ładunek sodu. Spadek stężenia elektrolitów w śródmiąższu /najprawdopodobniej głównie Na^+ i Cl^- / przy zwiększonym ich wydalaniu w moczu musiał wynikać z zahamowania reabsorpcji kanalikowej NaCl. Jak wiadomo, mannitol działa hamujące na reabsorpcję

NaCl na całej długości nefronu. Powinno to prowadzić do spadku stężenia elektrolitów i admitancji we wszystkich warstwach tkanki nerkowej - co rzeczywiście stwierdzono.

Interesujący wydaje się fakt, że zmiany admitancji w czasie trwania infuzji 15% roztworu mannitolu odpowiadały co do wielkości zmianom jakie obserwowano po wstrzyknięciu 3,0 mg/kg furosemidu /ryc.6,7/, podczas gdy V , $U_{osm} V$ i $U_{Na} V$ utrzymywały się na poziomie wartości uzyskiwanych u zwierząt po wstrzyknięciu 1,5 mg/kg leku /ryc.10/. Wartość filtracji kłębkowej i stężenia jonu sodowego w osoczu w grupie zwierząt, którym wstrzyknięto 1,5 mg/kg furosemidu i w grupie mannitolowej były podobne i nie zmieniały się w czasie trwania doświadczeń, a więc filtrowany ładunek sodu był podobny. Ponieważ w obydwu grupach wydalanie jonu sodowego wzrastało w różnym stopniu, wyjaśnienia różnego nasilenia zmian admitancji i stężenia NaCl w śródmiąższu szukać należy w zmianach przepływu krwi przez nerkę.

Wzrost przepływu krwi przez nerkę po mannitolu, jak też zmiany rozdziału krwi wewnątrz nerki /wzrost przepływu rdzeniowego/, są często wspomniane w literaturze jako potencjalne przyczyny "wypłukiwania" substancji osmotycznie czynnych z tkanki nerkowej /1,10,33,46,63,67/. Również w badaniach własnych po mannitolu zaznaczyła się pewna tendencja do wzrostu RBF, podczas gdy po wstrzyknięciu furosemidu kierunek zmian był przeciwny /ryc.8,9/. Tak więc u zwierząt otrzymujących mannitol zwiększony przepływ krwi naczyniami prostymi mógł prowadzić do wzmożonego "wypłukiwania" elektrolitów z tkanki nerkowej. Nie natomiast nie wskazywało na zmiany roz-

działu krwi wewnątrz nerki, jeśli przyjąć, że niezmienny współczynnik ekstrakcji PAH /tabela III/ może być na to wystarczającym dowodem.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Zastosowana w pracy metoda pomiaru admitancji tkanki nerkowej pozwala śledzić w sposób ciągły zmiany stężenia elektrolitów w śródmiąszku i na tej podstawie wnioskować o zmianach reabsorpcji kanalikowej elektrolitów w nerce *in vivo* i *in situ*.

2. Metoda jest wystarczająco oszczędna aby wykryć następstwa zahamowania reabsorpcji kanalikowej przez małą dawkę furosemidu /1,5 mg/kg/, powodującą jedynie umiarkowany wzrost diurezy i wydalania jonu sodowego przez nerkę; możliwość zróżnicowania efektów małej i dużej /3,0 mg/kg/ dawki furosemidu w oparciu o obserwacje admitancji tkanki nerkowej przemawia również na korzyść proponowanej metody.

3. Pomiary admitancji płynu śródmiąszkowego rdzenia nerki wskazują pośrednio, że furosemid hamuje reabsorpcję NaCl w cienkim odcinku ramienia wstępującego pętli Henle'go; efekt ten pojawia się już przy małej dawce leku, wtedy gdy nie obserwuje się zmian admitancji w rdzeniu zewnętrznym, czyli na poziomie grubego odcinka ramienia wstępującego pętli.

4. Tradycyjny pogląd, według którego działanie furosemidu ogranicza się do grubego odcinka ramienia wstępującego nie znajduje potwierdzenia ani w obecnych badaniach ani też w najnowszych doniesieniach dotyczących mechanizmu wpływu leku na transport kanalikowy NaCl; wydaje się, że furosemid hamuje reabsorpcję soli wzdłuż całego ramienia wstępującego pętli Henle'go.

5. Według najnowszych danych pochodzących głównie z badań nad izolowanymi kanalikami nerkowymi królika hamowanie przez furosemid reabsorpcji NaCl w grubym odcinku ramienia wstępującego pętli spowodowane jest blokowaniem nośników Cl^- związanych z błoną luminalną komórek kanalikowych. Wyniki uzyskane w tej pracy upoważniają do wysunięcia hipotezy, że ten sam mechanizm odpowiedzialny jest za hamowanie reabsorpcji soli w cienkim odcinku ramienia wstępującego pętli.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Abbrecht P.H., Malvin R.L.: Flow rate of urine as a determinant of renal countercurrent multiplier system. *Am.J.Physiol.*, 199,919,1960
2. Appelboom J.W.Th., Bredsky W.A., Tuttle W.S., Diamond J.: The freezing point depression of mammalian tissues after sudden heating in boiling distilled water. *J.Gen.Physiol.*, 41,1153,1958
3. Atherton J.C.: Effect of hydration status on the composition and volume of the renal papilla in the rat. W: Les colloques de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Nephron physiology, 30,69,1974
4. Atherton J.C.: Lability of renal papillary tissue composition in the rat. *J.Physiol.*, 274,323,1978
5. Atherton J.C., Evans J.A., Green R., Thomas S.: Influence of variations in hydration and in solute excretion on the effects of lysine - vasopressin infusion on urinary and renal tissue composition in the conscious rat. *J.Physiol.*, 218,311,1971

6. Atherton J.C., Green R., Thomas S.: Effects of 0,9% saline infusion on urinary and renal tissue composition in the hydropaenic, normal and hydrated conscious rat. *J.Physiol.*, 210,45,1970
7. Atherton J.C., Green R., Thomas S.: Influence of lysine - vasopressin dosage on the time course of changes in renal tissue and urinary composition in the conscious rat. *J.Physiol.*, 213,291,1971
8. Atherton J.C., Green R., Thomas S., Wood J.A.: Time course of changes in renal tissue and urinary composition after cessation of constant infusion of lysine vasopressin in the conscious, hydrated rat. *J.Physiol.*, 222,583,1972
9. Atherton J.C., Hai M.A., Thomas S.: Effects of water diuresis and osmotic /mannitol/ diuresis on urinary solute excretion by the conscious rat. *J.Physiol.*, 197,395,1968
10. Atherton J.C., Hai M.A., Thomas S.: The time course of changes in renal tissue composition during mannitol diuresis in the rat. *J.Physiol.*, 197,411,1968
11. Atherton J.C., Hai M.A., Thomas S.: The time course of changes in renal tissue composition during water diuresis in the rat. *J.Physiol.*, 197,429,1968
12. Bailie M.D., Davis L.E., Loutzenhiser R.: Intrarenal secretion of renin in the dog: effect of furosemide. *Am.J. Physiol.*, 224,425,1973
13. Balint P.: Nierenclearance. Technik, Bewertung, Ergebnisse in Klinik und Experiment Abhandlungen über die pathophy-

siologie der regulationen. Heft 9,61, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1965

14. Beck F., Dotzel W., Rick R., Dörge A., Thureau K.: Electron microprobe analysis of cellular element concentration in rat renal papilla during different states of diuresis. Pflügers Arch. suppl., 391, 1981. Proc. Deutsche Physiologische Gesellschaft
15. Beeuwkes R., Shahood J., Rosen S.: Diuretic effects on thick ascending limb Na^+K^+ ATPase activity: studies by electron probe in rat, rabbit and dog. Kidney Int., 19, 231, 1981
16. Brenner B.M., Keimowitz R.J., Wright F.S., Berliner R.W.: An inhibitory effect of furosemide on sodium reabsorption by the proximal tubule of the rat nephron. J.Clin. Invest., 48, 290, 1969
17. Burg M.B., Stoner L., Cardinal J., Green N.: Furosemide effect on isolated perfused tubules. Am.J.Physiol., 225, 119, 1973
18. Burg M.B.: Thick ascending limb of Henle's loop. Kidney Int., 22, 454, 1982
19. Carriere S., Desrosiers M., Friberg J., Brunette M.G.: The effect of furosemide on the intrarenal blood flow distribution in the dog. Can.J.Physiol.Pharmacol., 50, 774, 1972
20. Chiu P.J.S., Long J.F.: Effects of prostaglandin and kinin synthesis inhibitors on renal responses to furosemide in normal and low-sodium rats. Arch.int.Pharmacodyn., 249, 297, 1981

21. Chrysant S.G., Baxter P.R., Amonette R.L.: The mechanism for the renal hemodynamic and tubular action of furosemide. *Arch.int.Pharmacodyn.*, 249,289,1981
22. Dirks J.H., Cirksena W.J., Berliner R.W.: Micropuncture study of the effect of various diuretics on sodium reabsorption by the proximal tubules of the dog. *J.Clin.Invest.*, 45,1875,1966
23. Dluhy R.G., Wolf G.L., Lauler D.P.: Vasodilator properties of ethacrynic acid in the perfused dog kidney. *Clin.Sci.*, 38,347,1970
24. Duarte C.G., Chomety F., Giebisch G.: Effect of amiloride, ouabain and furosemide on distal tubular function in the rat. *Am.J.Physiol.*, 221,632,1971
25. Eveloff J., Bayerdörffer E., Haase W., Kinne R.: Biochemical and physiological studies on cells isolated from the medullary thick ascending limb of Henle's loop. *Int.J. Biochem.*, 12,55,1980
26. Eveloff J., Bayerdörffer E., Silva P., Kinne R.: Sodium-chloride transport in the thick ascending limb of Henle's loop. Oxygen consumption studies in isolated cells. *Pflügers Arch.*, 389,263,1981
27. Fraser A.G., Cowie J.F., Lambie A.T., Robson J.S.: The effects of furosemide on the osmolality of the urine and the composition of renal tissue. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 158,475,1967

28. Gardner K.D.: Dry weight as a point of reference in studies of renal papillary composition. *Am.J.Physiol.*, 211, 1034, 1966
29. Gardner K.D., Vierling J.M.: Solids, water, and solutes in papillary region of the rat kidney. *Am.J.Physiol.*, 217, 58, 1969
30. Geddes L.A., Baker L.E.: Principles of applied biomedical instrumentation, 390, J.Wiley and Sons, N.York, 1975
31. Gellert R., Sadowski J.: Dynamics of rabbit kidney medullary electrolytes in osmotic diuresis as reflected by tissue conductance recording. IV European Colloquium on Renal Physiology, Praga, 1982
32. Gellert R., Zwolińska J., Grucza R., Sadowski J.: Renal tissue electrical conductivity during mannitol and saline diuresis in the rabbit. XV Zjazd Polskiego Towarzystwa Fiziologicznego, Białystok, 1981
33. Goldberg M.: The renal physiology of diuretics. W: Orloff J., Berliner R.W., *Renal Physiology*, 1003, American Physiological Society, Washington, 1973
34. Greger R.: Chloride reabsorption in the rabbit cortical thick ascending limb of the loop of Henle. A sodium dependent process. *Pflügers Arch.*, 390,38,1981
35. Greger R., Schlatter E., Cassola A.C., Oberleithner H.: Cellular mechanisms involved in secondary active chloride transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit nephron /c TAL/. IV European Colloquium on Renal Physiology, Praga, 1982

36. Gunther R.A., Rabinowitz L.: Urea and renal concentrating ability in the rabbit. *Kidney Int.*, 17,205,1980
37. Hai N.A., Thomas S.: Influence of prehydration on the changes in renal tissue composition induced by water diuresis in the rat. *J.Physiol.*, 205,599,1969
38. Hai N.A., Thomas S.: The time-course of changes in renal tissue composition during lysine vasopressin infusion in the rat. *Pflügers Arch.*, 310,297,1969
39. Hanley M.J.: Studies on acute disease models. *Kidney Int.*, 22,536,1982
40. Hook J.B., Bailie M.D.: Release of vasoactive materials from the kidney by diuretics. *J.Clin.Pharmacol.*, 17,673, 1977
41. Hook J.B., Williamson H.E.: Effect of furosemide on renal modullary sodium gradient. *Proc.Soc.Exper.Biol.Medicine*, 118,372,1965
42. Imai M., Nakamura R.: Function of distal convoluted and connecting tubules studied by isolated nephron fragments. *Kidney Int.*, 22,465,1982
43. Imbs J.L., Schmidt M., Schwartz J.: Intrarenal control of urine concentration by angiotensin II. *Clinical Science and Molecular Medicine*, 55,229,1978
44. Jamison R.L.: Recent advances in the physiology of Henle's loop and the collecting tubule system. *Circ.Res.*, suppl.I, 34,35,91,1974

45. Jamison R.L., Kris W.: Osmotic gradient in the medulla and mass balance w: Urinary concentrating mechanism, 79, Oxford University Press, Oxford, N.York, 1982
46. Johnston PaA., Bernard D.B., Pervin N.S., Levinsky N.G.: Prostaglandins mediate the vasodilatory effect of mannitol in the hypoperfused rat kidney. J.Clin.Invest., 68,127, 1981
47. Kaissling B., Kris W.: Structural analysis of the rabbit kidney w: Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology, 89, Springer Verlag, N.York, 1979
48. Keeton T.K., Cambell W.B.: The pharmacologic alteration of renin release. Pharmacol.Rev., 32,81,1980
49. Knepper M.A.: Measurement of osmolality in kidney slices using vapor pressure osmometry. Kidney Int., 21,653,1982
50. Koepsell H., Nicholson W.A.P., Kris W., Hühling H.J.: Measurements of exponential gradients of sodium and chlorine in the rat kidney medulla using the electron microprobe. Pflügers Arch., 350,167,1974
51. Kokko J.P., Reótor F.G.: Countercurrent multiplication system without active transport in inner medulla. Kidney Int., 2,214,1972
52. Kokko J.P.: Transport characteristics of the thin limbs of Henle. Kidney Int., 22,449,1982
53. Kris W.: Structural organization of the renal medulla: comparative and functional aspects. Am.J.Physiol., 241, 3,1981

54. Kuhn W., Ryffel K.: Herstellung konzentrierter Lösungen aus verdünnten durch blosse Membranwirkung. Ein Modellversuch zur Funktion der Niere. *Z.Physiol.Chem.*, 276,145,1942.
55. Levitin H., Goodman A., Pigeon G., Epstein F.H.: Composition of the renal medulla during water diuresis. *J.Clin. Invest.*, 41,1145,1962
56. Lote C.J., Snape B.M.: 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.*, 270,533,1977
57. Lote C.J.: Renal prostaglandins and sodium excretion. *Quart. J.exp.Physiol.*, 67,377,1982
58. Ludens J.W., Heitz D.C., Brody M.J., Williamson H.E.: Differential effect of furosemide on renal and limb blood flows in the conscious dog. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 171, 300,1970
59. Ludens J.W., Williamson H.E.: Effect of furosemide on renal blood flow in the conscious dog. *Proc.soc.exp.Biol. Med.*, 133,513,1970
60. Luyckx A.S., Mendoza E., Lefebvre P.: Furosemide intravenous infusion in normal men: electrolytic, metabolic and hormonal effects. Lack of changes in basal insulin and glucagon plasma levels. *Arch.int.Pharmacodyn.*, 248,305, 1980
61. Malvin R.L., Wilde W.S.: Washout of renal countercurrent Na gradient by osmotic diuresis. *A^mJ.Physiol.*, 197,177, 1959

62. Manitius A.: Niedobór potasu i jego wpływ na zdolność zagęszczania moczu. *Acta Biol. et Med.Soc.Sc.Gedan.*, 7, 187, 1963
63. Mc Nay J.L., Abe Y.: Redistribution of cortical blood flow during renal vasodilatation in dogs. *Circ.Res.*, 27, 1023, 1970
64. Meng K., Loew D.: *Diuretika. Chemie, Pharmakologie, Therapie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974
65. Neehay B.R. Biochemical basis of diuretic action. *J.Clin. Pharmacol.*, 17, 626, 1977
66. Oberleithner H., Guggins W., Giebisch G.: Effects of furosemide on membrane potentials and intracellular Cl^- activity $/Cl_o/$ in early distal tubule of *Amphiuma*. *Kidney Int.*, 19, 250, 1981
67. Pilkington L.A., Binder R., Haas J.C.M., Pitts R.F.: Intrarenal distribution of blood flow. *Am.J.Physiol.*, 208, 1107, 1965
68. Popper H., Mandel H., Mayer H.: Zur Kreatininbestimmung im Blute. *Biochem.Z.*, 291, 354, 1937
69. Portalska E., Sadowski J.: Renal tissue conductance changes after furosemide injection and after hypertonic saline infusion in the rabbit. IV European Colloquium on Renal Physiology, Praga, 1982
70. Rocha A.S., Kudo L.H.: Water, urea, sodium, chloride and potassium transport in the in vitro isolated perfused papillary collecting duct. *Kidney Int.*, 22, 485, 1982

71. Roch-Ramel F., Peters G.: Intrarenal urea and electrolyte concentrations as influenced by water diuresis and by hydrochlorothiazide. *European J.Pharmacol.*, 1,124,1967
72. Ráiz-Guinazu A., Arrisurieta E.A., Yelinek L.: Electrolyte, water, and urea content in dog kidneys in different states of diuresis. *Am.J.Physiol.*, 206,725,1964
73. Sadowski J., Grucza R., Gellert R., Portalska E.: Renal tissue conductivity studies: a method for dynamic assessment of urine concentration mechanism. XV Zjazd Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego, Białystok, 1981
74. Sadowski J., Portalska E., Gellert R.: In vivo recordings of electrical conductance of renal tissue for dynamic studies of cortico-papillary electrolyte gradient. IV European Colloquium on Renal Physiology, Praga,1982
75. Sadowski J., Portalska E.: Dynamic evaluation of renal electrolyte gradient by in situ tissue impedance studies. *Kidney Int.* /przyjęta do druku/
76. Schlatter E., Greger R.: Mode of action of loop diuretics on the Na^+ , 2Cl^- , K^+ cotransport in rabbit cortical thick ascending limbs of Henle's loops /ETAL/. *Pflügers Arch. suppl.*, 392,14,1982
77. Schwan H.P.: Determination of biological impedances w:
Nastuk W.L., *Physical techniques in Biological Research* vol.VI. *Electrophysiological methods*, 323, Academic Press, N.York and London, 1963

78. Stein J.H., Reineck H.J.: The role of the collecting duct in the regulation of excretion of sodium and other electrolytes. *Kidney Int.*, 6,1,1974
79. Stokes J.B.: Integrated actions of renal medullary prostaglandins in the control of water excretion. *Am.J.Physiol.*, 240,471,1981
80. Stokes J.B.: Ion transport by the cortical and outer medullary collecting tubule. *Kidney Int.*, 22,473,1982
81. Stoner L.G., Trimble M.E.: Effects of MK-196 and furosemide on rat medullary thick ascending limbs of Henle in vitro. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 221,715,1982
82. Wallenstein S., Zucker C.L., Fleiss J.L.: Some statistical methods useful in circulation research. *Circ.Res.*, 47,1, 1980
83. Waugh W.H., Beall P.T.: Simplified measurement of p-aminhippurate and other arylamines in plasma and urine. *Kidney Int.*, 5,429,174
84. Willard H.H., Merrit L.L., Dean J.A.: *Conductance Methods, w: Instrumental methods of analysis*, 716, D.Van Nostrand Co., Princeton, N.Jersey, 1967
85. Williamson H.E.: Furosemide and ethacrynic acid. *J.Clin. Pharmacol.*, 17,663,1977
86. Wirz H., Hargitay B., Kuhn W.: Lokalisation des Konzentrationsprozesses der Niere durch direkte Kryoskopie. *Helv. physiol. pharmacol. Acta*, 9,196,1951.