

ANNA STIEPANOW-TRZECIAK

**UDZIAŁ RECEPTORÓW PURYNOWYCH
W DZIAŁANIU NUKLEOTYDÓW
- Ap₄A i ATP - NA NERKĘ**

Praca doktorska

Praca wykonana

W Katedrze Analityki Klinicznej

Akademii Medycznej w Gdańsku

Promotor:

Dr hab. Mirosława Szczepańska-Konkel

Profesor Nadzwyczajny

GDAŃSK 2005

Mojemu Promotorowi,

Pani Profesor Mirosławie Szczepańskiej-
Konkel, składam serdeczne podziękowania

Za wielką życzliwość, ogromną pomoc
i cenne rady podczas wykonywania tej
pracy.

Serdecznie dziękuję

Pani dr n.farm. Gabrieli Langner
Panu dr med. Maciejowi Jankowskiemu
za życzliwość oraz pomoc wykonywaniu
tej pracy

SPIS TREŚCI

1. STRESZCZENIE	5
2. WSTĘP	7
2.1 Wprowadzenie	7
2.2 Receptory purynowe P1 i P2 i ich lokalizacja w nefronie	8
2.3 Filtracja kłębuszkowa i transport kanalikowy - potencjalna rola nukleotydów adeninowych	12
2.4 Rola układu współczulnego w regulacji funkcji nerek	19
3. CEL PRACY	21
4. MATERIAŁ I METODY	22
4.1 Odnerwienie nerek	22
4.2 Doświadczenia w kłatkach metabolicznych	23
4.3 Doświadczenia klirensowe	23
4.3.1 Metody analityczne	27
4.3.2 Obliczenia i symbole użyte w badaniach klirensowych	29
4.4 Doświadczenia na izolowanych kłębuszkach	33
4.4.1 Izolacja kłębuszków nerkowych	34
4.4.2 Ocena jakościowa i ilościowa otrzymanego preparatu	35
4.4.3 Inkubacja kłębuszków nerkowych z testowanymi związkami	35
4.4.4 Pomiar objętości wewnątrzkapilarnej kłębuszków nerkowych	36
4.5 Obliczenia statystyczne	37
4.6 Odczynniki	37
5. WYNIKI	38
6. DYSKUSJA	62
7. WNIOSKI	71
8. PIŚMIENNICTWO	72

1. STRESZCZENIE

W pracy tej badano działanie nukleotydów adeninowych – Ap₄A i ATP – naturalnych aktywatorów receptorów purynowych na funkcję wydalniczą nerek. Doświadczenia przeprowadzono na znieczulonych szczurach (Wistar, samce 200 – 250g), którym w infuzji dożylniej podawano Ap₄A oraz analogi ATP: β,γ-metylenoATP (β,γ-MeATP) oraz 2-metylotioATP (2-MeSATP). Dodatkowo wykonano doświadczenia na izolowanych kłębuszkach celem określenia wpływu Ap₄A na objętość wewnątrzkapilarną (GIS). Doświadczenia wykazały, że:

1. Infuzja Ap₄A (2 μmol/kg + 20 nmol/min/kg) obniża GFR, RPF, nie zmieniając średniego ciśnienia tętniczego krwi (MAP). Wyliczono, że Ap₄A zwiększa opór naczyń krwionośnych w nerkach (RVR) z wartości 7,0 ± 0,3 do 10,4 ± 0,6 mmHg/ml min (p < 0,05). Natomiast Ap₄A dodany do zawiesiny izolowanych kłębuszków nerkowych (w stężeniu 10 nM) redukuje przestrzeń wewnątrzkapilarną kłębuszków (GIS) o około 18 ± 2,6%
2. Infuzja Ap₄A zwiększa wydalanie jonu sodowego (około 5-krotnie) i diurezę (około 2-krotnie), a działanie to znosi suramina - antagonist receptorów P2.
3. Natriuretyczne i diuretyczne działanie obserwowano również gdy zwierzęta otrzymywały β,γ-MeATP (agon receptorów P2X) lub 2-MeSATP (agon receptorów P2Y). Frakcyjne wydalanie sodu wzrosło około 2-krotnie.
4. Infuzja Ap₄A oraz testowanych analogów ATP powoduje obniżenie klirensu litu (C_{Li}), wskaźnika proksymalnej reabsorpcji sodu.
5. Odnerwienie nerek zmienia odpowiedź nerek na działanie Ap₄A i analogów ATP: natriuretyczne działanie Ap₄A i 2-MeSATP było

zniesione, podczas gdy działanie β,γ -MeATP było około 4-krotnie zwiększone.

Doświadczenia te wskazują na potencjalną rolę receptorów P2X i P2Y w regulacji diurezy i natriurezy oraz prędkości przesączania kłębuszkowego. Ponadto wskazują na istnienie zależności między aktywnością receptorów purynowych a układem współczulnym w nerkach.

2. WSTĘP

2.1 Wprowadzenie

Nerki odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy wodno-elektrolitowej organizmu. Podstawową czynnością nerek, która zapewnia stałość składu chemicznego i objętość płynu pozakomórkowego jest ich funkcja wydalnicza. Funkcja ta uwarunkowana jest szeregiem procesów zachodzących w nerkach, przede wszystkim sprawną hemodynamiką, tj. przepływem krwi przez nerki i filtracją kłębuszkową oraz aktywnością kanalikowego systemu transportowego. U zdrowego dorosłego człowieka przez obie nerki w ciągu jednej minuty przepływa około 1200 ml krwi (ok. 600 ml osocza), z tego 100 ml osocza ulega przesączeniu i ostatecznie powstaje około 1 ml/min moczu, którego głównymi składnikami są: woda, końcowe produkty przemiany azotowej, nadmiar elektrolitów (jony sodowe, potasowe, chlorkowe, fosforanowe) oraz inne zbędne dla organizmu substancje. Zarówno nerkowa hemodynamika, jak i kanalikowy transport jonów i wody podlegają regulacji endokrynnej i parakrynnej. Czynność nerki, narządu bogato unerwionego, w znacznym stopniu jest kontrolowana przez neurotransmitery układu sympatycznego [17].

Podstawową jednostką czynnościową nerek jest nefron. W początkowym jego odcinku – kłębuszku nerkowym – zachodzi proces filtracji osocza krwi przepływającej przez sieć naczyń kapilarnych do torebki Bowmana. W dalszych odcinkach nefronu – kanaliku bliższym (proksymalnym) połączonym poprzez pętlę Henlego z kanalikiem dalszym (dystalnym i zbiorczym) – zachodzą procesy wchłaniania zwrotnego (reabsorpcja) wody, elektrolitów,

metabolitów tj. aminokwasów, glukozy oraz sekrecja jonów wodorowych, potasowych i anionów kwasów organicznych i nieorganicznych. W warunkach fizjologicznych, dzięki mechanizmom równowagi kłębuszkowo-kanalikowej i sprzężeniu kanalikowo-kłębuszkowemu tempo filtracji kłębuszkowej jest stale dostosowywane do zdolności transportowych kanalika i odwrotnie, wchłanianie zwrotne dostosowuje się do tempa filtracji kłębuszkowej [7,27]. Procesy te mogą być regulowane m.in. przez zewnątrzkomórkowe nukleotydy adeninowe i adenozyne, które oddziałują na komórki nefronu poprzez receptory purynowe [46,51,52]. Obecność receptorów purynowych wykazano na całej długości nefronu [76], jednak ich rola w regulacji funkcji nerek nie jest w pełni wyjaśniona.

2.2 Receptory purynowe P1 i P2 i ich lokalizacja w nefronie

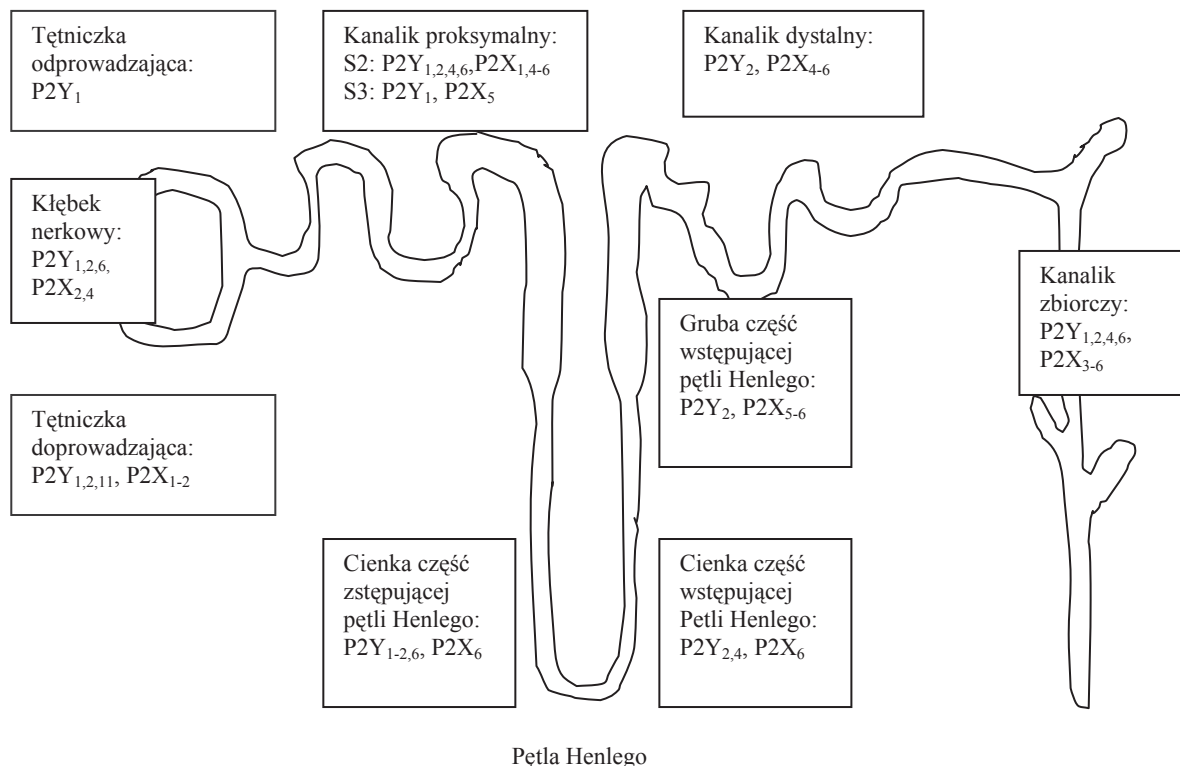
Badania ostatnich kilkunastu lat dostarczają wiele danych na temat roli pozakomórkowych nukleotydów – głównie ATP i ADP, a także dinukleotydów adeninowych i ich produktu degradacji – adenozyny – w sygnałowaniu międzykomórkowym. Obecnie wiadomo, że wiele różnych komórek i tkanek może reagować na pojawiające się w środowisku zewnątrz-komórkowym nukleotydy i nukleozydy. W 1972 r. Burnstock zaproponował istnienie specyficznych błonowych receptorów dla ATP, a kilka lat później, na podstawie kolejnych dowodów farmakologicznych nazwał tę grupę receptorów purynergicznymi i dokonał ich pierwszego podziału [11]. Receptory purynergiczne, dla których naturalnym agonem jest adenozyne, tworzą grupę receptorów P1, natomiast receptory dla ATP tworzą grupę receptorów P2. Późniejsze badania wykazały, że do

grupy P2 należą również receptory nukleotydów pirymidynowych, takich jak UTP oraz UDP [23].

Receptory P1 - na podstawie badań farmakologicznych i biochemicznych, jak również w oparciu o analizę sekwencji aminokwasów, receptory P1 - podzielono na cztery podtypy: A_1 , A_{2A} , A_{2B} oraz A_3 [34]. Receptory A_1 i A_{2A} cechują się wysokim powinowactwem do adenozyiny (nM) natomiast receptory A_{2B} oraz A_3 cechują się niskim powinowactwem do adenozyiny (μ M). Receptory A_1 związane są z podrodziną wrażliwych na toksynę krztuśca białek G: G_i (hamujących aktywność cyklazy adenylanowej) oraz G_o . Głównym efektem aktywacji receptorów A_1 jest zahamowanie aktywności cyklazy adenylanowej i obniżenie poziomu cyklicznego AMP w komórce. Receptory A_1 mogą również hamować aktywność fosfolipazy C typu β . Z kolei receptory typu A_{2A} o wysokim powinowactwie do adenozyiny oraz receptory typu A_{2B} o niskim powinowactwie do adenozyiny związane są z podrodziną białek G - G_s (stymulujące), które są wrażliwe na toksynę cholery. Wynikiem aktywacji tych białek jest stymulacja aktywności cyklazy adenylanowej i zwiększenie wytwarzania cyklicznego AMP – wewnątrz-komórkowego przekaźnika informacji. Z kolei receptor typu A_3 , podobnie jak A_1 , jest związany głównie z białkiem G_i , czyli białkiem hamującym cyklazę adenylanową [28, 30].

Receptory P2 - na podstawie różnic w wewnątrzkomórkowym mechanizmie przekazywania sygnału – podzielono na dwa podtypy: P2X i P2Y [1]. Receptory P2X są kanałami jonowymi bramkowanymi ligandami takimi jak ATP, ADP. Związanie liganda z receptorem prowadzi do otwarcia kanału jonowego i transportu jonów Na^+ , K^+ , Ca^{2+} przez błonę komórkową. Receptory P2X występują na komórkach pobudliwych, takich jak komórki mięśni

gładkich, czy neurony oraz na komórkach glejowych [49]. Są odpowiedzialne za skurcz mięśni gładkich, szczególnie w układzie naczyniowym oraz w pęcherzu moczowym. Biorą udział w procesach neurotransmisji [10]. Obecnie wyodrębniono 7 podtypów receptorów P2X₍₁₋₇₎. Wiele z nich zlokalizowano na komórkach kanalików nerkowych [62,63]. Receptory P2Y, tzw. metabotropowe, należą do grupy receptorów związanych z białkiem G. Aktywacja receptorów P2Y prowadzi do uruchomienia kaskady wtórnych przekaźników informacji. Za pośrednictwem białek G zostaje uruchomiona fosfolipaza C (PLC), która hydrolizuje fosfatydylo-inozytolo-(4,5)-difosforan (PIP₂) do diacyloglicerolu (DAG) i inozytolo-(1,4,5)-trifosforanu (IP₃). DAG z kolei aktywuje kinazę białkową C, natomiast IP₃ działa na receptory znajdujące się w błonie siateczki śródplazmatycznej. W wyniku działania IP₃ dochodzi do uwalniania wapnia z wewnątrz-komórkowych magazynów, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu stężenia jonów wapnia w cytoplazmie. W nerkach receptory P2Y występują zarówno na komórkach mikronaczyń oraz komórkach kanalików [62,63]. Badania ostatnich lat wykazały, że w nerkach aktywacja receptorów P2Y prowadzi do skurczu, bądź rozkurczu naczyń doprowadzających i naczyń kapilarnych kłębuszka nerkowego [32,67], co w konsekwencji rzutuje na prędkość przesączania kłębuszkowego.



Schemat 1. Lokalizacja receptorów P2 (X i Y) w obrębie nefronów

Na komórkach kłębuszka nerkowego i tętniczki doprowadzającej są obecne receptory P2X i P2Y, a na tętnicy odprowadzającej – P2Y. Na komórkach kanałika proksymalnego – głównie w odcinku drugim (S2) i odcinku trzecim (S3) występują receptory P2X i P2Y. Receptory te występują również na komórkach pętli Henlego – cienkim ramieniu zstępującym i wstępującym, grubej części ramienia wstępującego oraz dalszych odcinkach – tj. kanałiku dystalnym i kanałiku zbiorczym. (Źródło: Unwin R., Bailey M., Burnstock G.: *Purinergic Signaling Along the Renal Tubule: The Current State of Play*; *News Physiol Sci* 18: 237-241, 2003)

2.3 Filtracja kłębuszkowa i transport kanalikowy - potencjalna rola nukleotydów adeninowych

Pierwszy etap tworzenia moczu zachodzi w kłębuszkach nerkowych. Kłębuszek wchodzi w skład sieci naczyń tętniczych nerki. Tętniczka doprowadzająca kłębka rozwidla się w przestrzeni ograniczonej torebką Bowmana, tworząc pęczek naczyń kapilarnych, które ponownie łączą się w tętniczkę odprowadzającą kłębuszka, dając początek naczyniu około-kanalikowemu. Przestrzeń torebki kłębuszka w swoim biegunie przeciwnym do bieguna naczyniowego, przechodzi w kanalik. Osocze krwi płynącej naczyniami włosowatymi kłębuszków nerkowych ulega przesączaniu przez ścianę tych naczyń do torebki Bowmana. Prędkość filtracji kłębuszkowej (ang. glomerular filtration rate; GFR) jest determinowana przez efektywne ciśnienie filtracyjne, które stanowi różnicę między ciśnieniem hydrostatycznym w świetle naczyń kapilarnych kłębuszka, a przeciwnym ciśnieniem onkotycznym osocza i hydrostatycznym przesączu. Tempo filtracji zależy też od efektywnej wielkości powierzchni sączącej i jej przepuszczalności, liczbowo wartości te opisuje współczynnik filtracyjny (Kf) [2]. W warunkach doświadczalnych wykazano, że zarówno efektywne ciśnienie filtracyjne, jak i wielkość powierzchni filtracyjnej oraz jej przepuszczalność podlegają regulacji. W regulacji tempa filtracji kłębuszkowej uczestniczą komórki, które są efektorami skurczu i relaksacji. Do nich należą komórki mięśniówki gładkiej tętniczek doprowadzających i odprowadzających kłębuszka, które poprzez skurcz i relaksację zmieniają oporność naczyniową. Dzięki temu regulują przepływ krwi przez kłębuszki i ciśnienie hydrostatyczne w świetle naczyń kapilarnych – główną siłę napędzającą przesączanie.

Odpowiednikiem tych komórek w kłębuszku są mezangiocyty, które wraz z macierzą pozakomórkową tworzą mezangium [36]. Efektorami skurczu są również podocyty [48]. Mezangiocyty i podocyty wraz z śródbłonkiem naczyń i błoną podstawną tworzą ścianę naczyń kapilarnych kłębuszka. Mezangiocyty poprzez możliwość skurczu i relaksacji regulują przepływ krwi przez naczynia kapilarne oraz zmniejszają i zwiększają powierzchnię filtracyjną. Podocyty w świetle ostatnich badań są komórkami zdolnymi do skurczu izomerycznego, co umożliwia utrzymanie kulistego kształtu kłębuszka nerkowego [37]. Na powierzchni komórek kurczliwych kłębuszka wykazano szereg receptorów dla substancji naczynioruchowych (obkurczających i rozkurczających) takich jak angiotensyna II [8,21], wazopresyna [4], endotelina [64], peptydy natriuretyczne [68,78], prostaglandyny [19], dopomina [12], ATP [60], adenozyne [50]. Wykazano również, że stopień obkurczenia komórek mezangialnych i podocytów jest regulowany aktywnością komórek śródbłonkowych kłębuszka, zdolnych do produkcji i wydzielania związków o właściwościach parakrynych. Komórki te pod wpływem sygnałów zewnątrzkomórkowych wydzielają między innymi tlenek azotu [65], prostacyklinę [26], czynniki działające rozkurczająco na komórki kurczliwe kłębuszka. Dzięki powyższym właściwościom komórek tworzących strukturę kłębuszka nerkowego oraz tętniczki doprowadzającej i odprowadzającej, kłębuszki obdarzone są swoistym aparatem kurczliwym, który stanowi podstawowy system regulujący tempo przepływu krwi przez kłębuszki i filtracji.

Filtracja kłębuszkowa na poziomie pojedynczego nefronu podlega autoregulacji dzięki mechanizmowi zwrotnego sprzężenia kanalikowo – kłębuszkowego. Anatomiczną strukturę sprzężenia kanalikowo – kłębuszkowego stanowi aparat przykłębkowy,

składający się z zespołu komórek prostego odcinka kanalika dystalnego, zwanego plamką gęstą, komórek mezangium zewnętrznego oraz komórek ściany tętniczki doprowadzającej i częściowo odprowadzającej kłębka. W warunkach zwiększonego ładunku sodu przepływającego przez kanalik, plamka gęsta odbiera sygnał ze światła kanalika i w odpowiedzi na ten sygnał dochodzi do obkurczenia naczynia doprowadzającego i/lub mezangium kłębka. Efektem tego jest obniżenie przesączania kłębuszkowego. Postulowany jest pogląd, że substancjami sygnałnymi mogą być adenozyzna [51] i ATP [46]. Aktywność systemu sprzężenia kanalikowo – kłębuszkowego może ulegać modyfikacji pod wpływem różnych czynników fizjologicznych, np. dieta niskosodowa aktywuje mechanizm sprzężenia, przypuszczalnie poprzez stymulację produkcji angiotensyny II [73]. Wiele czynników farmakologicznych - tj. teofilina - niespecyficzny antagonist receptorów P1 - [53], saralazyna [55], werapamil [41] – blokują mechanizm ujemnego sprzężenia kanalikowo – kłębuszkowego.

W ostatnich kilkunastu latach wiele uwagi poświęcono roli receptorów purynowych w regulacji przepływu krwi i filtracji kłębuszkowej, ze względu na to, że naturalne ligandy tych receptorów (ATP, ADP, adenozyzna) mogą być uwalniane przez wszystkie typy komórek występujących w nefronie i oddziaływać na te komórki na drodze auto-/parakrynej.

W doświadczeniach na znieczulonych szczurach wykazano, że adenozyzna pojawiająca się w płynie pozakomórkowym hamuje filtrację kłębuszkową stymulowaną przedsionkowym czynnikiem natriuretycznym (ANF) [3,72]. Z kolei adenozyzna dodana do zawiesiny izolowanych kłębuszków nerkowych silnie je obkurcza poprzez aktywację receptorów A1 [73]. Późniejsze badania wykazały,

że ATP - poprzez aktywację receptorów P2Y, a następnie aktywację syntazy tlenu azotu i cytoplazmatycznej cykazy guanylanowej - rozkurcza izolowane kłębuszki, uprzednio obkurczone angiotensyną II [31]. Z kolei, gdy kłębuszki były rozkurczone, ATP – za pośrednictwem receptorów P2X i P2Y - wywoływał ich skurcz. Autorzy pracy postulują, że dwukierunkowe działanie ATP na dynamikę kłębuszków nerkowych wynika z zaangażowania komórek śródbłonna naczyń (odpowiedzialnych za rozkurczanie) oraz komórek kurczliwych kłębuszka (mezangiocyty, podocyty) [32].

Wiedzę na temat potencjalnej roli systemu purynergicznego w regulacji mikrokrazenia w nerkach wzbogacają ostatnio publikowane dane na temat działania dinukleotydów adeninowych tj. diadenozynopolifosforanów (ogólny wzór AP_nA , gdzie n = liczba reszt fosforanowych). Związki te uwalniane z komórek (w większych ilościach z ziarnistości gęstych płytek krwi [22] i zakończeń nerwowych [44]) są naturalnymi ligandami receptorów P2, a także potencjalnym źródłem pozakomórkowych mononukleotydów i nukleozydów. Wysoka aktywność w kłębuszkach nerkowych ektoenzymów hydrolizujących dinukleotydy do naczynioaktywnych mononukleotydów (ATP i ADP), i dalej do adenozyiny, wskazuje na unikatowy charakter purynergicznego sygnałowania w tej części nefronu. W naszym laboratorium wykazano, że dinukleotydy tj. Ap_3A , Ap_4A i Ap_5A zmieniają - za pośrednictwem receptorów P2 - objętość wewnątrzkapilarną kłębuszków [69]. Autorzy sugerują, że związki te mogą modyfikować funkcję nefronów *per se* i/lub poprzez uwalnianie w wyniku hydrolizy ATP. Główny pod względem ilościowym przedstawiciel tej grupy Ap_4A podany do ogólnego krążenia krwi znieczulonych szczurów w ilościach mikromolarnych - podobnie do NAD (prekursor adenozyiny) – hamuje prędkość przesączania

kłębuszkowego i przepływ krwi przez nerki. Jednakże Ap_4A przeciwnie do NAD wybiórczo stymuluje natriurezę i diurezę, co sugeruje działanie tego związku na system transportu kanalikowego [38].

Aktywność złożonego systemu transportowego w kanalikach nerkowych decyduje o objętości i składzie ostatecznie wydalanego moczu. Intensywna reabsorpcja przesącza zachodzi w pierwszym odcinku kanalika proksymalnego na drodze transcelularnej (transport przezkomórkowy) i paracelularnej (transport międzykomórkowy). Wraz z jonami sodu do komórki są transportowane: jony chlorkowe, glukoza, aminokwasy, wodorowęglany oraz reszty kwasów (fosforowego, octowego, cytrynowego, mlekowego). Kation sodu zastępuje też w komórce wychodzący z niej jon wodorowy (transport wymienny). Transport jonu sodowego do komórki zachodzi dzięki gradientowi stężenia Na^+ utrzymywanemu przez Na^+ , K^+ -ATP-azę (pompa sodowo-potasowa), która aktywnie wyrzuca sól z komórki. Wysoką aktywność pompy sodowo-potasowej stwierdzono w kanaliku proksymalnym, w ramieniu wstępującym pętli Henlego oraz w kanaliku dystalnym, gdzie jej aktywność jest regulowana przez aldosteron. Płyn opuszczający kanalik proksymalny jest izotoniczny w stosunku do osocza, co oznacza, że w tej części nefronu nie dochodzi do zagęszczania ani rozcieńczenia przesącza kłębuszkowego, a jedynie do redukcji jego objętości. W dalszej części nefronu, głównie w kanaliku zbiorczym, zachodzi proces zagęszczania moczu, jako wynik transportu wody, który jest uwarunkowany z jednej strony hiperosmią płynu śródmiąższowego rdzenia nerki, a z drugiej strony – obecnością wazopresyny (hormon antydiuretyczny - ADH). Na komórkach kanalików zbiorczych znajdują się receptory V2 dla ADH, umiejscowione na błonie przypodstawno – bocznej. Interakcja ADH

z receptorem prowadzi do aktywacji cyklicznej adenylanowej i wzrostu wytwarzania wewnątrz-komórkowego mediatora - cyklicznego AMP, a ten z kolei aktywuje kinezę białczanową odpowiedzialną za fosforylację białek. Fosforylacja białek błony luminalnej kanalików dalszych i zbiorczych czyni błony przepuszczalne dla wody. Wykazano, że ADH - za pośrednictwem cyklicznego AMP - stymuluje translokację akwaporyn (AQP2) – do błon komórkowych kanalika, poprzez które są transportowane cząsteczki wody [63]. W 2003r. Peter Agre oraz Roderick MacKinnon otrzymali nagrodę Nobla w dziedzinie chemii, za odkrycie akwaporyn w błonach komórkowych, specyficznych białek tworzących kanały w błonie.

Transport elektrolitów i innych substancji przez błony plazmatyczne komórek epitelialnych kanalików nerkowych również zachodzi za pośrednictwem specyficznych białek. Ilość białek transportowych w błonie jest czynnikiem warunkującym wielkość transportu. Z kolei wielkość transportu jest regulowana przez hormony i substancje parakrynne. Czynniki te wiążą się z odpowiednimi receptorami błonowymi zmieniając wewnątrz-komórkowe stężenie cyklicznego AMP/cyklicznego GMP, a przez to wpływają na aktywność kinaz białkowych A/C. Np. parathormon (PTH) poprzez cykliczny AMP indukuje wewnątrzkomórkową degradację białka-transportującego Na-Pi, czego efektem jest zahamowanie reabsorpcji fosforanów z moczem [56]. Jak wspomniano powyżej, ADH – za pośrednictwem cyklicznego AMP zwiększa ilość białek transportowych dla wody (akwaporyn) w błonie luminalnej komórek kanalika zbiorczego. W doświadczeniach *in vitro* ATP hamuje działanie wazopresyny w kanalikach zbiorczych rdzenia wewnętrznego nerek szczura [20]. Wykazano, że adenozyne zmniejsza indukowaną wazopresyną

przepuszczalność hydrauliczną w izolowanych kanalikach zbiorczych, prawdopodobnie poprzez receptory A_1 [18]. W doświadczeniach *in vitro* na komórkach kanalików zbiorczych, pochodzących z hodowli komórkowej, wykazano obecność receptorów dla angiotensyny IV, związanych z cyklazą adenylanową [16]. Z kolei w kanaliku proksymalnym adenozylna – za pośrednictwem receptorów A_1 – podobnie jak angiotensyna II – za pośrednictwem receptorów AT_1 stymuluje wchłanianie zwrotne sodu [14].

Hormon natriuretyczny (ANF) wydzielany przez komórki przedsionków serca - w sytuacjach związanych z retencją sodu w organizmie i zwiększoną objętością krwi krążącej – hamuje reabsorpcję sodu w kanalikach nerkowych. Receptory dla ANF są zlokalizowane na komórkach kanalika dystalnego, a ich aktywacja zwiększa syntezę cyklicznego GMP w komórkach, który z kolei hamuje kanały sodowe wrażliwe na amylorid [66]. Wykazano również w doświadczeniach na perfundowanych kanalikach zbiorczych nerek myszy, że amylorido-wrażliwe kanały sodowe są również hamowane przez analogi ATP – agony receptorów P_2Y_2 [40]. Z kolei w innych doświadczeniach prowadzonych na hodowlach komórek linii A6-NHE3 wykazano, że pozakomórkowe nukleotydy adeninowe hamują wymianę jonu sodowego na jon wodorowy [5]. W innych doświadczeniach wykazano, że zewnątrzkomórkowe nukleotydy hamują działanie PTH na komórki kanalików nerkowych, przez co zmniejszają fosfaturię [39]. Z powyższych doświadczeń wynika, że pozakomórkowe nukleotydy za pośrednictwem receptorów purynowych mogą regulować kanalikowy transport jonów i wody. Jak do tej pory niewiele jest danych na temat działania tych związków w warunkach *in vivo* na funkcję wydalniczą nerek.

2.4 Rola układu współczulnego w regulacji funkcji nerek

Jednym z istotnych czynników regulujących funkcję wydalniczą nerek jest aktywność układu współczulnego nerek. Nerki szczura są narządem dobrze unerwionym włóknami wywodzącymi się głównie ze zwojów współczulnych. W nerkach, nerwy towarzyszą sieci naczyń tętniczych, a zatem gęstość zakończeń nerwowych jest najwyższa w najbardziej ukrwionych częściach nerki tj. części korowej i warstwie rdzenia zewnętrznego. Największą gęstość zakończeń nerwowych stwierdzono przy tętniczce doprowadzającej i odprowadzającej, aparacie przykłębkowym, kanaliku proksymalnym, części grubej ramienia wstępującego pętli Henlego, kanaliku krętym dalszym. Zmiany aktywności nerkowego układu sympatycznego bezpośrednio wpływają na funkcję poszczególnych, unerwionych struktur nefronu. Aktywność układu sympatycznego nerek może być doświadczalnie regulowana. Wykazano, że jednym z czynników modulujących aktywność układu współczulnego nerek jest angiotensyna II lokalnie powstająca w ośrodkowym układzie nerwowym [33]. Pobudzenie układu sympatycznego nerek prowadzi do wzrostu wchłaniania zwrotnego sodu i wody, a jednym z mechanizmów tego działania jest aktywacja systemu renina-angiotensyna. W wyniku wzrostu wydzielania reniny z aparatu przykłębuszkowego wzrasta aktywność układu renina-angiotensyna, co również przyczynia się do retencji jonów sodu. W sytuacji silnego stresu czy bardzo dużego wysiłku fizycznego może nawet dojść do spadku przepływu krwi przez nerki, jak również i filtracji kłębuszkowej. Z drugiej strony obniżenie aktywności układu sympatycznego skutkuje tylko wzrostem wydalania sodu i spadkiem

wydzielania reniny, bez uchwytnych zmian w przepływie krwi przez nerki czy filtracji kłębuszkowej. Jest to wynikiem niskiej podstawowej aktywności układu współczulnego nerek i braku tonicznego wpływu na układ naczyniowy nerek.

W zakończeniach układu sympatycznego naturalnym przekaźnikiem sygnału jest noradrenalina. Wykazano, że towarzyszy jej ATP oraz neuropeptyd Y. Z innych przekaźników biorących udział w sygnałowaniu w nerkach wymienić należy: dopaminę, substancję P, wazoaktywny peptyd jelitowy i peptyd zależny od genu kalcytoniny [17]. Zakończenia nerwowe są również źródłem Ap_4A , który po hydrolizie w przestrzeni pozakomórkowej jest źródłem ATP oraz adenozyne, które zwiększają aktywność nerwów czuciowych oraz modyfikują uwalnianie neurotransmiterów [44]. Tak, więc zakończenia nerwowe są bogate w noradrenalinę oraz związki purynowe, a to z kolei implikuje możliwość występowania szeregu wzajemnych oddziaływań pomiędzy sygnałowaniem adrenergicznym i purynergicznym. Podczas pobudzenia neuronów cholinergicznym acetylocholina uwalnia się z zakończeń synaptycznych razem z ATP oraz dinukleotydami adeninowymi [57]. Aktywacja neuronów adrenergicznych i noradrenergicznych również prowadzi do uwolnienia ATP i diadenozynopolifosforanów wraz z adrenaliną lub noradrenaliną. W doświadczeniach, w których mierzono zmiany potencjału błonowego wykazano, że uwalniane z zakończeń nerwowych dinukleotydy (głównie Ap_5A) powodują depolaryzację błony neuronu [58].

Dlatego też w obecnej pracy oceniano działanie nukleotydów purynowych na funkcję nerek w warunkach obniżonej aktywności układu współczulnego (poprzez odnerwienie).

3. CEL PRACY

Głównym celem pracy była ocena potencjalnej roli receptorów purynowych należących do grupy P2 w regulacji funkcji nefronów w warunkach podwyższonego stężenia diadenozynotetrafosforanu (Ap_4A) we krwi, prekursora ATP i adenozyiny w płynie pozakomórkowym.

Ponadto podjęto próbę ustalenia wzajemnej relacji między systemem purynergicznym a układem adrenergicznym w nerkach, wykorzystując model nerki odnerwionej.

W doświadczeniach klirensowych – umożliwiających pomiar parametrów funkcji nerek tj. filtrację i przepływ krwi przez nerki, diurezę i reabsorpcję sodu w kanalikach nerkowych – badano działanie Ap_4A w obecności antagonów receptorów P: teofiliny (antagon receptorów P1) i suraminy (antagon receptorów P2), a następnie działanie Ap_4A porównano z działaniem swoistych agonów receptorów P2: β,γ -metylenoATP (agon receptorów P2X) i 2-metylotioATP (agon receptorów P2Y).

4. MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na szczurach samcach Wistar, ważących od 200 do 250g; zwierzęta pochodziły z hodowli z Instytutu Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN (Warszawa). Zwierzęta przed doświadczeniami przebywały, przez co najmniej siedem dni, w pomieszczeniu dla zwierząt laboratoryjnych, z klimatyzacją ciepłą i oświetleniem 12-godzinnym na dobę oraz z nieograniczonym dostępem do paszy Labofeed H (Wytwórnia pasz i koncentratów, Kcynia) i wody wodociągowej. Doświadczenia na zwierzętach wykonywano za zgodą Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach Akademii Medycznej w Gdańsku. Materiałem badanym była krew tętnicza pobrana z żyły udowej oraz mocz pobrany bezpośrednio z pęcherza (w doświadczeniach klirensowych), a także mocz zebrany w klatkach metabolicznych. W jednej serii doświadczeń materiałem badanym były kłębuszki izolowane z nerek szczura.

Doświadczenia klirensowe przeprowadzono na trzech grupach szczurów:

- I grupa – szczury (normalne) nie poddawane żadnym zabiegom (n=90)
- II grupa – szczury po obustronnym odnerwieniu nerek (n = 15)
- III grupa – szczury po zabiegu pozorowanym (n = 15)

4.1. Odnerwienie nerek

Zabieg odnerwienia nerek wykonano na zwierzętach (n = 15) po uprzednim znieczuleniu Inaktyną w dawce 100 mg/kg ciężaru ciała

(c.c.) Po nacięciu skóry po stronie grzbietowej szczura rozchylano tkanki i wypreparowano nerki tak, aby uwidocznić tętnice nerkowe. Od tętnicy nerkowej lewej i prawej odpreparowano nerwy, które następnie przecięto. Przecięte nerwy przyżegano 10% roztworem fenolu w etanolu. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, którym wykonano zabieg pozorowany, polegający na uwidocznieniu tętnic nerkowych bez przecinania nerwów i przyżegania. Następnie ranę zaopatrzone chirurgicznie.

4.2. Doświadczenia w klatkach metabolicznych

Ósmego dnia po zabiegu odnerwienia nerek oraz zabiegu pozorowanym przeprowadzono dobową zbiórkę moczu. W tym celu zwierzęta umieszczono na 24 godziny w klatkach metabolicznych, zapewniając im dostęp do paszy i wody. W ilościowo zebranych moczach oznaczono stężenie sodu i potasu. Wyliczono, że dobowe wydalanie sodu u zwierząt po zabiegu pozorowanym wynosiło $1,45 \pm 0,2$ mmol, a w grupie po obustronnym odnerwieniu nerek $2,46 \pm 0,3$ mmol.

4.3. Doświadczenia klirensowe

W dniu doświadczenia zwierzęta znieczulano podając dootrzewnowo Inaktyne w dawce 100 mg/kg c.c.. Znieczulone zwierzęta umieszczano na podgrzewanym stoliku operacyjnym (JWElectronic) umożliwiającym utrzymanie stałej temperatury ciała 37°C. W celu zapewnienia swobodnej wentylacji płuc przeprowadzono tracheostomię, umieszczając w tchawicy dopasowaną rurkę polietylenową o średnicy 2 mm. W prawym dole

udowym odsłanianio żyłę i tętnicę udową. Do żyły wprowadzano dren polietylenowy o średnicy 0,3 mm, przez który podawano płyn infuzyjny o następującym składzie: 140 mmol/l NaCl z dodatkiem [³H] inuliny (5 μCi/ml) oraz p-aminohipuranu sodu (PAH; 1mg/ml) i heparyny (5 U/ml). W doświadczeniach, w których badano wydalanie litu płyn infuzyjny dodatkowo zawierał chlorek litu w stężeniu 10 mM. Płyn infuzyjny podawano ze stałą prędkością, 45 μl/min, przy użyciu pompy (ATI Orion). Do tętnicy udowej wprowadzono dren polietylenowy o średnicy 0,3 mm, który połączony z urządzeniem służącym do pomiaru ciśnienia (Stoelting) umożliwiał bezpośredni pomiar średniego ciśnienia tętniczego krwi. Infuzję ciągłą płynu poprzedzono jednorazowym dotętnicznym podaniem 0,5 ml płynu w ciągu 1minuty. Po upływie 30 minut od momentu rozpoczęcia infuzji odsłanianio pęcherz moczowy przez nacięcie powłok brzucha. Do nakłutego na szczycie pęcherza wprowadzano dren polietylenowy o średnicy 3 mm. Pęcherz podwiązywano na drenie. Poprzez dren swobodnie sphywał mocz do kalibrowanej probówki typu Eppendorf. Po ustaleniu diurezy na stałym poziomie (po około 90 minutach od włączenia infuzji) zbierano mocz w 5 przedziałach 20 minutowych. W czasie każdej zbiórki moczu, z tętnicy udowej pobierano krew tętniczą (po około 100μl). Pierwsze dwie kolejne zbiórki moczu i próbki krwi traktowano jako materiał kontrolny. Bezpośrednio po tym okresie kontrolnym kontynuowano infuzję płynu włączając badane związki - zgodnie z odpowiednim protokołem przedstawionym poniżej. W pobranych próbkach oznaczano stężenie PAH, radioaktywność [³H] inuliny oraz stężenie sodu, potasu, chlorku oraz fosforanów, a w doświadczeniach, w których, użyto LiCl, w moczu i we krwi oznaczono stężenie Li.

Protokół doświadczeń klirensowych:

Działanie Ap₄A na hemodynamikę i czynność wydalniczą nerek

Bezpośrednio po okresie kontrolnym zwierzęta otrzymywały Ap₄A w dwóch dawkach:

- (I) pierwsza grupa (n = 5) 0,2 μmol/kg jednorazowo i 2 nmol/min/kg w infuzji ciągłej,
- (II) druga grupa (n = 8) 2 μmol/kg jednorazowo i 20 nmol/min/kg w infuzji ciągłej.

Działanie Ap₄A (2 μmol/kg + 20 nmol/min/kg) na funkcję nerek w obecności antagonistów receptorów P1 (teofiliny) i P2 (suraminy)

Po okresie kontrolnym jednej grupie szczurów (n = 8) włączono w infuzję dożylną teofilinę (0,8 μmol/kg + 0,2 μmol/min/kg c.c.), a drugiej (n = 6) suraminę (12 mg/kg c.c. + 0,18 mg/min/kg c.c.). Obydwóm grupom po 20 minutach dodatkowo włączono Ap₄A.

Działanie analogów ATP (β,γ-MeATP i 2-MeSATP) – specyficznych agonów receptorów P2 na funkcję nerek

Bezpośrednio po okresie kontrolnym jednej grupie zwierząt (n = 8) podawano dożylnie β,γ-Me-ATP, a drugiej (n = 8) 2-MeSATP. Każdy ze związków podawano w dawce jednorazowej 2 μmol/kg c.c. oraz w dawce podtrzymującej 20 nmol/min/kg c.c. przez 60 minut.

Wpływ odnerwienia na działanie Ap_4A i analogów ATP (β,γ -MeATP i 2-MeSATP) na funkcję nerek

Doświadczenia przeprowadzono na grupie zwierząt po uprzednim odnerwieniu nerek oraz grupie kontrolnej (po zabiegu pozorowanym). Bezpośrednio po okresie kontrolnym podawano testowane związki - Ap_4A , β,γ -MeATP oraz 2-MeSATP - w dawce po 2 $\mu\text{mol/kg}$ + 20 nmol/min/kg przez 60 minut. W każdej grupie $n = 5$.

4.3.1 Metody analityczne

[³H] Inulina - pomiar radioaktywności w moczu i w surowicy oznaczano metodą płynnej scyntytacji przy użyciu licznika scyntylnacyjnego Wallac 1409. Do naczyń scyntylnacyjnych dodawano 20 µl próby badanej i 0,5 ml płynu scyntylnacyjnego (Ultima Gold Sigma). Następnie próbki inkubowano w temperaturze pokojowej w zaciemnionym miejscu. Po 30 minutach dokonywano pomiaru radioaktywności, wyniki wyrażono w cpm / próbkę badaną.

p-Aminohipuran sodu – stężenie w moczu i odbiałzonej surowicy oznaczono metodą Brattona i Marshala [9]. 0,1% azotyn sodowy przechowywany w temp. < 0 °C jest trwały przez tydzień, 0,1% N-(1-naftylo)-etylenodwuamina przechowywana w ciemnej butelce w temp. < 0 °C jest trwała miesiąc. Pozostałe odczynniki przechowywane w temp. pokojowej są trwałe nieograniczenie. Kalibracji metody dokonywano w oparciu o krzywą wzorcową z użyciem wzorca p-Aminohipuranu sodu (Sigma) w zakresie stężeń od 5,75 – 230 nmol/l. Absorbancję próby badanej i wzorcowej odczytano względem próby ślepej przy $\lambda = 546$ nm. Współczynnik zmienności oznaczeń w serii niejednoczesnej wynosił $\pm 8\%$ dla całego zakresu stężeń.

Fosforany – stężenie w moczu i surowicy oznaczano zmodyfikowaną metodą Gomoriego [25]. Modyfikacja metody polegała na dodaniu do 100 ml odczynnika molibdeno-siarkowego 0,3 ml Tweenu 80, zastępując inny reduktor, jakim jest metol. Trwałość odczynnika molibdenowo-siarkowego wynosi około 7 dni. Trwałość pozostałych odczynników jest nieograniczona. Kalibracji metody dokonywano w

oparciu o krzywą wzorcową z użyciem wzorca K_2HPO_4 (POCH Gliwice) w zakresie stężeń od 0,15 – 0,5 mmol/l. Jako wzorca roboczego użyto 1 mmol/l roztworu Pi. Absorbancję próby badanej i wzorcowej odczytano względem próby ślepej przy $\lambda = 360$ nm. Współczynnik zmienności oznaczeń w serii niejednoczesnej wynosił $\pm 6\%$ dla całego zakresu stężeń.

Sód, potas, chlorek – stężenie w moczu i surowicy oznaczano przy użyciu elektrody jonoselektywnej. Oznaczenia wykonano w Centralnym Laboratorium Akademickiego Centrum Klinicznego SPSK AM w Gdańsku na analizatorze Architect c 8000 według rutynowych procedur.

Lit – stężenie w moczu i surowicy oznaczono metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej. Oznaczenia wykonano w Centralnym Laboratorium Akademickiego Centrum Klinicznego SPSK AM w Gdańsku na spektrometrze Philips PU 9100X według rutynowych procedur.

4.3.2 Obliczenia i symbole użyte w badaniach klirensowych.

Pobrane próbki moczu i krwi tętniczej posłużyły do określenia filtracji kłębuszkowej, przepływu osocza i krwi przez nerki, oporności naczyń nerkowych, diurezy oraz wydalania elektrolitów. W tym celu zastosowano standardowe wzory:

Diureza (V) – objętość wydalonego moczu w ciągu jednej minuty określano w następujący sposób:

$$V [\mu\text{l}/\text{min}] = \frac{\text{Objętość moczu } [\mu\text{l}]}{\text{czas zbiórki } [\text{min}]}$$

Filtracja kłębuszkowa (GFR) – przesączanie kłębuszkowe określono na podstawie klirensu inuliny (C_{in})

$$C_{in} [\text{ml}/\text{min}] = \frac{U_{in} \cdot V}{P_{in}}$$

gdzie: U_{in} - stężenie inuliny w moczu [cpm]

V - diureza [$\mu\text{l}/\text{min}$]

P_{in} - stężenie inuliny w osoczu [cpm]

Przepływ osocza przez nerki (RPF) – wyznaczono na podstawie klirensu p-amionohipuranu (PAH).

$$C_{\text{PAH}} [\text{ml} / \text{min}] = \frac{U_{\text{PAH}} \cdot V}{P_{\text{PAH}}}$$

gdzie: U_{in} - stężenie PAH w moczu [nmol/l]

V - diureza [$\mu\text{l}/\text{min}$]

P_{in} - stężenie PAH w osoczu [nmol/l]

Przepływ krwi przez nerki (RBF)

$$\text{RBF} [\text{ml}/\text{min}] = \frac{\text{RPF}}{(1 - \text{Ht})}$$

gdzie: Ht -hematokryt krwi tętniczej

Oporność naczyń nerkowych (RVR)

$$\text{RVR} [\text{mmHg} / \text{ml} \cdot \text{min}] = \frac{\text{MAP}}{\text{RBF}}$$

gdzie: MAP -średnie ciśnienie krwi tętniczej [mmHg]

RBF – przepływ krwi przez nerki [ml/min]

FF– frakcja filtracyjna wyliczona na podstawie wzoru:

$$FF [\%] = \frac{GFR}{RPF} \cdot 100\%$$

FE_{Na} – frakcyjne wydalenie sodu z moczem wyliczone stosując następujący wzór:

$$FE_{Na} [\%] = \frac{C_{Na}}{C_{in}} \cdot 100 \%$$

gdzie: C_{Na} – klirens sodu

$$C_{Na} [\text{ml/min}] = \frac{U_{Na} V}{P_{Na}}$$

gdzie: U_{Na}V– minutowe wydalenie sodu z moczem [μmol/min]

P_{Na} – stężenie sodu w osoczu [mmol/l]

Frakcyjne wydalenie pozostałych elektrolitów tj.: potasu, chlorków, fosforanów, litu liczone w oparciu o klirens potasu, klirens chlorków, klirens fosforanów, klirens litu oraz klirens inuliny.

Wskaźniki funkcji kanalików nerkowych

Wykorzystując następujące parametry funkcji nerek określono reabsorpcję sodu i wody w kanalikach nerkowych: klirens inuliny (C_{in}) – wskaźnik filtracji kłębuszkowej, klirens sodu (C_{Na}) – wskaźnik całkowitego wydalania sodu z moczem, klirens litu (C_{Li}) – wskaźnik objętości izotonicznego płynu opuszczającego kanalik, a więc i ilości sodu opuszczającego kanaliki nerkowe.

Frakcyjne wydalanie płynu z kanalików proksymalnych określono na podstawie ilorazu klirensu litu i klirensu inuliny (C_{Li} / C_{in}).

Objętość płynu ulegającego reabsorpcji w kanaliku proksymalnym określono na podstawie różnicy pomiędzy klirensem inuliny a klirensem litu ($C_{in} - C_{Li}$).

Reabsorbcję wody w dalszych częściach nefronów określono na podstawie różnicy pomiędzy klirensem litu a diurezą ($C_{Li} - V$).

Frakcyjne wydalanie wody z dalszych części nefronów określono na podstawie ilorazu diurezy i klirensu litu (V / C_{Li}).

Reabsorbcję sodu w dalszych częściach nefronów określono na podstawie różnicy klirensu litu i klirensu sodu ($C_{Li} - C_{Na}$).

Frakcyjne wydalanie sodu z dalszych części nefronów określono w oparciu o iloraz klirensu sodu i klirensu litu (C_{Na} / C_{Li}).

4.4 Doświadczenia na izolowanych kłębuszkach

W doświadczeniach na izolowanych kłębuszkach nerkowych szczurów mierzono, przy użyciu radioaktywnej inuliny [^3H], objętość inulinową kłębuszków (Glomerular Inulin Space - GIS), która odzwierciedla objętość wewnątrzkapilarną. Pomiaru dokonano w oparciu o wcześniej opracowaną metodę [24], w znacznej mierze zmodyfikowaną w naszej pracowni. Zasada metody opiera się na właściwościach inuliny, która nieprzemieszczając się przez błony komórkowe, rozmieszcza się w środowisku inkubacyjnym, płynie wewnątrzkapilarnym i płynie międzykomórkowym. W oparciu o pomiar radioaktywności w osadzie kłębuszków nerkowych można wyliczyć objętość przestrzeni inulinowej, której 95 % stanowi przestrzeń wewnątrzkapilarna, a 5 % międzykomórkowa. Wcześniejsze badania wykonane m. in. w naszym Zakładzie dowodzą, że zmiany GIS pod wpływem badanych związków odzwierciedlają skurcz lub relaksację naczyń kapilarnych izolowanych kłębuszków nerkowych.

Wszystkie czynności związane z izolacją kłębuszków i inkubacją z testowanymi związkami przeprowadzono w środowisku lodowato – zimnego wieloelektrolitowego buforu PBS (ice – cold Dulbecco's phosphate – buffered saline) o pH $7,4 \pm 0,2$ i składzie (mM): 137 NaCl; 2,7 KCl; 0,49 MgCl₂; 8,1 Na₂HPO₄; 1,5 KH₂PO₄; 0,9 CaCl₂; 5,6 glukozy.

4.4.1 Izolacja kłębuszków nerkowych

W dniu doświadczenia zwierzęta znieczulano eterem dietylowym, przeprowadzano dekapitację, a następnie pobierano nerki, które umieszczano w schłodzonym do temperatury 0-4°C buforze (PBS). Średni ciężar jednej nerki wynosił 823 ± 16 mg. Z pobranych nerek usuwano torebkę łącznotkankową. Następnie nerki przecinano w płaszczyźnie strzałkowej, a widoczny rdzeń nerkowy wycinano nożyczkami o zakrzywionym ostrzu. Kłębuszki nerkowe izolowano techniką przesiewową [45], zmodyfikowaną przez M. Szczepańską-Konkel i współpracowników [71], stosując sita metalowe o średnicy oczek (\varnothing): 250, 125, 75 μ m. Korę nerek po rozdrobnieniu przy użyciu ostrego nożyka przenoszono na sito metalowe o \varnothing 250 μ m i przecierano za pomocą plastikowego tłoka od strzykawki. Następnie otrzymany homogenat umieszczono na sicie o \varnothing 125 μ m, i przepłukano dużym strumieniem lodowato - zimnego roztworu PBS. Na sicie o \varnothing 125 μ m pozostawały kanaliki nerkowe, które odrzucano, a przesącz zawierający kłębuszki наносzono na sito o \varnothing 75 μ m. Pozostające na sicie \varnothing 75 μ m kłębuszki, przepłukiwano roztworem PBS w celu usunięcia komórek, a następnie spłukano je z sita i zawiesinę przeniesiono do próbki zawierającej PBS z dodatkiem albuminy (stężenie końcowe - 100mg/10 ml). Łączny czas, jaki upływał od dekapitacji zwierząt do zakończenia izolacji kłębuszków nerkowych nie przekraczał 90 minut. Wszystkie czynności związane z izolacją kłębuszków prowadzono w temp. 0-4°C, w plastikowych naczyniach umieszczonych w pojemniku z lodem.

4.4.2 Ocena jakościowa i ilościowa otrzymanego preparatu

Czystość zawiesiny kłębków nerkowych oceniano przy użyciu mikroskopu świetlnego. Zanieczyszczenie elementami morfotycznymi (kanaliki, komórki) wynosiło nie więcej niż 5 %.

Ilość kłębuszków nerkowych w otrzymanym preparacie określano, poprzez liczenie kłębuszków w komorze Fuchs-Rosenthal'a pod mikroskopem świetlnym. W wyniku stosowanej metody izolacji, z jednej nerki otrzymywano około 10 tysięcy kłębuszków. Doświadczenia prowadzono na znanej liczbie kłębuszków nerkowych.

4.4.3 Inkubacja kłębuszków nerkowych z testowanymi związkami

Do 200µl zawiesiny zawierającej 2000 ± 150 kłębuszków nerkowych w buforze PBS z albuminą wołową (1%) dodawano 0,2 µCi [^3H]-inuliny. Tak przygotowane próbki preinkubowano 30 minut w temp. 36°C w łaźni wodnej z ciągłym mieszaniem (40obrotów/min). Inkubację kontynuowano z testowanymi związkami, które dodawano do poszczególnych próbek w objętości 25 µl. Próbki kontrolne inkubowano z PBS. W ściśle określonym czasie, inkubację przerywano przenosząc 200µl mieszaniny inkubacyjnej do probówki wirowniczej zawierającej 100µl oleju silikonowego AR-200 (Wacker – Chemie, München), schłodzonego do temperatury około 4°C, i natychmiast wirowano przez 5 sekund przy przyspieszeniu 5000 g (Beckman, Microfuge TM11). W wyniku wirowania, kłębuszki nerkowe przechodzą przez olej, formując na dnie probówki osad kłębuszkowy, natomiast środowisko inkubacyjne pozostaje nad

warstwą oleju.

4.4.4 Pomiar objętości wewnątrzkapilarnej kłębuszków nerkowych

Do naczyń scyntylicyjnych przeniesiono po 20 μ l supernatantu z każdej próbki inkubacyjnej, do kolejnych - odcięty za pomocą nożyka koniec probówki wraz z osadem kłębuszków. Osad rozpuszczono

w 500 μ l 0,3% Tritonu X-100 mieszając każdą próbkę przy pomocy vortexu (GenieTM2). Następnie do naczyń scyntylicyjnych dodano po 2ml scyntylatora tritonowo-ksylenowego (Ultima Gold – Sigma). Tak przygotowane próbki pozostawiono na 30 minut w zaciemnionym miejscu. Następnie umieszczono próbki w liczniku scyntylicyjnym (Wallac 1409).

Objętość wewnątrzkapilarną kłębuszków GIS, wyrażoną w pikolitrach (pl), wyliczono dla poszczególnych próbek uwzględniając radioaktywność (wyrażoną w cpm) osadu kłębuszkowego i supernatantu oraz ilość kłębuszków nerkowych w osadzie, wg wzoru:

$$\text{GIS} = \frac{[\text{}^3\text{H}]\text{-radioaktywność osadu (cpm)}}{[\text{}^3\text{H}]\text{-radioaktywność 1}\mu\text{l supernatantu (cpm)} \cdot \text{ilość kłębuszków w osadzie}}$$

W oparciu o pomiar objętości inulinowej kłębuszków nerkowych, określano zmiany objętości wewnątrzkapilarnej, które wyrażono jako

procent zmian w odniesieniu do wartości podstawowej (wyjściowej).

4.5 Obliczenia statystyczne

Przedstawione w pracy wyniki są średnimi arytmetycznymi z 5 – 10 doświadczeń \pm średni błąd średniej (SE). Prawdopodobieństwo identyczności dwóch średnich oceniano testem ANOVA.

4.6 Odczynniki

Odczynniki użyte do doświadczeń były czystości analitycznej i pochodziły z następujących firm:

Du Pont: Inulina [^3H]

Merck: Triton X-100

Polfa: Heparyna

Polskie Odczynniki Chemiczne: NaCl, sulfaminian amonu, NaNO_2 , Tween 80, molibdenian amonowy, H_2SO_4 , K_2HPO_4 , LiCl, glukoza

RBI: Inactin

Renal: TCA

Sigma: Ap_4A , β,γ - MeATP, 2-MeSATP, Suramina, teofilina, p-aminohipuran sodu, N-(1-naftylo)ethylenodiamina, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , KCl, MgCl_2 , CaCl_2 , albumina

5. WYNIKI

W pracy tej badano działanie naturalnego aktywatora receptorów purynowych – diadenozynotetrafosforanu (Ap_4A) – na nerkową hemodynamikę, diurezę i wydalanie elektrolitów z moczem szczura. Następnie działanie tego dinukleotydu porównano z nerkowym działaniem ATP, stosując analogi ATP - swoiste agony receptorów P2X i P2Y.

Uzyskane wyniki z Ap_4A potwierdziły oraz poszerzyły wcześniejszą wiedzę na temat działania dinukleotydu podawanego do ogólnego krążenia krwi na funkcję nerek. Jak przedstawiono na Ryc. 1 i 2, Ap_4A w czasie dożylniej infuzji w dawce $0,2 \mu\text{mol/kg} + 2 \text{ nmol/min/kg}$ stymuluje natriurezę około 3,5-krotnie nie zmieniając w statystycznie znamiennej sposób diurezy (Ryc. 1A i B). Natomiast Ap_4A podany w dawce 10-krotnie większej ($2 \mu\text{mol/kg} + 20 \text{ nmol/min/kg}$) – oprócz 5-krotnego wzrostu natriurezy oraz około 2-krotnego wzrostu diurezy – redukuje GFR średnio o około 30% w czasie godzinnej infuzji (Ryc. 2A). Zmiany te pojawiały się stopniowo; maksymalne obniżenie GFR obserwowano w trzecim okresie, tj. 40 – 60 min po włączeniu infuzji Ap_4A (Ryc. 2A). Ponieważ Ap_4A zwiększał wydalanie sodu pomimo hamującego działania na filtrację kłębuszkową wyliczono, że frakcyjne wydalanie sodu wzrosło około 4-krotnie już w pierwszym okresie, a w trzecim około 8-krotnie (Ryc. 2B). Uzyskane dane świadczą o zahamowaniu reabsorpcji sodu w kanalikach nerkowych w wyniku podawania Ap_4A do ogólnego krążenia krwi.

Jak przedstawiono na Ryc.3, już w pierwszych dwudziestu minutach infuzji Ap_4A dochodziło do spadku przepływu osocza przez nerki (RPF; $p \leq 0,05$), mierzonego klirensem p-aminohipuranu (C_{PAH})

i zmiany te utrzymywały się w kolejnych dwóch okresach doświadczalnych. W czasie infuzji Ap₄A nie obserwowano istotnych zmian średniego ciśnienia tętniczego krwi (MAP). Jak przedstawiono w Tab. I, wartość MAP w okresie kontrolnym wynosiła 116 ± 3,1 mmHg, a w czasie godzinnej infuzji Ap₄A średnio 113 ± 4,0 mmHg. Również hematokryt krwi tętniczej (Ht) nie zmieniał się w tych doświadczeniach i wynosił przed podaniem Ap₄A średnio 38 ± 2,0%, a pod koniec infuzji Ap₄A 37 ± 3,1% (Tab.1). Na podstawie uzyskanych danych wyliczono, że dożylna infuzja Ap₄A (2 μmol/kg + 20 nmol/min/kg) zwiększa opór naczyń krwionośnych w nerkach (RVR) z 7,0 ± 0,3 do 10,4 ± 0,6 mmHg/ml min (p < 0,05). Z danych tych wynika, że w czasie dożylniej infuzji Ap₄A zmienia się motoryka naczyń krwionośnych w nerkach, czego wynikiem może być zahamowanie tempa przepływu krwi przez nerki i filtracji kłębuszkowej.

Dodatkowych danych wskazujących na naczynioruchowe działanie Ap₄A w nerkach dostarczyły wyniki doświadczeń na izolowanych kłębuszkach nerkowych szczura, przedstawione na Ryc.4: Ap₄A dodany do zawiesiny kłębuszków redukował przestrzeń wewnątrzkapilarną kłębuszka (GIS) w stopniu zależnym od jego stężenia w środowisku i czasu inkubacji. Maksymalną redukcję GIS o ok. 18 % w odniesieniu do wartości wyjściowej (p ≤ 0,05), obserwowano przy 10 nM stężeniu Ap₄A w środowisku. Z obserwacji tych wynika, że pozakomórkowy Ap₄A bądź produkty jego hydrolizy (ATP i/lub adenozyne) mogą obkurczać w warunkach *in vivo* naczynia kapilarne kłębuszków i w konsekwencji redukować przepływ krwi przez kłębuszki oraz powierzchnię filtracyjną – czynniki wpływające na wielkość przesączania nerkowego.

Ponieważ obserwowane zmiany funkcji nerek indukowane dożylną infuzją Ap_4A mogą być efektem działania Ap_4A *per se*, bądź też jego produktów hydrolizy tj. ATP (poprzez receptory P2) i/lub adenozyiny (poprzez receptory P1), w pracy tej podjęto próbę określenia grupy receptorów zaangażowanych w nerkowe działanie Ap_4A . W celu zidentyfikowania grupy receptorów zaangażowanych w nerkowe działanie Ap_4A , nukleotyd ten podawano jednocześnie z antagonistą receptorów P1 – teofiliną - oraz receptorów P2 – suraminą.

Doświadczenia wykazały, że suramina (12 mg/kg + 0,18 mg/min/kg), przeciwnie do teofiliny (8 μ mol/kg + 0,2 μ mol/min/kg), blokuje działanie Ap_4A na nerkę. Jak przedstawiono na Ryc.5, obserwowane zmiany GFR po podaniu Ap_4A w czasie infuzji teofiliny były porównywalne do tych jakie występowały, gdy w infuzję włączono tylko Ap_4A . Z kolei Ap_4A podany w czasie infuzji suraminy nie wywierał istotnych zmian GFR (Ryc.5), ani też nie zwiększał diurezy (Ryc.6) i natriurezy (Ryc.7). Z powyższych doświadczeń wynika, że w nerkowe działanie Ap_4A mogą być zaangażowane receptory P2, których naturalnymi ligandami są zarówno Ap_4A , jak i produkt hydrolizy – ATP.

W kolejnym etapie doświadczeń, działanie Ap_4A na funkcję nerek porównano z działaniem ATP. Do doświadczeń użyto analogi ATP, odporne na działanie enzymów hydrolizujących tj. β,γ -metylenoATP (β,γ -MeATP) – selektywny agon receptorów P2X - i 2-metylotioATP (2-MeSATP) – selektywny agon receptorów P2Y. Związki te podawano dożylnie w dawkach po 2 μ mol/kg jednorazowo oraz 20 nmol/min/kg w infuzji ciągłej.

Jak przedstawiono na Ryc.8, 2-MeSATP w większym stopniu niż Ap_4A obniżył GFR, maksymalnie już w pierwszym okresie doświadczalnym - około 40 % w odniesieniu do okresu kontrolnego

($p \leq 0,05$). Statystycznie istotnych zmian GFR nie obserwowano w czasie infuzji β,γ -MeATP (Ryc.8A). Analog ten w stosowanej dawce powodował około 2,5-krotny wzrost diurezy (Ryc.9), wyrażonej zarówno w wartościach bezwzględnych (Ryc. 9A) oraz jako frakcyjne wydalanie (Ryc. 9B). Jak przedstawiono na Ryc. 10, każdy z testowanych związków wywoływał natriurezę. Działanie natriuretyczne obu analogów ATP, wyrażone jako frakcyjne wydalanie (FE_{Na} , Ryc.10B) było podobne i nie różniło się istotnie od wartości FE_{Na} określonej dla grupy zwierząt otrzymującej Ap_4A . Na podstawie uzyskanych danych można wnioskować, że Ap_4A hamuje reabsorpcję sodu w kanalikach nerkowych za pośrednictwem receptorów P2 – podobnie jak selektywny agon receptorów P2X i w mniejszym stopniu agon receptorów P2Y.

Jak przedstawiono w tabeli II, zwiększonej natriurezie, indukowanej infuzją testowanych związków, towarzyszył około 2-krotny wzrost frakcyjnego wydalania (FE) jonu chlorkowego i jonów fosforanowych (Pi). Wzrost frakcyjnego wydalania powyższych jonów z moczem odzwierciedla redukcję reabsorpcji tych jonów w kanalikach nerkowych w czasie infuzji testowanych agonów. Tylko w niewielkim stopniu wzrosło frakcyjne wydalanie jonu potasowego w czasie infuzji Ap_4A i analogów ATP, jednakże przeciwnie do pozostałych jonów, wzrost ten nie był statystycznie zamienny ($p > 0,05$).

W jednej serii doświadczeń zwierzęta dodatkowo obciążono chlorkiem litu w celu zbadania wpływu Ap_4A i analogów ATP na wydalanie jonów litu z moczem, wskaźnika reabsorpcji sodu w kanalikach proksymalnych. Badania przeprowadzono na pięciu szczurach w każdej grupie doświadczalnej. Po okresie kontrolnym jedna grupa zwierząt otrzymała w infuzji ciągłej Ap_4A , druga

β,γ -MeATP, a trzecia 2-MeSATP w dawkach po 2 $\mu\text{mol/kg}$ + 20 nmol/min/kg. Jak przedstawiono w tabeli III, godzinna infuzja badanych związków wywołała wzrost frakcyjnego wydalania litu ($p \leq 0,05$); około 3-krotny w czasie infuzji Ap_4A lub 2-MeSATP, i około 2-krotny w czasie infuzji β,γ -MeATP ($p < 0,05$). Uzyskane dane sugerują, że w czasie podawania testowanych agonów receptorów P2 wzrosła objętość płynu opuszczającego kanaliki proksymalne, odpowiednio 3- i 2-krotnie. Zatem, wzrost frakcyjnego wydalania litu był związany z redukcją bezwzględnej objętości płynu kanalikowego ulegającego reabsorpcji w kanalikule proksymalnym ($C_{\text{in}} - C_{\text{Li}}$). Wyliczono, że reabsorpcja w kanalikule proksymalnym zmniejszyła się 2,3-krotnie w doświadczeniach z Ap_4A ($p < 0,05$) i 3,5-krotnie z 2-MeSATP ($p < 0,05$), a w grupie traktowanej β,γ -MeATP zmniejszyła się zaledwie o 30 %. Z kolei wyliczono w dalszych odcinkach nefronów, że reabsorpcja wody ($C_{\text{Li}} - V$) i sodu ($C_{\text{Li}} - C_{\text{Na}}$) uległa około 2-krotnemu zwiększeniu. Ostatecznie, frakcyjne wydalanie sodu z dalszych odcinków nefronu istotnie wzrosło ($p < 0,05$) tylko w doświadczeniach z β,γ -MeATP. Dane te sugerują, że antagonisty receptorów P2X hamuje reabsorpcję sodu również w dalszych odcinkach nefronu.

Jednym ze źródeł pozakomórkowych nukleotydów adeninowych w nerkach są zakończenia nerwowe. Aby odpowiedzieć na pytanie, czy w wyniku odnerwienia nerek dochodzi do zmiany wrażliwości nerek na działanie Ap_4A i ATP, przeprowadzono doświadczenia na szczurach po obustronnym odnerwieniu nerek. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta po zabiegu pozorowanym. Obie grupy zwierząt w dziewiątym dniu po zabiegu otrzymywały dożylnie Ap_4A i analogi ATP w dawce po 2 $\mu\text{mol/kg}$ + 20 nmol/min/kg.

Należy zaznaczyć, że mierzone parametry funkcji nerek w okresie kontrolnym, jak i w czasie podawania testowanych nukleotydów w grupie zwierząt po zabiegu pozorowanym (grupa kontrolna) nie różniły się istotnie od tych opisanych powyżej, w doświadczeniach przeprowadzonych na szczurach nie poddawanych żadnym zabiegom (Ryc.8, 9, 10). Istotne różnice ujawniały się w grupie szczurów po obustronnym odnerwieniu nerek. Zmiany GFR przed i w czasie podawania Ap_4A ilustruje Ryc.11. W okresie wstępnym (przed włączeniem Ap_4A) GFR było niższe w grupie badanej niż w grupie kontrolnej ($p \leq 0,05$) i obniżyło się o około 40 % w czasie podawania Ap_4A . Spadek GFR (Δ GFR) nie różnił się istotnie od zmian GFR wywołanych infuzją Ap_4A w grupie kontrolnej (Ryc.11). Zmieniła się natomiast odpowiedź nerek odnerwionych – mierzona zmianami GFR - na działanie analogów ATP. Jak przedstawiono na Ryc.12, 2-MeSATP w dwukrotnie mniejszym stopniu obniżał GFR niż w grupie kontrolnej. Z kolei β,γ -MeATP, który w grupie kontrolnej nie zmieniał GFR, u zwierząt po odnerwieniu nerek redukował GFR, średnio o 15 % w odniesieniu do wartości wyjściowych ($p < 0,05$).

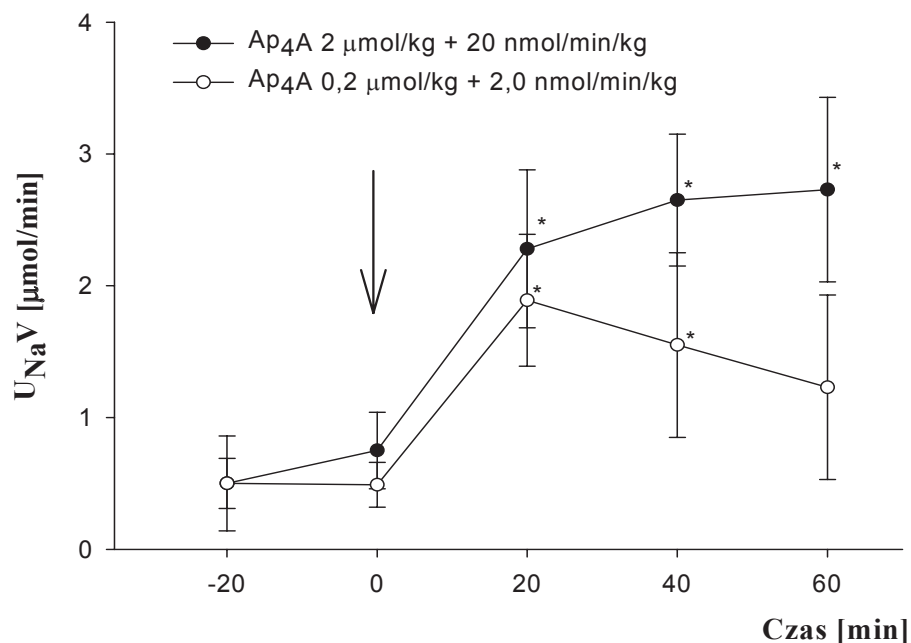
W wyniku odnerwienia nerek nie zmieniła się diureza w okresie wstępnym i wzrosła po włączeniu infuzji Ap_4A w takim samym stopniu jak w grupie kontrolnej (Ryc.13). Z kolei efekt diuretyczny β,γ -MeATP był około 3-krotnie większy w grupie badanej niż w kontrolnej. (Ryc.14). Również infuzja 2-MeSATP, analogu, który w grupie kontrolnej nie ujawniał działania diuretycznego, u zwierząt po odnerwieniu nerek spowodował około dwukrotny wzrost diurezy (Ryc.14).

Niezależnie od zmian diuretycznych obserwowanych w tych doświadczeniach, zmiany wydalania sodu z moczem przedstawiały się następująco (Ryc.15): w okresie wstępnym wydalanie sodu u

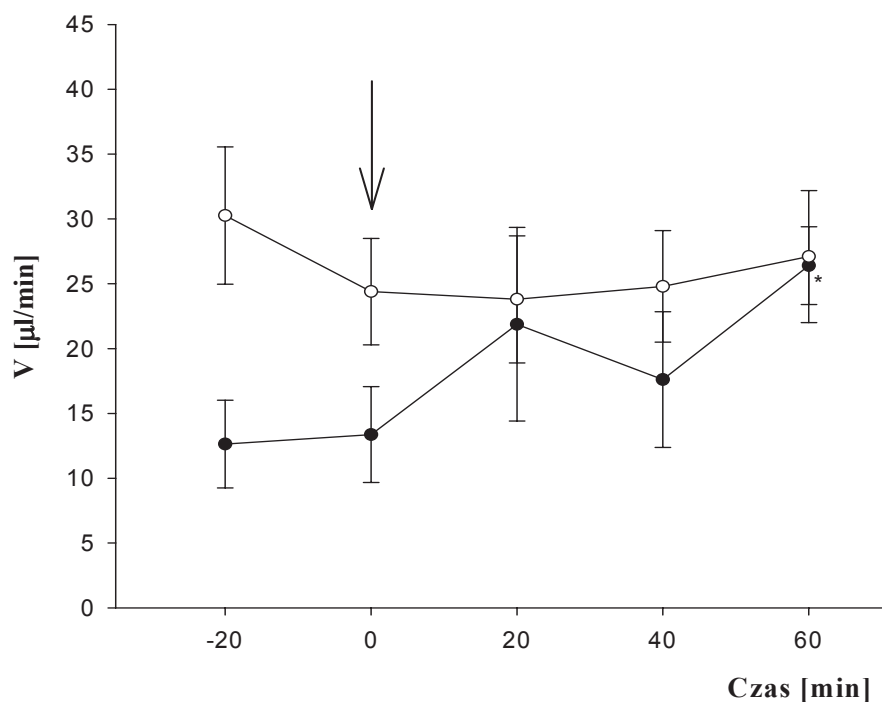
szczurów po odnerwieniu nerek było około 4-krotnie większe niż w grupie kontrolnej (po zabiegu pozorowanym) i uległo obniżeniu po włączeniu infuzji Ap_4A , osiągając wartości zbliżone do wyjściowych - grupy kontrolnej. Podobne działanie ujawniał 2-MeSATP (Ryc.16). Z kolei przeciwny efekt obserwowano, gdy zwierzęta po odnerwieniu nerek otrzymały β,γ -MeATP. Pomimo zwiększonej natriurezy w okresie wstępnym, podanie agona receptorów P2X powodowało dalszy wzrost wydalania sodu, który ostatecznie był ponad 5-krotnie większy niż po podaniu tego związku grupie kontrolnej.

W podsumowaniu: wpływ odnerwienia nerek na diuretyczne i natriuretyczne działanie agonów receptorów P2 obrazuje Ryc.17, przedstawiająca zmiany frakcyjnego wydalania sodu (ΔFE_{Na} [%]) i moczu (ΔFE_{mocz} [%]) po podaniu testowanych związków grupie badanej i kontrolnej. Z przedstawionych danych wynika, że Ap_4A oraz 2-MeSATP, czynniki hamujące reabsorpcję sodu w kanalikach proksymalnych tracą tę właściwość w odnerwionych nerkach, zachowując jednak hamujące działanie na transport wody. Z kolei hamujące działanie β,γ -MeATP na kanalikową reabsorpcję sodu i wody nasiliło się w nerkach odnerwionych.

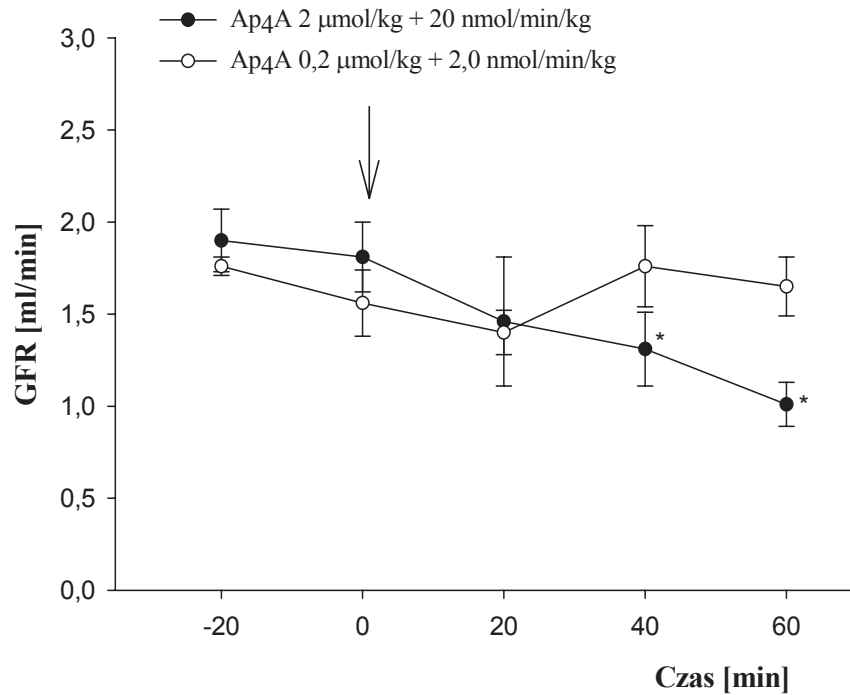
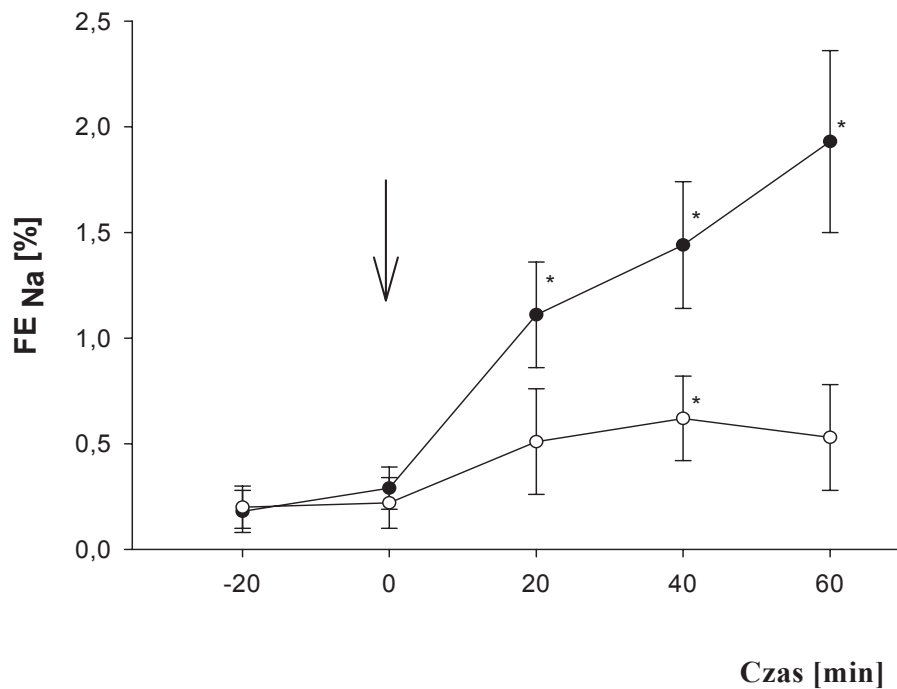
A



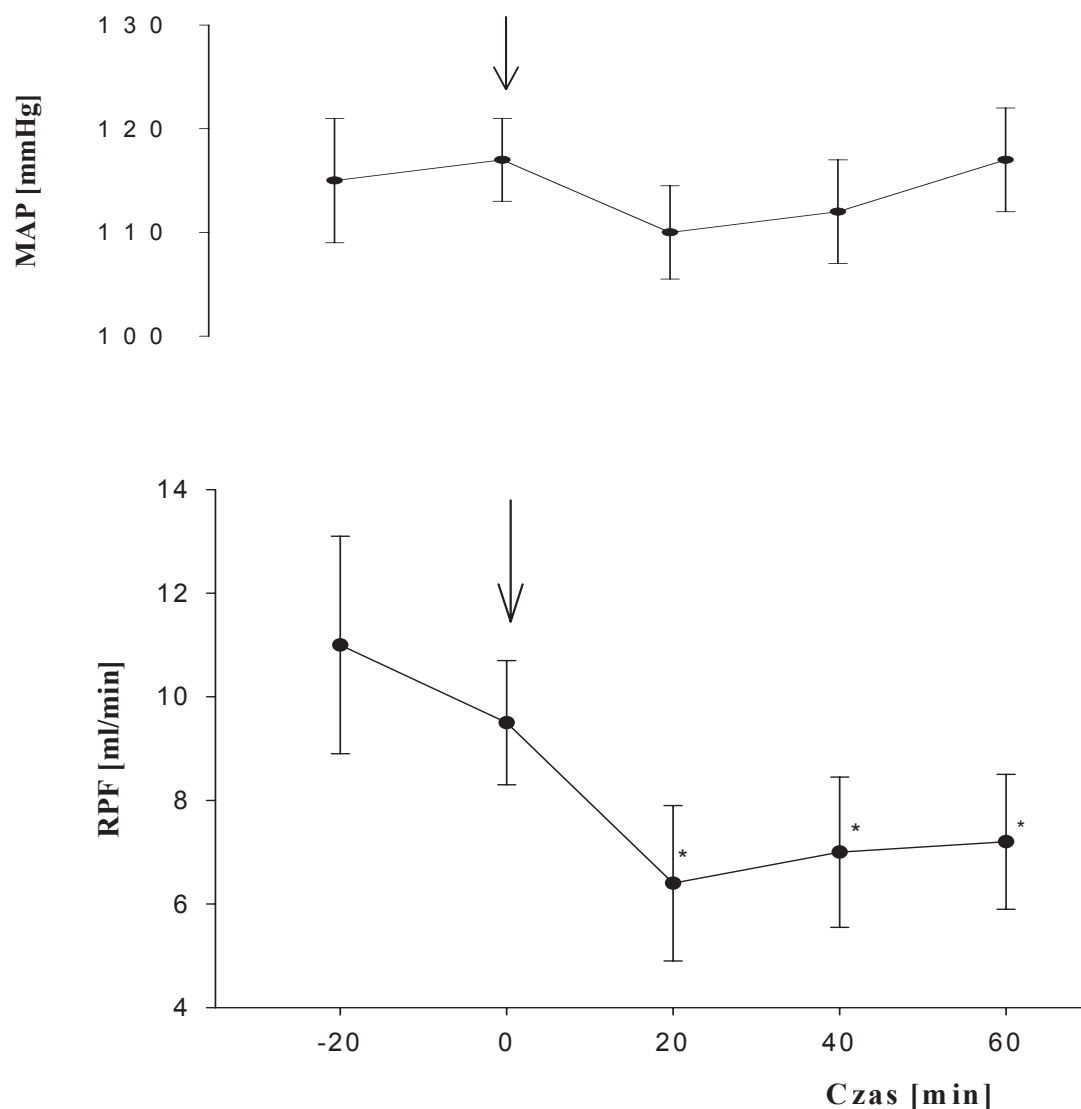
B



Ryc. 1. Zmiany wydalania jonu sodowego z moczem (U_{NaV}) oraz diureza w czasie dożylniej infuzji Ap_4A . Bezpośrednio po okresie kontrolnym jedna grupa zwierząt ($n=8$) otrzymała Ap_4A – jednorazowo $2 \mu\text{mol/kg}$ i w infuzji ciągłej 20 nmol/min/kg , druga grupa ($n=5$) – Ap_4A w dawce 10-krotnie mniejszej. Wyniki wyrażono w wartościach bezwzględnych; **panel A** przedstawia minutowe wydalanie sodu ($\mu\text{mol/min}$), **panel B** przedstawia minutowe wydalanie moczu ($\mu\text{l/min}$). Każdy punkt jest wartością średnią \pm SE. * $p \leq 0,05$ względem odpowiednich wartości wyjściowych (okres kontrolny).

A**B**

Ryc. 2. Zmiany GFR i frakcyjne wydalanie jonu sodowego z moczem (FE_{Na}) w czasie dożylniej infuzji Ap_4A . Protokół doświadczenia jak w opisie Ryc.1. **Panel A przedstawia filtrację kłębuszkową (GFR) wyrażoną w wartościach bezwzględnych (ml/min), **panel B** przedstawia wydalanie sodu z moczem (FE_{Na}) – jako procent ładunku sodu filtrowanego ($\text{GFR} \cdot [\text{Na}]_{\text{surowica}}$). Każdy punkt jest wartością średnią ($n=5-8$) \pm SE. * $p \leq 0,05$ obliczone względem okresu kontrolnego.**

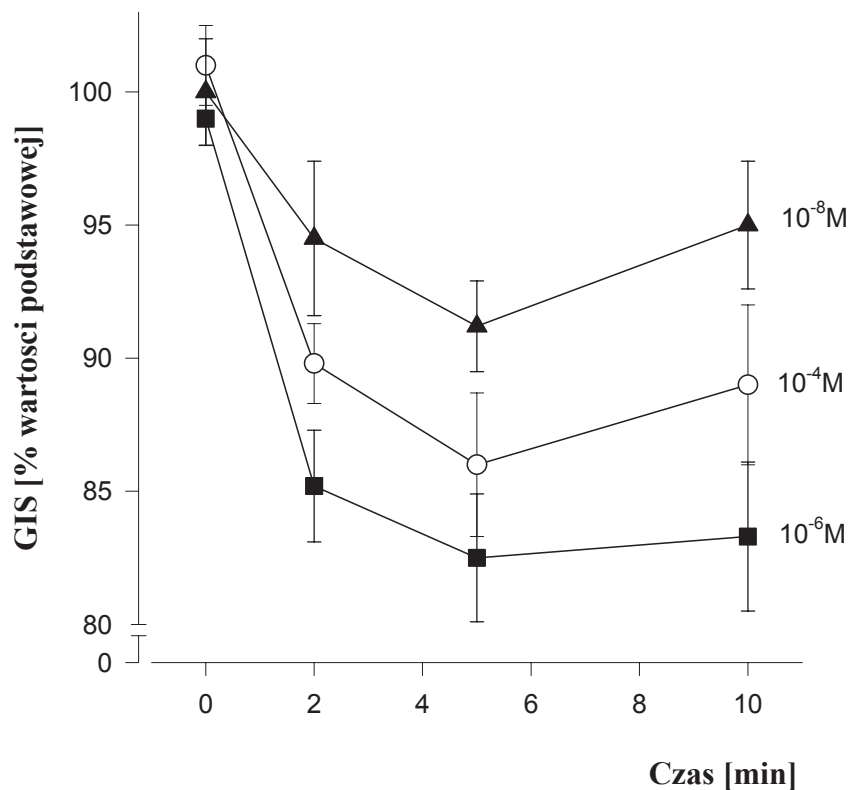


Ryc. 3. Zmiany przepływu osocza przez nerki (RPF) i ciśnienie tętnicze (MAP) w czasie dożylniej infuzji Ap₄A (2 μmol/kg + 20 nmol/min/kg). Bezpośrednio po okresie kontrolnym zwierzęta (n=8) otrzymały Ap₄A – jednorazowo 2 μmol/kg i w infuzji ciągłej 20 nmol/min/kg. RPF oznaczano w oparciu o pomiar klirensu p-aminohipuranu. Każdy punkt jest wartością średnią (n=8) ± SE. *p ≤ 0,05 względem odpowiednich wartości wyjściowych (okres kontrolny).

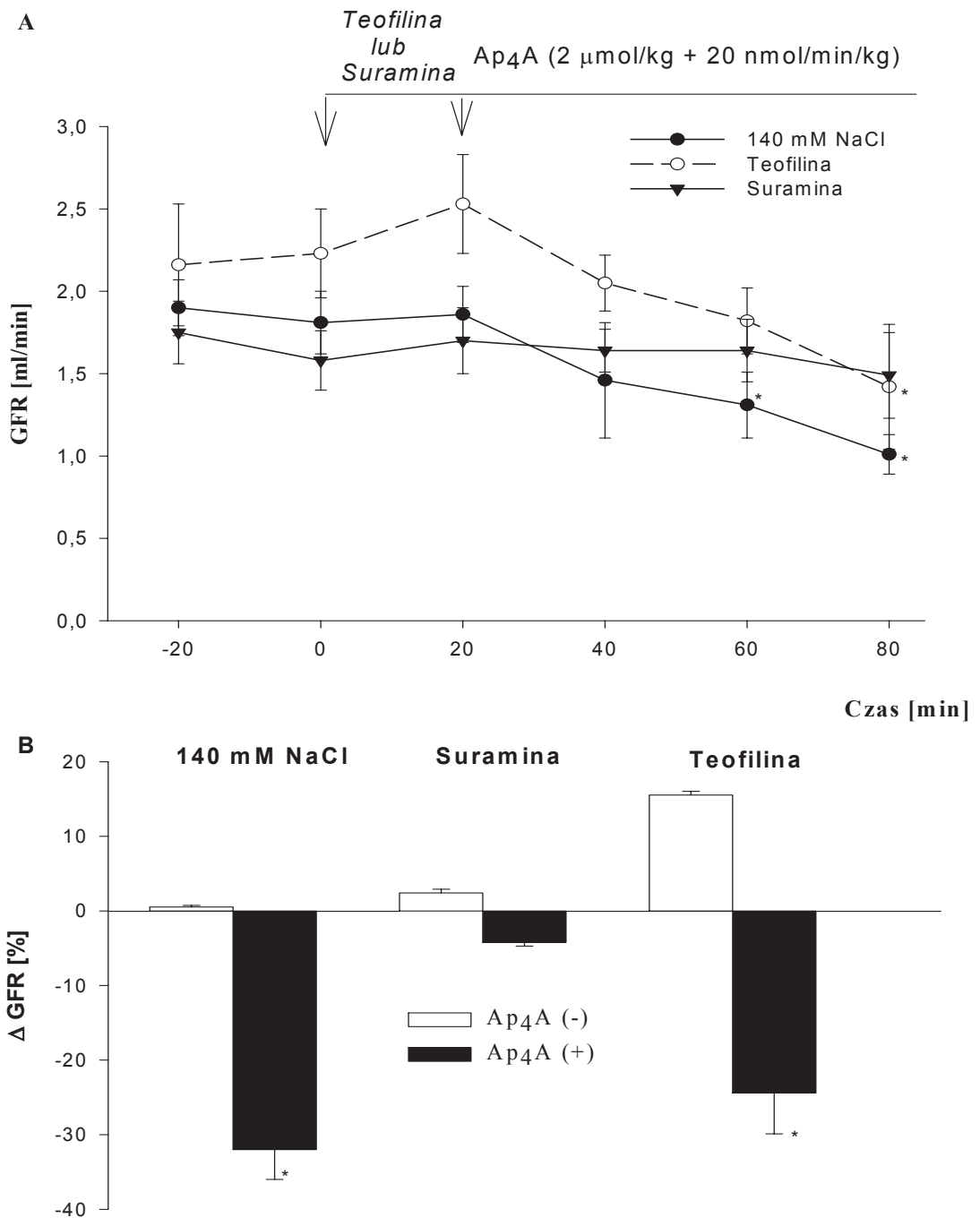
Tab.I. Przepływ krwi przez nerki (RBF) i oporność naczyń nerkowych (RVR) w odpowiedzi na dożylną infuzję Ap₄A (2 μmol/kg + 20 nmol/min/kg)

	OKRES KONTROLNY	OKRES DOŚWIADCZALNY
MAP [mmHg]	116 ± 3,1	113 ± 4,0
Ht [%]	38 ± 2,0	37 ± 3,1
RPF [ml/min]	10,3 ± 1,7	6,9 ± 1,4*
RBF [ml/min]	16,6 ± 2,5	10,9 ± 1,8*
RVR [mmHg/ml min]	7,0 ± 0,3	10,4 ± 0,6*
GFR [ml/min]	1,9 ± 0,2	1,3 ± 0,2*

Objaśnienia: MAP – średnie ciśnienie krwi tętniczej; Ht – hematokryt; RPF – przepływ osocza przez nerki; RBF – przepływ krwi przez nerki (RPF/(1-Ht)); RVR – oporność naczyń nerkowych (RVR = MAP/RBF). Wyniki przedstawiają wartości średnie (n=5) ± SE z okresu kontrolnego (przed włączeniem Ap₄A) oraz 60 minutowego okresu doświadczalnego (bezpośrednio po włączeniu infuzji Ap₄A). *p< 0,05 obliczone względem wartości kontrolnych.

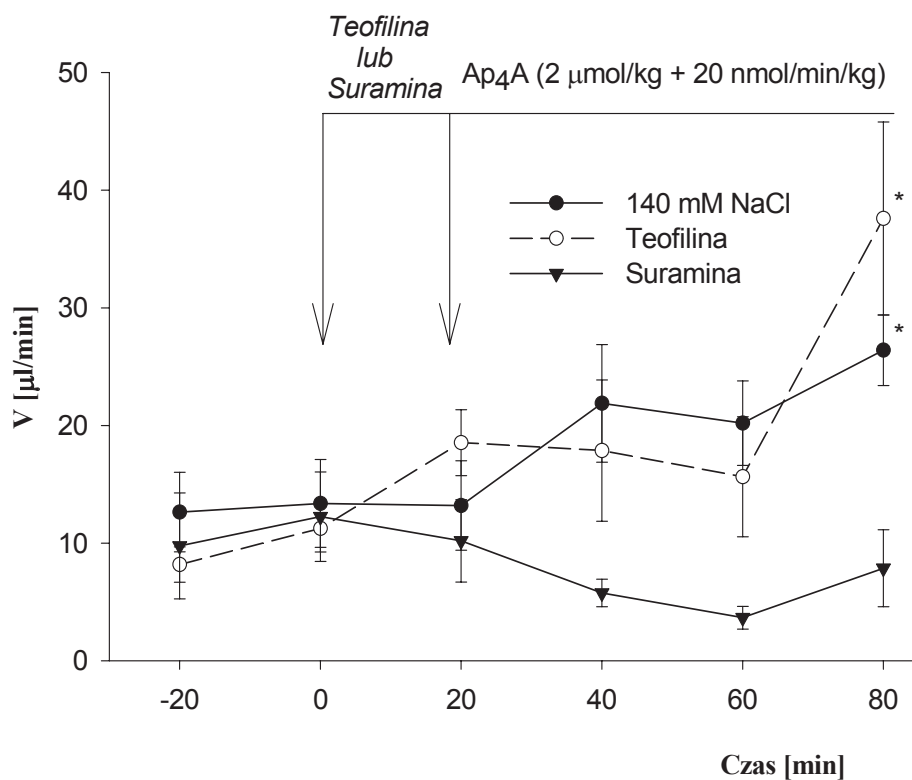


Ryc. 4. Zmiany objętości przestrzeni wewnątrzkapilarnej (GIS) izolowanych kłębuszków nerkowych w czasie inkubacji z Ap₄A. Zawiesinę kłębuszków nerkowych (1000 kłębuszków w 100μl PBS) preinkubowano z [³H]-inuliną, a następnie inkubację kontynuowano z Ap₄A o stężeniu 0,01; 1; 100 μM w czasie 0, 1, 2, 5 i 7 minut, w temp. 36°C. Każdy punkt jest wartością średnią z 5 doświadczeń ± SE. p* ≤ 0,05 obliczone względem wartości podstawowej (czas inkubacji i stężenie Ap₄A = 0).

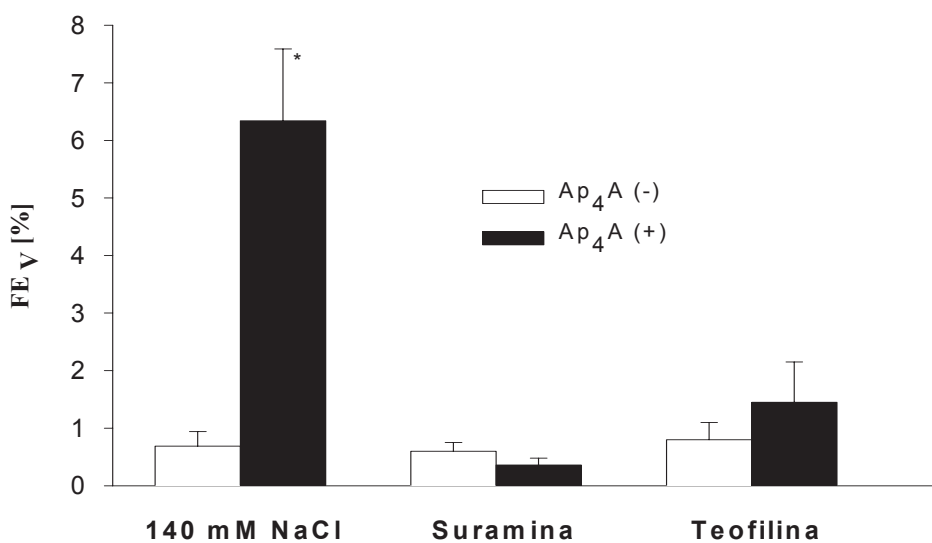


Ryc. 5. Wpływ teofiliny (anty P1) i suraminy (anty P2) na zmiany filtracji kłębuszkowej indukowane dożylną infuzją Ap₄A (2 μmol/kg + 20 nmol/min/kg). Po okresie kontrolnym jednej grupie zwierząt (n=8), dożylnie podawano teofilinę (0,8 μmol/kg + 0,2 μmol/min/kg), drugiej grupie (n=6) suraminę (12 mg/kg + 0,18 mg/min/kg), a trzeciej – kontrolnej (n=10) 140mM NaCl. Wszystkim trzem grupom zwierząt w 20 minucie dodatkowo włączono Ap₄A i infuzję kontynuowano przez 60 minut. **Panel A** ilustruje filtrację kłębuszkową (GFR) w przebiegu doświadczenia, wyrażoną w wartościach bezwzględnych (ml/min). **Panel B** przedstawia zmiany GFR wyrażone w procentach w odniesieniu do okresu kontrolnego - bezpośrednio przed włączeniem Ap₄A (słupki białe) oraz w czasie 60 minut po włączeniu Ap₄A (słupki czarne). Wyniki przedstawiają wartości średnie ± SE; *p ≤ 0,05 względem wartości kontrolnych.

A

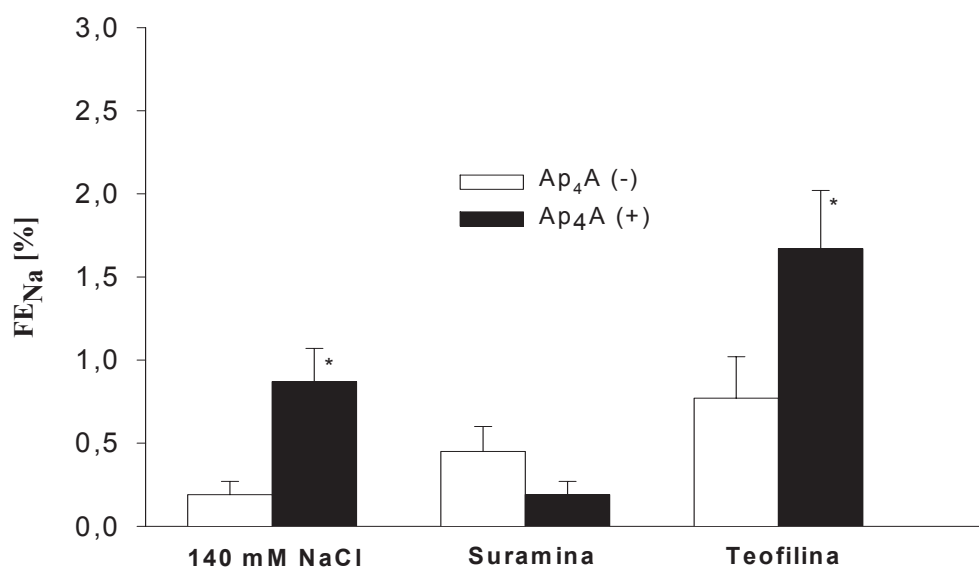
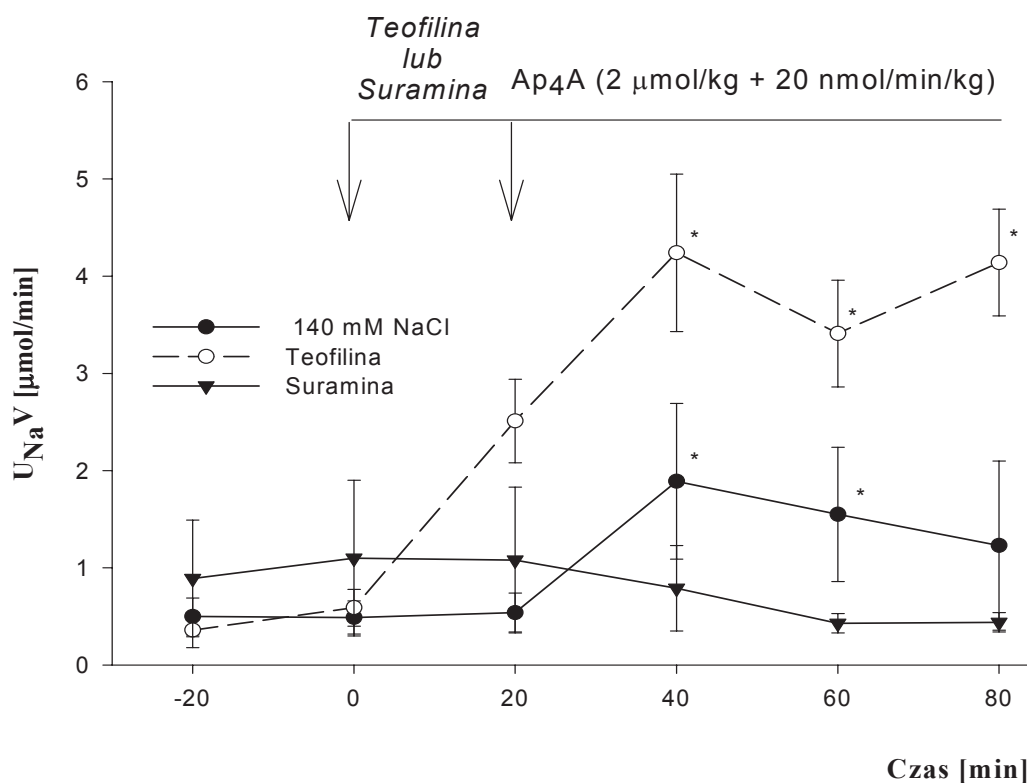


B

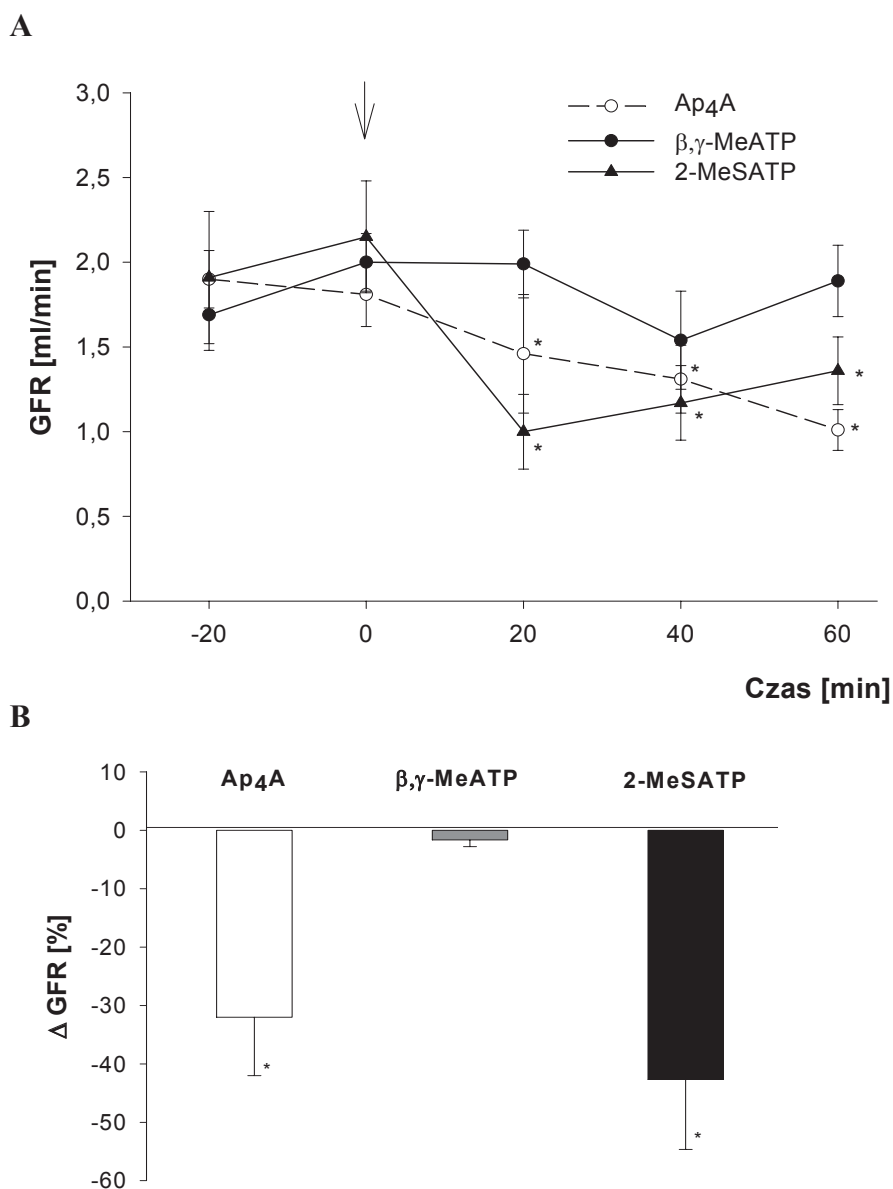


Ryc. 6. Wpływ teofiliny (anty P1) i suraminy (anty P2) na diuretyczne działanie Ap₄A (2 µmol/kg + 20 nmol/min/kg). Protokół doświadczenia jak w opisie Ryc.5. **Panel A** ilustruje diurezę w przebiegu doświadczenia, wyrażoną w wartościach bezwzględnych (µl/min). **Panel B** przedstawia frakcyjne wydalanie moczu (%) w czasie 20 minut infuzji antagonisty bezpośrednio przed włączeniem Ap₄A (słupek biały) oraz w okresie 60 minut po włączeniu Ap₄A (słupek czarny). Wyniki przedstawiają wartości średnie ± SE; *p < 0,05 względem wartości kontrolnych.

A

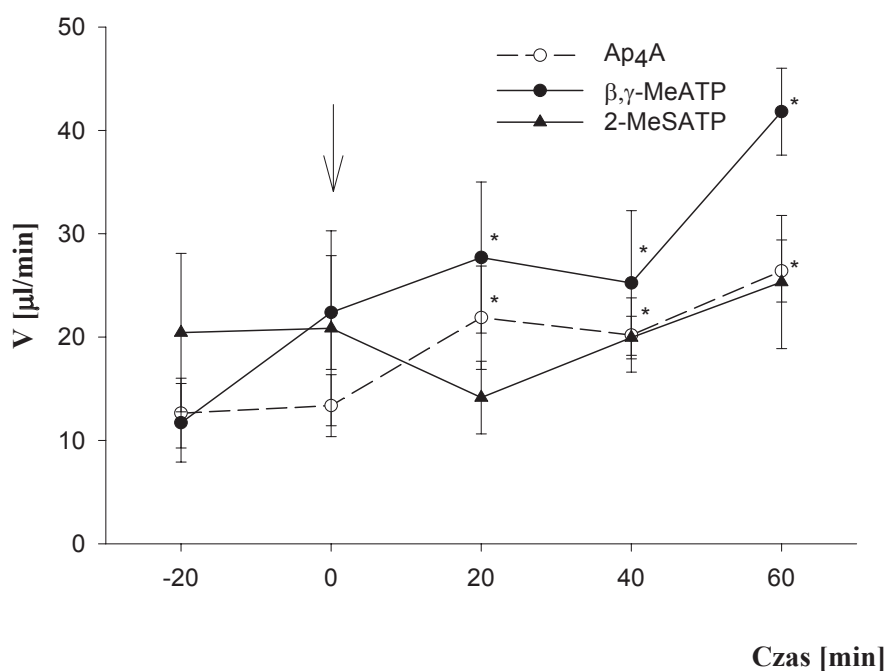


Ryc. 7. Wpływ teofiliny (anty P1) i suraminy (anty P2) na natriuretyczne działanie Ap₄A (2 μmol/kg + 20 nmol/min/kg). *Protokół doświadczenia jak w opisie Ryc.5. Panel A* ilustruje wydalanie jonu sodowego w przebiegu doświadczenia, wyrażone w wartościach bezwzględnych (μmol/min). **Panel B** przedstawia frakcyjne wydalanie sodu (%) w czasie 20 min infuzji antagonisty bezpośrednio przed włączeniem Ap₄A (słupki białe) oraz w okresie 60 minut po włączeniu Ap₄A (słupki czarne). Wyniki przedstawiają wartości średnie ± SE; * $p \leq 0,05$ względem wartości kontrolnych.

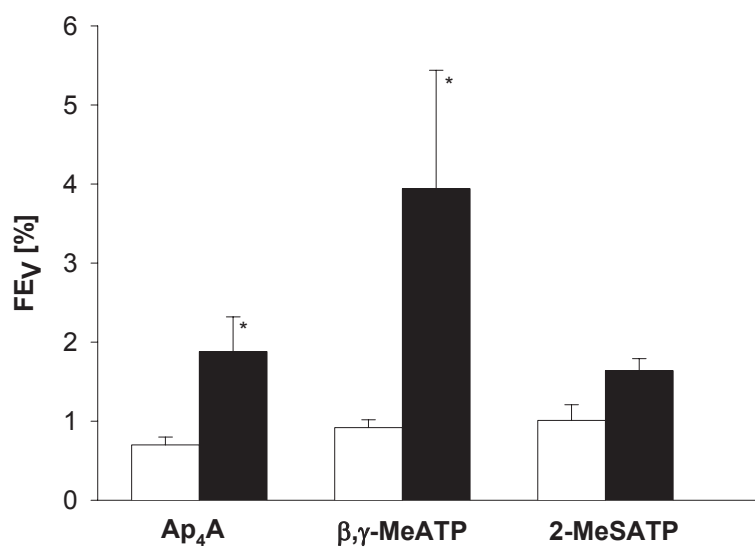


Ryc. 8. Zmiany GFR w czasie dożylniej infuzji analogów ATP – swoistych agonów receptorów P2X (β,γ-metylenoATP) i P2Y (2-metylotioATP). Po okresie kontrolnym jedna grupa zwierząt otrzymywała w infuzji dożylniej β,γ-metylenoATP (β,γ-MeATP), druga – 2-metylotioATP (2-MeSATP), a trzecia – kontrolna – Ap₄A. Każdy związek podawano w dawkach po 2,0 μmol/kg + 20 nmol/min/kg. Wyniki wyrażono w wartościach bezwzględnych (ml/min) – **panel A**, oraz jako procent zmian GFR w czasie 60 min infuzji agonu w odniesieniu do odpowiedniego okresu kontrolnego – **panel B**. Każdy wynik jest wartością średnią (n = 8) ± SE, *p ≤ 0,05 względem wartości kontrolnej.

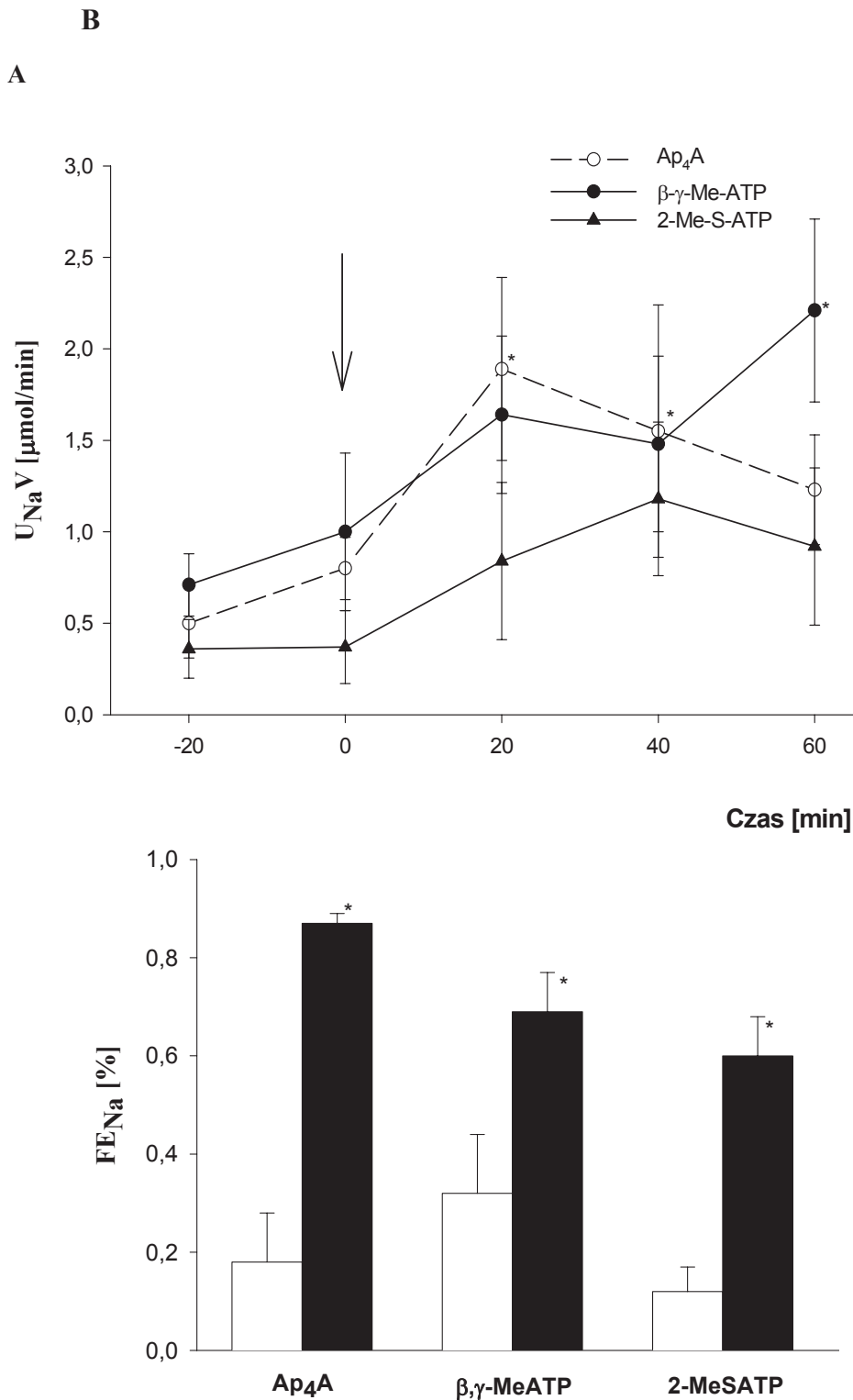
A



B



Ryc. 9. Zmiany diurezy w czasie dożynej infuzji analogów ATP – swoistych agonów receptorów P2X (β,γ-metylenoATP) i P2Y (2-metylotioATP). Protokół doświadczenia jak w opisie Ryc.8. Wyniki wyrażono w wartościach bezwzględnych (µl/min) – panel A oraz jako średnie frakcyjne wydalanie moczu przed (słupek biały) i po włączeniu testowanych analogów (słupek czarny) – panel B. Każdy punkt jest wartością średnią (n = 5-8) ± SE, *p ≤ 0,005 względem wartości kontrolnej.



Ryc. 10. Zmiana wydalania sodu z moczem w czasie dożyłnej infuzji analogów ATP – swoistych agonów receptorów P2X (β,γ -metylenoATP) i P2Y (2-metylotioATP). Protokół doświadczenia jak w opisie Ryc. 8. Wyniki wyrażono w wartościach bezwzględnych ($\mu\text{mol}/\text{min}$) – **panel A** oraz jako średnie frakcyjne wydalanie sodu z moczem przed (słupek biały) i po włączeniu testowanych agonów (słupek czarny) – **panel B**. Każdy punkt jest wartością średnią ($n = 8$) \pm SE. * $p < 0,05$ względem wartości kontrolnej.

Tab.II. Wydalanie elektrolitów z moczem przed i w czasie dożylniej infuzji Ap₄A i analogów ATP (po 2 μmol/kg + 20 nmol/min/kg)

	Ap ₄ A		β,γ-MeATP		2-MeSATP	
	okres kontrolny	okres doświad.	okres kontrolny	okres doświad.	okres kontrolny	okres doświad.
V [μl/min]	13,1±3,6	22,8±3,9*	17,1±4,6	31,6±6,2*	20,6±8,5	19,8±4,0
FE_V [%]	0,7±0,2	1,8±0,3*	0,9±0,1	1,7±0,3*	1,0±0,2	1,7±0,2
U_{Na}V [μmol/min]	1,2±0,2	3,2±0,7*	1,4±0,3	3,6±0,6*	0,9±0,4	2,0±0,4
FE_{Na} [%]	0,4±0,2	1,8±0,4*	0,6±0,2	1,4±0,2*	0,4±0,1	1,2±0,2*
U_KV [μmol/min]	2,2±0,6	2,0±0,7	1,8±0,2	2,0±0,5	1,9±0,3	1,5±0,6
FE_K [%]	30±4,5	39±5,0	24±4,0	28±4,5	24±3,7	32±6,0
U_{Cl}V [μmol/min]	2,4±0,2	4,1±0,5	2,7±0,3	4,2±0,7	2,2±0,6	2,3±0,5
FE_{Cl} [%]	1,4±0,5	3,2±0,7*	1,5±0,4	2,3±0,4*	1,1±0,3	2,0±0,5*
U_{Pi}V [μmol/min]	0,7±0,1	1,3±0,1*	0,6±0,1	1,1±0,2*	0,7±0,2	1,0±0,1
FE_{Pi} [%]	14±1,2	28±1,0*	13±0,9	24±1,3*	12±0,7	35±1,4*

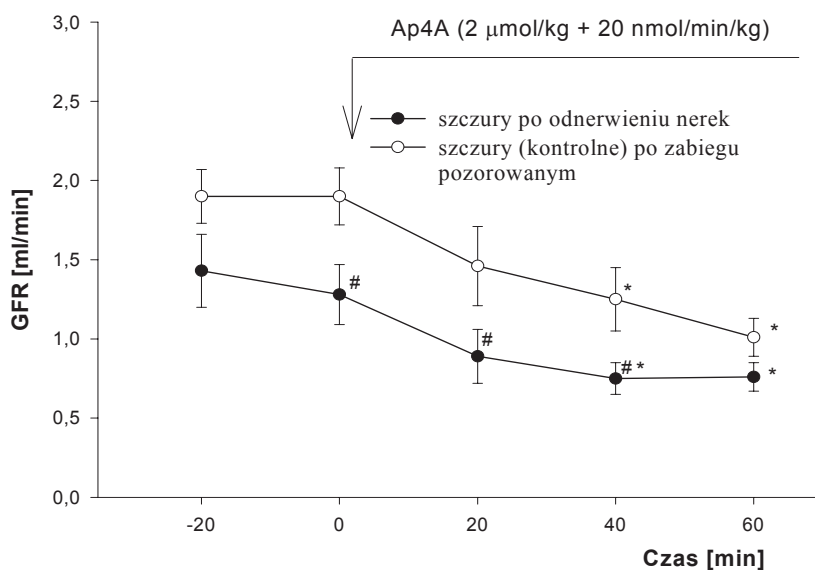
Objaśnienia: V – diureza wyrażona w μl/min; FE_V – frakcyjne wydalanie moczu wyrażone %; U_{Elek.}V – wydalanie elektrolitów (sodu, potasu, chlorku, fosforanu) z moczem wyrażone w wartościach bezwzględnych (μmol/min); EF_{Elek.}(%) - frakcyjne wydalanie elektrolitów z moczem. Każdy wynik jest wartością średnią (n = 5 w każdej grupie) ± SE z okresu kontrolnego (wstępnego) oraz 60 minutowego okresu

doświadczalnego. *p<0,05 obliczone względem odpowiedniego okresu kontrolnego.

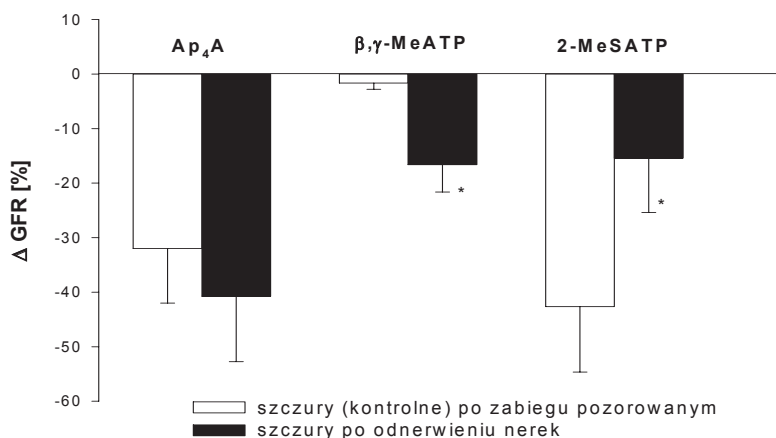
Tab. III. Wskaźniki funkcji kanalików nerkowych przed i w czasie dożyłnej infuzji Ap₄A i analogów ATP (po 2 μmol/kg + 20nmol/min/kg)

	Ap ₄ A		β,γ-MeATP		2-MeSATP	
	okres kontrolny	okres doświad.	okres kontrolny	okres doświad.	okres kontrolny	okres doświad.
FE _{Li} [%]	17±4.0	48±11*	18±4,1	35±8,0*	17±6,0	58±12*
C _{in} - C _{Li}	1543±121	655±115*	1510±118	1060±123	1690±180	485±171*
C _{Li} - V	294±30	582±155	313±112	548±103	319±145	665±148
V/C _{Li} [%]	4,2±2,0	4,0±1,8	5,1±0,9	5,4±1,2	6,2±1,4	3,0±1,5
C _{Li} - C _{Na}	299±26	582±175	320±93	505±118	333±127	671±122
C _{Na} /C _{Li} [%]	2,6±1,2	3,5±1,1	3,1±0,8	5,5±0,9*	2,1±1,2	2,2±1,0

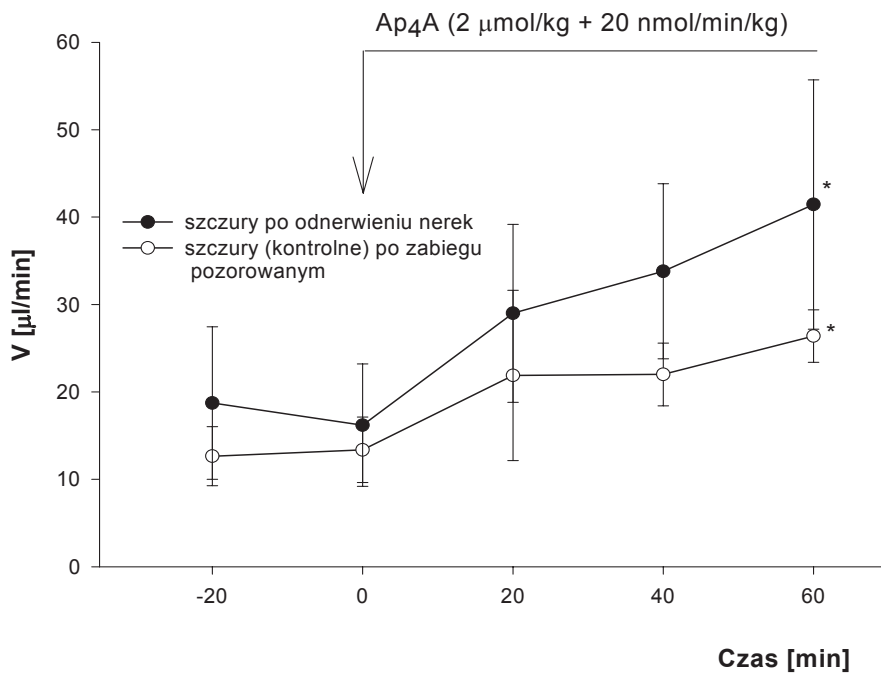
Objaśnienia: FE_{Li} = frakcyjne wydalanie Li z moczem [%]; C_{in} - C_{Li} = reabsorpcja przesącza w kanalikach proksymalnych [μl/min]; C_{Li} - V = reabsorpcja wody w dalszych częściach nefronów; V/C_{Li} = frakcyjne wydalanie wody z dalszych części nefronów [%]; C_{Li} - C_{Na} = reabsorpcja sodu w dalszych częściach nefronów; C_{Na}/C_{Li} = frakcyjne wydalanie sodu z dalszych części nefronów. Wyniki przedstawiają wartości średnie (n = 5 w każdej grupie) ± SE z okresu kontrolnego (wstępnego) oraz 60 minutowego okresu doświadczalnego (bezpośrednio po włączeniu testowanych związków). *p<0,05 obliczono względem odpowiedniego okresu kontrolnego.



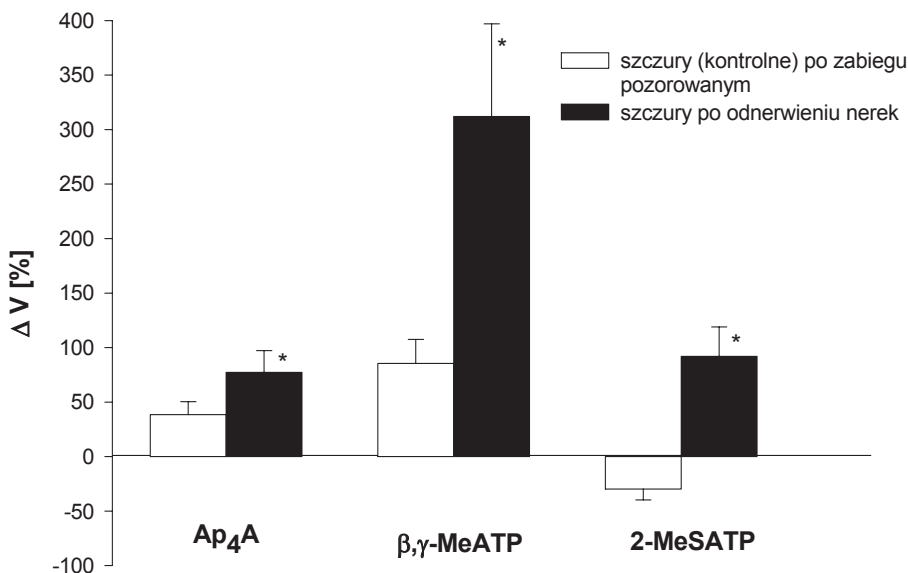
Ryc.11. Wpływ odnerwienia na filtrację kłębuszkową (GFR) indukowaną infuzją Ap_4A . Po okresie kontrolnym grupa zwierząt badanych oraz grupa kontrolna (po zabiegu pozorowanym) otrzymały w infuzji dożylniej Ap_4A w dawce po $2 \mu\text{mol/kg} + 20 \text{ nmol/min/kg}$. Wyniki wyrażono w wartościach bezwzględnych (ml/min) w przebiegu doświadczenia. Każdy punkt jest wartością średnią ($n = 5$) \pm SE. * $p \leq 0,05$ obliczone względem odpowiedniego okresu kontrolnego, # $p \leq 0,05$ obliczone względem odpowiedniego okresu w grupie po zabiegu pozorowanym.



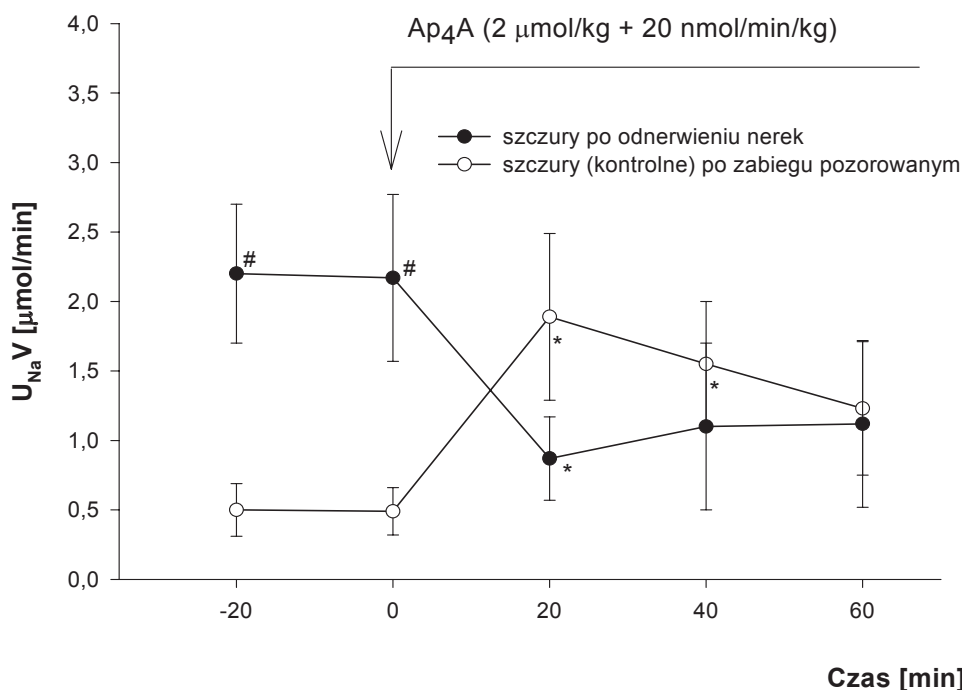
Ryc.12. Wpływ odnerwienia na filtrację kłębuszkową (GFR) indukowaną infuzją analogów ATP. Po okresie kontrolnym jedna grupa zwierząt otrzymała w infuzji dożylniej β, γ -metylenoATP ($\beta, \gamma\text{-MeATP}$), druga - 2-metylotioATP (2-MeSATP), i dla porównania trzecia - Ap_4A - w dawkach po $2 \mu\text{mol/kg} + 20 \text{ nmol/min/kg}$. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta po zabiegu upozorowanym, które otrzymały testowane związki w dawkach jw. Wyniki wyrażono jako procent zmian GFR w czasie 60 minut infuzji testowanych związków w odniesieniu do odpowiednich wartości wyjściowych (okres kontrolny). Każdy punkt jest wartością średnią ($n = 5$) \pm SE. * $p \leq 0,005$ obliczone względem odpowiedniego okresu kontrolnego.



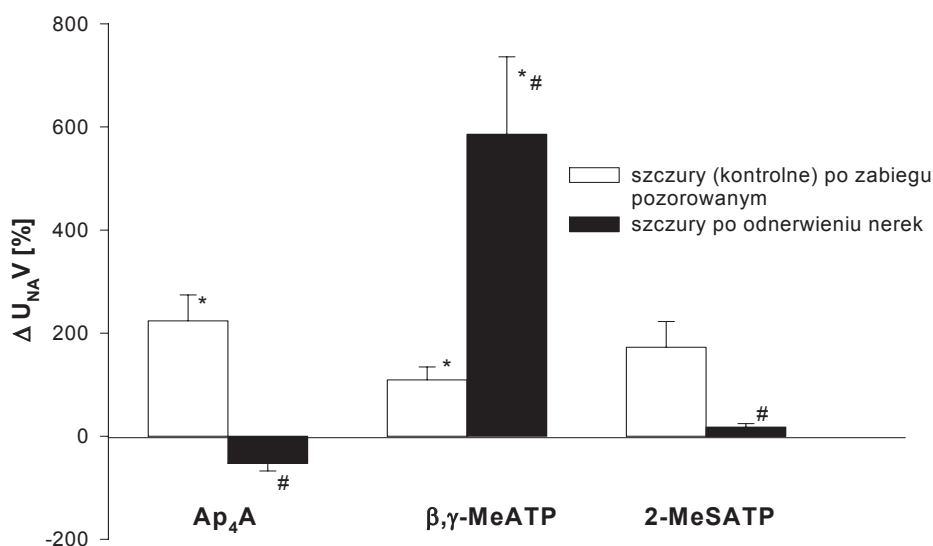
Ryc. 13. Wpływ odnerwienia na diurezę indukowaną infuzją Ap_4A . *Protokół doświadczenia jak w opisie Ryc.11.* Wyniki wyrażono w wartościach bezwzględnych ($\mu\text{l}/\text{min}$) w przebiegu doświadczenia. Każdy punkt jest wartością średnią ($n = 5$) \pm SE. * $p \leq 0,05$ obliczone względem odpowiedniego okresu kontrolnego.



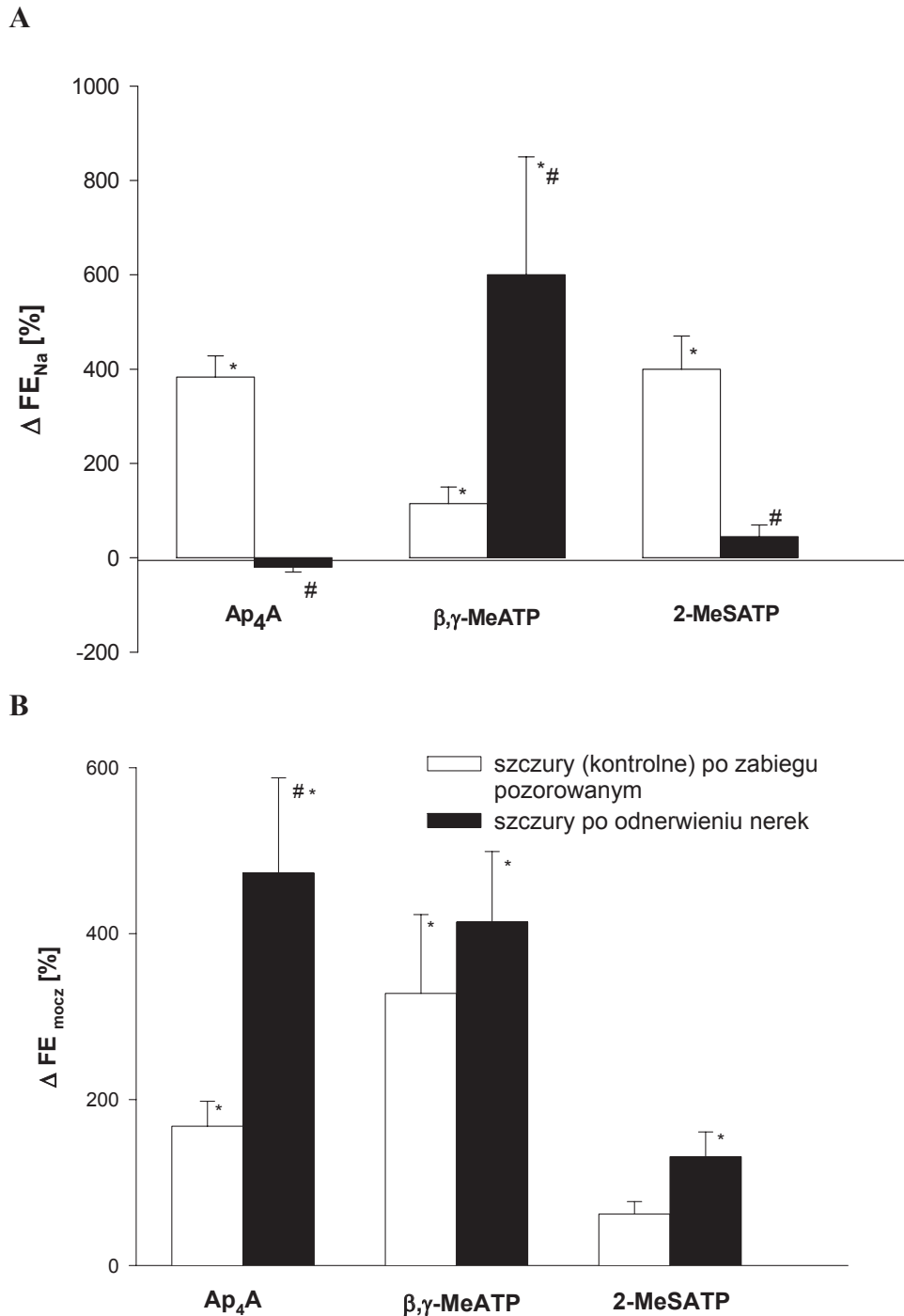
Ryc. 14. Wpływ odnerwienia na diurezę indukowaną infuzją analogów ATP. *Protokół doświadczenia jak w opisie Ryc.12.* Wyniki wyrażono jako procent zmian diurezy w czasie 60 minut infuzji testowanych związków w odniesieniu do odpowiednich wartości wyjściowych (okres kontrolny). Każdy punkt jest wartością średnią ($n = 5$) \pm SE. * $p \leq 0,05$ obliczone względem odpowiedniego okresu kontrolnego.



Ryc. 15. Wpływ odnerwienia na natriurezę indukowaną infuzją Ap₄A. *Protokół doświadczenia jak w opisie Ryc.11.* Wyniki wyrażono w wartościach bezwzględnych (μmol/min) w przebiegu doświadczenia. Każdy punkt jest wartością średnią (n = 5) ± SE. *p ≤ 0,05 obliczone względem odpowiedniego okresu kontrolnego. #p ≤ 0,05 obliczone względem odpowiedniego okresu w grupie po zabiegu pozorowanym.



Ryc. 16. Wpływ odnerwienia na natriurezę indukowaną infuzją analogów ATP. *Protokół doświadczenia jak w opisie Ryc. 12.* Wyniki wyrażono jako procent zmian GFR w czasie 60 minut infuzji testowanych związków w odniesieniu do odpowiednich wartości wyjściowych (okres kontrolny). Każdy punkt jest wartością średnią (n = 5) ± SE. *p ≤ 0,05 obliczone względem odpowiedniego okresu kontrolnego, #p ≤ 0,05 obliczone względem odpowiedniej grupy kontrolnej.



Ryc. 17. Wpływ odnerwienia na frakcyjne wydalanie sodu z moczem indukowane infuzją Ap₄A i analogów ATP. Protokół doświadczenia jak w opisie Ryc. 12. Wyniki wyrażono jako procent zmian frakcyjnego wydalania sodu (FE_{Na}) i moczu (FE_{UV}) w odniesieniu do odpowiednich wartości podstawowych (okres kontrolny) w grupie po zabiegu pozorowanym (słupek biały) oraz w grupie szczurów po przewlekłym odnerwieniu nerek (słupek czarny). Każdy punkt jest wartością średnią ($n = 5$) \pm SE. * $p \leq 0,05$ obliczone względem wartości podstawowej (okres kontrolny), # $p \leq 0,05$ obliczone względem grupy zwierząt po zabiegu pozorowanym.

6. DYSKUSJA

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń potwierdzają wcześniejsze obserwacje [70] oraz dostarczają dalszych dowodów wskazujących, że dożylne podanie Ap_4A wywołuje natriurezę i diurezę bez istotnych zmian w wydalaniu potasu. W większej dawce hamuje również hemodynamikę nerkową (przepływ krwi przez nerki; RBF) i w konsekwencji prędkość przesączania kłębuszkowego (GFR). Diuretyczne i natriuretyczne działanie Ap_4A , które występuje pomimo spadku filtracji kłębuszkowej dowodzi, że nukleotyd ten działa na mechanizm transportu sodu w kanalikach nerkowych.

Podobne zmiany funkcji nerek, chociaż z nieco innym nasileniem, obserwowano, gdy szczurom dożylnie podano analogi ATP, tj. β,γ -MeATP oraz 2-MeSATP. Wcześniej opisano, że związki te są swoistymi agonami receptorów P2: β,γ MeATP – agon receptorów P2X oraz 2-MeSATP – agon receptorów P2Y. Aktywator receptorów P2X stymulował diurezę i natriurezę, bez istotnych zmian GFR, podczas gdy aktywator receptorów P2Y w znacznie większym stopniu obniżał GFR niż podany w tej samej dawce Ap_4A (Ryc.8, 9 i 10).

Znamienny wzrost frakcyjnego wydalania (FE) jonów sodowych, chlorkowych i fosforanowych wskazuje, że znaczna część tych jonów wcześniej przefiltrowanych w kłębuszkach nerkowych ulega wydalaniu z moczem w następstwie podania do krążenia Ap_4A lub analogów ATP. Zwiększeniu uległo również frakcyjne wydalanie litu sugerując, że kanaliki proksymalne mogą być głównym miejscem zahamowania wchłaniania zwrotnego sodu.

Wcześniej opisano [75], że w kanalikach proksymalnych jony litu ulegają reabsorpcji w ilościach proporcjonalnych do jonów sodu,

natomiast w dalszych częściach nefronu lit praktycznie nie ulega reabsorpcji. Z innych badań wynika, że lit może ulegać reabsorpcji również w dalszych częściach nefronu w warunkach ograniczonej podaży sodu [74]. W obecnie prezentowanych doświadczeniach zwierzęta były karmione dietą standardową, a zatem można przyjąć, że w tych warunkach doświadczalnych, klirens litu jest wyznacznikiem objętości izotonicznego płynu opuszczającego kanalik proksymalny i pośrednio ilości jonów sodowych wpływających do dalszych części nefronu. Zastosowanie tej techniki w obecnych doświadczeniach pozwoliło wykazać, że Ap_4A i 2-MeSATP oraz w mniejszym stopniu β,γ -MeATP zwiększają objętość płynu opuszczającego kanaliki proksymalne. Otrzymane dane uwidoczniły również, że β,γ -MeATP zwiększa frakcyjne wydalanie sodu z dalszych części nefronu sugerując, że analog ten hamuje reabsorpcję sodu również w tej części nefronu. Z kolei zmiany wywołane infuzją Ap_4A , czy też 2-MeSATP w dalszych częściach nefronów nie były statystycznie znamienne. Jednakże zbyt duży rozrzut uzyskanych wartości dla klirensu litu i sodu mógł przyczynić się do zaciemnienia ewentualnych zmian w reabsorpcji sodu w tej części nefronów.

W pracy tej wykazałam, że Ap_4A obniża GFR powodując jednocześnie spadek RBF bez istotnych zmian średniego ciśnienia tętniczego krwi (MAP). Wyniki te sugerują, że zmniejszony przepływ krwi przez nerki może być konsekwencją zwiększonego oporu naczyń wewnątrz-nerkowych. W oparciu o uzyskane dane wyliczono, że Ap_4A zwiększył oporność naczyń nerkowych około 50%. Dane te potwierdzają wcześniejsze obserwacje dotyczące zmian nerkowej hemodynamiki w doświadczeniach klirensowych z Ap_4A [70] oraz na modelu perfundowanej nerki [38]. Dodatkowym dowodem wskazującym na możliwość bezpośredniego oddziaływania Ap_nA na

system naczyń krwionośnych w nerkach są wyniki doświadczeń *in vitro* na izolowanych kłębuszkach nerkowych - przedstawione na Ryc. 4 oraz opublikowane przez nas w *Br. J. Pharmacol* [69]. Ap₄A zmniejszał objętość wewnątrzkapilarną kłębuszka nerkowego (GIS) w stopniu zależnym od jego stężenia w środowisku zewnętrznym i czasu inkubacji. Zmiany GIS występowały również w obecności Ap₃A i Ap₅A i były odwracalne w obecności antagonistów receptorów P₂ - suraminy oraz błękitu reaktywnego-2. Jednakże w doświadczeniach tych, jak i w obecnie prezentowanej pracy, nie ustalono czy zmiany dynamiki naczyń nerkowych są efektem działania Ap₄A *per se*, czy też produktu jego hydrolizy - ATP. Wysoka aktywność w kłębuszkach nerkowych ekto-enzymów hydrolizujących dinykleotydy adeninowe do naczynioaktywnych mononukleotydów wskazuje, że Ap₄A pojawiający się w tej części nefronu może być źródłem ATP. Z kolei ATP, jak wykazały wcześniejsze badania, za pośrednictwem receptorów P₂X i P₂Y - zlokalizowanych na komórkach kurczliwych kłębuszka – wywołuje skurcz, a za pośrednictwem receptorów P₂Y – zlokalizowanych na komórkach śródbłonka – relaksację naczyń kapilarnych kłębuszka [32]. Wydaje się więc możliwe, że zmiany funkcji nerek szczura w czasie dożylniej infuzji Ap₄A są wywołane, przynajmniej częściowo, przez ATP.

Obserwowany spadek GFR w obecnie prezentowanych doświadczeniach, szczególnie w tych z użyciem Ap₄A i 2-MeSATP, może być wynikiem uruchomienia mechanizmu ujemnego sprzężenia kanalikowo-kłębuszkowego poprzez zwiększony dowóz sodu do dalszych części nefronu ($C_{in} - C_{Li}$). Mechanizm ten, w warunkach zwiększonego ładunku sodu napływającego w okolice *macula densa*, stymuluje spadek GFR w pojedynczym nefronie. Postulowany jest pogląd, że mediatorem sprzężenia zwrotnego jest adenozyne i jej

receptory A1 [61] i/lub ATP [46]. Jednakże zastosowanie w obecnych doświadczeniach teofiliny - antagona receptorów adenozyiny – nie miało istotnego wpływu na hamujące działanie Ap_4A na filtrację. Z kolei suramina – antagon receptorów P2 całkowicie blokowała działanie Ap_4A na funkcję nerek, co potwierdza możliwość działania Ap_4A i/lub jego metabolitu – ATP za pośrednictwem receptorów P2-na funkcję kłębuszka nerkowego i kanalika.

W doświadczeniach, w których obniżono aktywność układu współczulnego nerek, poprzez przecięcie nerwów nerkowych, obserwowano spadek GFR (ok. 20%; Ryc.11) i wzrost wydalania sodu z moczem (ok. 4-krotny; Ryc.15) w odniesieniu do grupy zwierząt, której wykonano zabieg pozorowany. Wyniki te potwierdzają fizjologiczną odpowiedź nerek, wyrażoną zahamowaniem reabsorpcji sodu, w warunkach obniżonej aktywności współczulnej nerek i mogą być traktowane jako potwierdzenie efektywności dokonanego zabiegu odnerwienia [17]. Należy nadmienić, iż dla pełnego potwierdzenia efektywności odnerwienia należałoby oznaczyć stężenie noradrenaliny w nerce. Zastosowany w obecnej pracy model przewlekłego, obustronnego odnerwienia nerek pozwolił zbadać odpowiedź nerek na pobudzenie układu purynergicznego w sytuacji obniżonej/zniesionej aktywności układu współczulnego. Użycie w tych doświadczeniach swoistych agonów receptorów purynowych pozwoliło na analizę udziału receptorów P2X i P2Y w regulacji funkcji nerek. W piśmiennictwie znajduje się wiele doniesień, z których wynika, że odnerwienie może modyfikować odpowiedź naczyń na egzogenne neurotransmitery, czy też hormony oraz czynniki o charakterze auto/parakrynym. Stwierdzono, że izolowane kłębuszki nerkowe – pochodzące z farmakologicznie odnerwionych nerek – pod wpływem noradrenaliny w większym

stopniu akumulują inozytolo-trifosforan (IP_3), niż kłębuszki pochodzące od szczurów normalnych [6]. Przewlekłe odnerwienie nerki zmienia jej odpowiedź na podawaną do krążenia noradrenalinę [35]. W normalnych warunkach noradrenalina obkurcza naczynia krwionośne nerek oraz stymuluje reabsorpcję sodu, a działanie to jest nasilone w nerce z obniżoną/zniesioną podstawową aktywnością układu sympatycznego. Zwiększona reaktywność narządów na noradrenalinę prawdopodobnie jest wynikiem zwiększonej ekspresji synaptycznych receptorów dla noradrenaliny tj. receptorów α_1 [17]. Odnerwienie nerek zwiększa fosfaturyczny efekt działania PTH na kanalik proksymalny [42]. Również odpowiedź odnerwionych narządów na działanie agonów receptorów purynowych była przedmiotem badań, chociaż stosunkowo nielicznych. W doświadczeniach na odnerwionej nerce wykazano, że aktywność reninowa osocza indukowana agonami receptorów adenozykowych A_2 jest mniejsza w warunkach odnerwienia [59]. Doświadczenia te sugerują, iż uwalnianie reniny pod wpływem aktywacji receptorów A_2 jest wspomagane w obecności podstawowej aktywności sympatycznej nerek. Stymulacja receptorów adenozy, A_1 i A_2 w nerkach, prowadzi do zmian w hemodynamice nerek oraz ich funkcji wydalniczej [13,47,77]. Wykazano, że aktywność układu sympatycznego zmienia wrażliwość nerek na działanie agonów receptorów A_1 i A_2 . Na modelu ostrego odnerwienia (40 minut po zabiegu przecięcia nerwów nerkowych) wykazano, że agon receptorów A_2 tj. NECA w mniejszym stopniu hamuje wydalanie sodu niż w nerce unerwionej. Takiego efektu nie zaobserwowano w odniesieniu do agona receptorów A_1 tj. CCPA [54]. Z kolei w warunkach obniżonej/zniesionej podstawowej aktywności układu sympatycznego w wyniku przewlekłego odnerwienia nerek (3-6 dni

po zabiegu), stwierdzono wzmożony efekt działania agona receptorów A1, co objawiało się znacznie większym spadkiem GFR, RBF i zwiększoną reabsorpcją sodu i potasu niż u zwierząt normalnych [15]. Wyniki obecnie przeprowadzonych doświadczeń wskazują, że odpowiedź nerek na Ap_4A i niemetabolizujące się analogi ATP ulega również modyfikacji w sytuacji obniżenia/zniesienia podstawowej aktywności układu sympatycznego nerek. W doświadczeniach tych wykazałam, że przewlekłe odnerwienie nerek powoduje, iż stają się one odporne na natriuretyczne działanie Ap_4A i agona receptorów P2Y – 2-MeSATP. Podobną natriuretyczną oporność odnerwionej nerki opisano w stosunku do dopaminy [29].

W warunkach fizjologicznych wielkość natriurezy jest regulowana w przeważającej mierze przez aktywność $Na^+-K^+-ATPazy$ zlokalizowanej w błonie podstawno-bocznej komórek kanalików (bliższych i dalszych). W mniejszym stopniu wielkość natriurezy jest zależna od aktywności transportu wymiennego jonu sodowego na jon wodorowy. $Na^+-K^+-ATPaza$ jest fosfoproteiną; fosforylacja zmniejsza a defosforylacja zwiększa jej aktywność. Istotnym czynnikiem fizjologicznym, który aktywuje $Na^+-K^+-ATPazę$ jest noradrenalina uwalniana z zakończeń nerwowych w nerkach. Poprzez aktywację fosfatazy białkowej zależnej od kalmoduliny, tj. kalcineuryny, dochodzi do defosforylacji $Na^+-K^+-ATPazy$ albo innych białek, które wpływają pośrednio na aktywność $Na^+-K^+-ATPazy$ tj. fosfoproteiny regulowanej przez dopaminę i cykliczny AMP. Konsekwencją wzrostu aktywności $Na^+-K^+-ATPazy$ jest zwiększone wchłanianie zwrotne jonów sodu oraz związków transportowanych z jonami sodu np. fosforan, glukoza. Stąd też obserwuje się zmniejszoną natriurezę pod wpływem aktywacji układu sympatycznego nerek, a z drugiej strony zwiększone wydalanie sodu z moczem w wyniku odnerwienia

nerki. Do innych czynników regulujących natriurezę należy również dopomina. Poprzez rodzinę receptorów (D_{1-5}) rozmieszczonych wzdłuż nefronu, sprzężonych z białkami G aktywuje ona kinazę białkową A (PKA) lub kinazę białkową C (PKC), która z kolei aktywuje fosfolipazę A_2 (PLA_2). Enzym ten zwiększa metabolizm kwasu arachidonowego w cytochromie P-450 i powstanie 20-HETE. Zarówno PKA, jak i PKC oraz 20-HETE zwiększają stopień ufosforylowania Na^+K^+ -ATPazy, co wiedzie do obniżenia jej aktywności, a to z kolei do zmniejszonego wchłaniania zwrotnego sodu [12]. W nerkach dopamina jest uwalniana z zakończeń nerwowych. Produkowana jest również przez komórki kanalika bliższego i dlatego przewlekłe odnerwienie nie wpływa na jej stężenie w płynie pozakomórkowym nerek. Można więc założyć, że w przewlekłym odnerwieniu, przy niedoborze noradrenaliny i prawidłowym stężeniu dopaminy, Na^+K^+ -ATPaza znajduje się w stanie wzmożonej fosforylacji. Wydaje się, że dalsza fosforylacja indukowana przez inne czynniki nie jest możliwa i dlatego też pojawia się oporność odnerwionych nerek na natriuretyczne działanie endogennej dopaminy. Ap_4A , podobnie jak dopomina, nie wywierał efektu natriuretycznego w nerce odnerwionej. U podłoża oporności nerek odnerwionych na działanie Ap_4A , czy też agona receptorów P2Y, może znajdować się podobny mechanizm jaki opisano dla dopaminy. Obecne badania z zastosowaniem antagonistów i agonów receptorów P2 sugerują, że Ap_4A wywołuje natriurezę za pośrednictwem receptorów P2Y. Z badań nad receptorami P2Y wynika, że Ap_4A aktywuje receptory P2Y₂ i P2Y₁₁. Receptory P2Y₂ zlokalizowane są przede wszystkim w kanaliku bliższym, natomiast receptory P2Y₁₁ głównie w kanaliku dalszym. Pobudzenie receptorów P2Y₂ prowadzi do wzrostu aktywności PKC, natomiast w wyniku

pobudzenia receptorów P2Y₁₁ wzrasta stężenie cyklicznego AMP, co może sugerować zaangażowanie PKA. Można postawić hipotezę badawczą, że natriuretyczne działanie Ap₄A jest związane z aktywacją receptorów P2Y₁ i P2Y₁₁ i jest następstwem fosforylacji Na⁺-K⁺-ATPazy przez PKA i PKC. Ocena stopnia fosforylacji Na⁺-K⁺-ATPazy w poszczególnych odcinkach nefronów, a także zastosowanie swoistych antagonistów receptorów P2 (P2Y₂ i P2Y₁₁) pozwoliłoby na potwierdzenie stawianej hipotezy.

W pracy tej wykazałam również, że w nerce odnerwionej w większym stopniu niż w nerce unerwionej ujawniają się naczyniowe i kanalikowe działania agona receptorów P2X. Pobudzenie receptorów P2X zwiększa wydalanie wody i sodu z moczem w większym stopniu w nerce odnerwionej, niż unerwionej. W doświadczeniach na hodowanych komórkach kanalika dalszego wykazano, że agony receptorów P2X zmniejszają transport sodu do komórki [43], czego konsekwencją w warunkach *in vivo* może być zwiększona natriureza. Nasilenie natriuretycznego działania agona dla receptorów P2X w nerce przewlekłe odnerwionej może wynikać ze wzrostu ilości receptorów P2X w zakończeniach nerwowych, podobnie, jak to ma miejsce dla receptorów noradrenaliny. Zwiększona reaktywność kanalika nerkowego w sytuacji obniżonego/zniesionego napięcia układu sympatycznego nerek wskazuje, że receptory P2X znajdują się pod tonicznym hamującym wpływem układu nerwowego. Również w nerce odnerwionej dochodzi do odmiennej odpowiedzi systemu naczyń tętniczych nerki na pobudzenie receptorów P2X, czego konsekwencją jest spadek GFR, jakiego nie obserwowano w nerce unerwionej. Obserwowany spadek GFR może być wynikiem obkurczenia tętniczki

doprowadzającej, gdzie obok receptorów P2Y obecne są receptory P2X.

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że obniżenie aktywności układu adrenergicznego, poprzez odnerwienie nerek, w zasadniczy sposób zmienia natriuretyczny i diuretyczny efekt działania nukleotydów adeninowych na nerkę. Obserwacje te wskazują na powiązanie systemu purynergicznego z aktywnością układu adrenergicznego w nerkach. Ponieważ nerka odnerwiona stanowi model zbliżony do nerki przeszczepionej, dlatego też scharakteryzowanie mechanizmu wzajemnej relacji obu układów kontrolujących hemodynamikę i transport sodu w kanalikach nerkowych przyczyni się do lepszego zrozumienia fizjologii i biochemii nerki przeszczepionej – i wymaga dalszych badań.

7. WNIOSKI

Dożylna infuzja Ap_4A zmienia funkcję nerek – wywołuje natriurezę i diurezę oraz hamuje tempo filtracji kłębuszkowej. W działanie to zaangażowane są receptory P2, których aktywatorem może być zarówno Ap_4A , jak i produkt jego hydrolizy – ATP. Nukleotydy te za pośrednictwem receptorów P2X i P2Y stymulują natriurezę, a za pośrednictwem receptorów P2Y hamują prędkość filtracji kłębuszkowej.

Obniżona – w wyniku odnerwienia nerek – aktywność układu współczulnego czyni nerki niewrażliwe na natriuretyczne działanie agonów receptorów P2Y, podczas gdy zwiększa wrażliwość na działanie agonów receptorów P2X. Na tej podstawie wnioskujemy, że układ purynergiczny – szczególnie receptory P2X zlokalizowane w obrębie kanalików nerkowych – znajdują się pod hamującym wpływem układu sympatycznego. Z kolei efekt aktywacji receptorów P2Y występuje przy współistnieniu podstawowej aktywności układu sympatycznego.

8. PIŚMIENICTWO

1. Abbracchio M.P., Burnstock G. Purinoreceptors: are there families of P2X and P2Y purinoreceptors? *Pharmacol Ther.*, 1994; 64(3): 445-75.
2. Anderson S.: Relevance of single nephron studies to human glomerular function. *Kidney Int.* 1994; 45: 384-389.
3. Angielski S., Kuchta G., Redlak M., Szczepańska-Konkel M.: Attenuated glomerular responses to atria natriuretic factor in low-sodium rats prevented by theophylline. *Biochem Biophys. Res Commun.*, 1990; 31(170): 596-602.
4. Ausiello D.A., Kreisberg J.I., Roy C., Karnovsky M.J.: Contraction of cultured rat glomerular cells of apparent mesangial origin after stimulation with angiotensin II and arginin vasopressin. *J. Clin. Invest.* 1980; 65: 754-760.
5. Bagorda A., Guerra L., Di Sole F., Helmle-Klob C., Favia M., Jacobson K.A., Casavola V., Reshkin S.J.: Extracellular adenine nucleotides regulate Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 activity in A6-NHE3 transfectans by a cAMP/PKA-dependent mechanism. *J Membr Biol.* 2002; 188: 249-259.
6. Bailey M.A., Turner C.M., Hus-Citharel A., Marchetti J., Imbert-Teboul M., Milner P., Burnstock G., Unwin R.J.: P2Y Receptors Present in the Native and Isolated Rat Glomerulus. *Nephron Physiol.* 2004; 96: 79-90.
7. Blantz R.C., Pelayo J.C.: A functional role for the tubuloglomerular feedback mechanism. *Kidney Int.* 1984; 25: 739-746.

8. Blanz R.C., Gabbai F.B., Tucker B.J., Yamamoto T., Wilson C.B.: Role of mesangial cell in glomerular response to volume and angiotensin II. *Am. J. Physiol.* 1993; 264: F158-F165.
9. Bratton A.C., Marshall E.K.: A new coupling component for sulfanilamide determination. *J. Biol. Chem.* 1939; 28, 537-540.
10. Burnstock G.: Purine – mediated signaling in pain and visceral perception. *Trends in Pharmacological Sci.* 2001; 4: 182-188.
11. Burnstock G.: The purinergic nerve hypothesis. *Ciba Found Symp.* 1977; 48: 295-314.
12. Carey R.M.: Renal Dopamine System. Paracrine Regulator of Sodium Homeostasis and Blood Pressure. *Hypertension.* 2001; 38: 297-302.
13. Churchill P.C., Bidani A.K.: Renal effect of selective adenosine receptor agonists. *Am. J. Physiol.*, 1987; 252: F299-303.
14. Cogan M.G.: Angiotensin II; a powerful controller of sodium transport in the early proximal tubule. *Hypertension.* 1990: 15: 451-458.
15. Cook C.B., Churchill P.C.: Effects of renal denervation on the renal responses of anesthetized rats to cyclohexyadenosine. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1984; 62: 934-938.
16. Czekalski S., Chansel D., Vandermeersch S., Ronoco P., Ardaillou R.: Evidence for angiotensin IV receptors in human collecting duct cells. *Kidney Int.* 1996; 50(4): 1125-1131.
17. DiBona G.F., Kopp U.C.: Neural control of renal function. *Physiol. Rev.* 1997; 77: 75-197.
18. Dillingham M.A., Anderson R.J.: Purinergic regulation of basal and arginine vasopressin –stimulated hydraulic conductivity in rabbit cortical collecting tubule. *J. Membr. Biol.* 1985; 88:277-281.

19. Dunn M.J: Renal prostaglandins In: *Renal Endocrinology*. Baltimore, Maryland. Williams and Wilkins (eds). 1989; 1-74.
20. Edwards R.M.: Basolateral, but not apical, ATP inhibits vasopressin action in rat inner medullary collecting duct. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 438: 179-181.
21. Ernsberger P., Zhou J., Damon T.H., Douglas J.G.: Angiotensin II receptors subtypes in cultured rat renal mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: F411-F416.
22. Flodgaard H., Klenow H.: Abundant amounts of diadenosine 5'5''' – P₁, P₄-tetraphosphate are present and releasable, but metabolically inactive in human platelets. *Biochem. J.* 1982; 208: 737-742.
23. Fredholm B.B., Abbracchio M.P., Burnstock G., Dubyak G.R., Harden T.K., Jacobson K.A, Schwabe U., Williams M.: Towards a revised nomenclature for P₁ and P₂ receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 1997; 18(3): 79-82.
24. Fujiwara Y., Kitamura E., Ochi S., Shin S.H., Fukunaga M., Yokoyama K., Fukuhara Y., Ueda N., Kamada T., Orita Y.: Isotopic measurement of glomerular intracapillary volume as a quantitative index for mesangial cell contractility. *Contrib. Nephrol.* 1991; 95: 12-21.
25. Gomori G.: Standard methods of clinical chemistry. 84; *Academic Press*; New York, 1953.
26. Gosink E.C., Forsberg E. Effects of ATP and bradykinin on endothelial cell Ca²⁺ homeostasis and formation of cGMP and prostacyclin. *Am. J. Physiol.* 1993; 265: C1620-C1629.
27. Haberle D.A., Baeyer H.; Characteristic of glomerulotubular balance. *Am. J. Physiol.* 1983; 244: F355-F366.

28. Hill R.J., Oleynek J.J., Hoth C.F., Kiron M.A., Wemg W., Wester R.T., Tracey W.R., Knight D.R., Buchholz R.A., Kennedy S.P.: Cloning, expression and pharmacological characterization of rabbit adenosine A1 and A3 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997; 280: 122-128.
29. Ibarra F., Aperia A., Svensson L.B., Eklöf A.Ch.: Bidirectional regulation of Na⁺,K⁺-ATPase activity by dopamine and an α -adrenergic agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90: 21-24.
30. Jackson E.,K., Raghvendra D.,K.: The extracellular Cyclic AMP – Adenosine Pathway in Renal Physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 2004; 66: 571-599.
31. Jankowski M., Szczepańska-Konkel M., Kalinowski L., Angielski S.: The role of P2Y-receptors in the regulation of glomerular volume. *Med. Sci. Monit.*, 2001; 7, 635-640.
32. Jankowski M., Szczepańska-Konkel M., Kalinowski L., Angielski S.: Bidirection action of extracellular ATP on intracapillary volume of isolated rat renal glomeruli. *J. Physiol. Pharmacol.* 2000; 51 (3): 491-496.
33. Johns E.J.: The autonomic nervous system and pressure-natriuresis in cardiovascular-renal interaction in response to salt. *Clin. Auton. Res.* 2002; 12: 256-263.
34. Klotz K.,N.: Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn Schmiedebergs. Arch Pharmacol.* 2000; 362 (4-5): 382-391.
35. Krayacich J., Kline R.L., Mercer P.F.: Supersensitivity to NE alters renal function of chronically denervated rat kidneys. *Am. Physiol. Sci.* 1987; F856-F864.
36. Kriz W., Elger M., Lemley K., Sakai T.: Structure of the glomerular mesangium: A biomechanical interpretation. *Kidney Int.* 38, 1990; Suppl. 30: S2-S9.

37. Kriz W., Elger M., Mundel P., Lemley K.V. Structure-satilizing forces in the glomerular tuft. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1995; 5: 1731-1739.
38. Langner G.: Wpływ diadenozynotetrafosforanu na funkcję nerek. Praca doktorska. Akademia Medyczna w Gdańsku. 2002.
39. Leder E.D., McLeish K.R. P2 purinoreceptor stimulation attenuates PTH inhibition of phosphate uptake by a G protein – dependent mechanism. *Am. J. Physiol.* 1995; 269: F309-F316.
40. Lehrmann H., Thomas J., Kim S.J., Jacobi C., Leipziger J.: Luminal P2Y₂ receptor-mediated inhibitions of Na⁺ absorption in isolated perfused mouse CCD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002; 13: 10-18.
41. Lopez-Novoa J.M., de Arriba G., Barrio V., Rodriguez-Puyol. Adenosine induces a calcium-dependent glomerular contraction. *Europ. J. Pharmacol.* 1987; 134: 356-357.
42. Mann K.J., Rybczyńska A., Berndt T.J., Hoppe A., Tyce G.M., Knox F., G.: Renal Denervation Enhances the Phosphaturic Effect of Parathyroid Hormone. *Miner Electrolyte Metab.* 1991; 17: 16-20.
43. McCoy D.E., Taylor A.L., Kudlow B.A., Karlson K., Slattery M.J., Schwiebert L.M., Schwiebert E.M., Stanton B.: Nucleotides regulate NaCl transport in mIMCD-K2 cells via P2X and P2Y purinergic receptors. *Am. Physiol. Sci.* 1999; F552-F559.
44. Miras –Portugal M.T., Gualix J., Pintor J.: The neurotransmitter role of diadenosine polyphosphates. *FEBS.* 1998; 430: 78-82.
45. Misra R.P.: Isolation of glomeruli from mammalian kidneys by graded sieving. *Am. J. Clin. Phatol.* 1972; 58: 135-139.

46. Mitchell K.D., Navar G.: Modulation of tubuloglomerular feedback responsiveness by extracellular ATP. *Am. J. Physiol.* 1993; 264: F458-466.
47. Miyamoto M., Yagil Y., Larson T., Robertson C., Jamison R.L.: Effect of intrarenal adenosine on renal function and medullary blood flow in the rat. *Am. J. Physiol.* 1988; 255: 1230-1234.
48. Mundel P., Kriz W.: Structure and function of podocytes: An update. *Anat. Embryol.*, 1995; 192: 385-397.
49. North R., A. Molecular Physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 1013-1067.
50. Olivera A., Lamas S., Rodriguez-puyol D., Lopez-Novoa J.: Adenosine induces mesangial cell contraction by an A1-type receptor. *Kidney Int.* 1989; 35: 1300-1305.
51. Osswald H., Hermes H., N., Nabakowski G.: Role of adenosine in signal transmission of tubuloglomerular feedback. *Kidney Int.*, 1982; 22(12): 136-142.
52. Osswald H., Nabakowski G., Hermes H.H.: Adenosine as a possible mediator of metabolic control of glomerular filtration rate. *Int. J. Biochem.*, 1980; 12: 262-267.
53. Osswald H.: Renal effects of adenosine and their inhibition by theophylline in dog. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Sci.* 1975; 288: 79-86.
54. Panzacchi G., Demarchi B., Busca G., Protasoni G., Golin R., Stella A.: Effects of adenosine receptor agonists on renal function in anaesthetized rats. *Hypertension.* 1997; 15: 1785-1789.
55. Pettinger W.A., Mitchel H.C.: Clinical pharmacology angiotensin antagonists. *Fed. Proc.* 1976; 35: (12), 2531-5.

56. Pfister M.F., Forgo J., Zeigler U., Biber J., Murer H.: cAMP-dependent and -independent downregulation of type II Na-Pi cotransporters by PTH. *Am. J. Physiol.* 1999; 276: F720-F725.
57. Pintor J., Diaz-Rey M.A., Tores M., Miras-Portugal M.T: Presence of diadenosine polyphosphates – Ap₄A and Ap₅A – in rat brain synaptic terminals. Ca²⁺ dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine. *Neuroscience Letter.* 1992; 136: 141-144.
58. Pintor J., Puche J.A., Gualix J., Hoyle C.H.V., Miras-Portugal M.T.: Diadenosine polyphosphates evoke Ca²⁺ transients in guinea-pig brain via receptors distinct from those for ATP. *Journal of Physiology.* 1997; 504(2): 327-335.
59. Protasoni G., Castoldi G., Busca G., Panzacchi G., Genovesi S., Golin R., Stella A.: Effects of adenosine-receptor agonists on rennin release in anaesthetized rats. *Hypertension.* 1995; 13: 1753-1757.
60. Schaltter E., Ankorina I., Xaxelmans S., Kleta R.: Effects of diadenosine polyphosphates, ATP and angiotensin II on cytosolic Ca²⁺ activity and contraction of rat mesangial cells. *Pflugers Archiv.* 1995; 430: 721-728.
61. Schnermann J., Weihprecht H., Briggs J.P.: Inhibition of tubuloglomerular feedback during adenosine receptor blockade. *Am. J. Physiol.* 1990; 258: F553-F561.
62. Schulze-Lohoff E., Zanner S., Ogilvie A., Sterzel R.B.: Extracellular ATP stimulates proliferation of cultured mesangial cells via P₂-purinergic receptors. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 1992; 263: F374-383.

63. Schwiebert E.M., Kishore B.: Extracellular nucleotide signaling along the renal epithelium. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2001; 280: F945-963.
64. Simons M.S., Rooney A.: Characterization of endothelin receptors in mesangial cells: evidence for two functionally distinct endothelin binding sites. *Mol. Pharmacol.* 1994; 46: 41-50.
65. Singhal P.C., DeCandido S., Satriano J.A., Schlondorff D., Hays R.M.: Atrial natriuretic peptide and nitroprusside cause relaxation of cultured rat mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 1989; 257: C86-C93.
66. Soares T.J., Coimbra T.M., Maryinis A.R., Pereira A.G., Carnio E.C., Branco L.G.S., Albuquerque-Araujo W.I.C., de Nucci G., Favaretto A.L.V., Gutkowska J., McCann, Antunes-Rodrigues J. Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96: 278-283.
67. Steinmetz M., Van Lee T., Hollah P., Gabriels G., Hohage H., Heinz Rahn K., Schalatter E.: Influence of purinoreceptor antagonism on diadenosine pentaphosphate-induced hypotension in anesthetized rats. *J. of Pharmacol. And Experiment Therap.* 2000; 294: 963-968.
68. Suga S., Nakao K., Mukoyama M., Arai H., Hosoda K., Ogawa Y., Amura H.: Characterization of natriuretic peptide receptors in cultured cells. *Hypertension.* 1992; 19: 762-765.
69. Szczepańska-Konkel M., Jankowski M., Stiepanow-Trzeciak A., Angielski S.: Effects of diadenosine polyphosphates on glomerular volume. *Br. J. Pharmacol.* 2005; 144: 1109-1117.

70. Szczepańska-Konkel M., Langner G., Bednarczuk G., Stiepanow-Trzeciak A., Jankowski M., Angielski S.: Renal hemodynamics and natriuretic responses to intravenous administration of diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) in rat. *J. Physiol. Pharmacol.* 2003; 54(2): 163-173.
71. Szczepańska-Konkel M., Redlak M., Angielski S.: Glibenclamid-sensitive K⁺ channels are responsible for angiotensin II hypertensive contraction and atrial natriuretic factor refractoriness of glomeruli in low-sodium rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 181: 871-876.
72. Szczepańska-Konkel M., Redlak M., Kuchta G., Angielski S.: The role of intrarenal adenosine in glomerular action of atria natriuretic factor. *Cellular and Molecular Biology of the Kidney. Contrib. Nephrol.* Koide H., Endou H., Kurokawa K. (eds), 1991; 99: 90-101.
73. Szczepańska-Konkel M.: Rola adenozyyny w regulacji funkcji nerek. Rozprawa habilitacyjna. Akademia Medyczna w Gdańsku, 1996.
74. Thomsen K., Leyssac P.P.: Acute effects of various diuretics on lithium clearance. Studies in rats on medium and low sodium diet. *Renal Physiol.*, 1986; 9: 1-8.
75. Thomsen K.: Lithium clearance: a new method for determining proximal and distal reabsorption of sodium and water. *Nephron.* 1974; 37: 217-223.
76. Unwin R.J., Bailey M.A., Burnstock G.: Purinergic signaling Along the Renal Tubule: The Current State of Play. *News Physiol. Sci.* 2003; 18: 237-241.

77. Yagil Y., Schabel T., Jamison R.L.: The effects of adenosine on renal excretory function. *Kidney Int.* 1990; 37:381.
78. Zhao J., Ardaillou N., Lu C.Y., Placier S., Pham P., Badre L., Cambar J., Ardaillou R.: Characterization of C-type natriuretic peptide receptors in human mesangial cells. *Kidney Int.* 1994; 46: 717-725.