

Začiatky cesty k objavu *nátriuretických hormónov*

Štúdie o nátriuretickom hormone sú výsledkom výše storočného úsilia pochopiť regulačné mechanizmy zloženia a objemu extracelulárnej tekutiny, ktorú definoval Claude Bernard v roku 1885 ako vnútorné prostredie, zbytok oceánu v nás, v ktorom asi kedysi život vznikol.

Významným objavom bolo, že kľúčovým mechanizmom homeostázy objemu extracelulárnej tekutiny (ECT) je regulácia renálneho vylučovania sodíka a sekundárne aj vody, teda moča. Hovoríme preto o renálnej regulácii objemu extracelulárnej tekutiny. Zväčšenie objemu ECT zvýši kompenzačné vylučovanie sodíka a vody, vyvolá nátriurézu. Zmenšenie objemu vyvolá kompenzačnú antinátriurézu. Klasik nefrológie, Homer Smith, predvídal v tejto súvislosti na základe dostupných poznatkov z experimentálnej a klinickej nefrológie, že okrem mineralokortikoidov musí existovať aj nátriuretický systém regulujúci vylučovanie sodíka obličkami (Smith, 1957).

Prvé experimentálne dôkazy, že predpokladaný nátriuretický systém existuje, reprezentovaný špecifickým nátriuretickým hormónom, sú zo šesťdesiatich rokov minulého storočia. Mali biologický charakter a boli výsledkom pokusov založených na fyziologických metódach (DeWardener et al. 1961; Lichardus, Pearce 1966).

Renálna regulácia objemu extracelulárnej tekutiny - experimentálne prístupy

Bežným spôsobom objasňovania mechanizmu zvýšeného vylučovania sodíka obličkami - nátriurézy - je izoosmotické zväčšenie objemu ECT infúziou fyziologického, či Ringer-Lockeho roztoku, alebo

zväčšenie intravaskulárnej zložky ECT transfúziou krvi, plazmy alebo infúziou izoonkotického roztoku dextranu vo fyziologickom roztoku. Používa sa aj redistribúcia objemu krvi do krvného riečišťa v hrudníku, čím sa tiež vyvolá nátriuréza, aj keď sa nemení celkový objem krvi resp. celej ECT. Dosiahne sa, napríklad, zaujatím ležiacej polohy s mierne zvýšenými dolnými končatinami, alebo ponorením probanta po krk do termoneutralnej vody. Sofistikovanejší spôsob na redistribúciu krvi do krvného riečišťa v hrudníku je dýchanie proti negatívnemu tlaku vzduchu. Uvedené experimentálne postupy aktivujú regulačné mechanizmy objemu extracelulárnej tekutiny a sprístupnia ich štúdiu (Lichardus, 1978).

Historicky sa najmä dva faktory považovali za rozhodujúce pre nátriurézu: *prvý faktor* - zvýšenie glomerulárnej filtrácie; *druhý faktor* - utlmenie sekrécie antinátriuretických hormónov, mineralokortikoidov (kortikosterón, aldosterón).

Biologická evidencia pre existenciu nátriuretického hormónu

a) DeWardenerov pokus so skríženou cirkuláciou

Prvá správa o možnej existencii „*tretieho faktora*“ na základe cieľeného experimentálneho výskumu pochádza z roku

1961. Bola výsledkom pokusov profesora Hugh deWardenera, z Charing Cross Hospital v Londýne. Dokázal, že nátriuretická odpoveď (UNaV) u psa na zväčšenie objemu ECT infúziou fyziologického roztoku nastane, aj keď sa svorkou na aorte nad odstupom renálnych artérií zamedzí zvýšeniu glomerulárnej filtrácie (GF) a aj keď sa psovi súčasne aplikujú mineralokortikoidy a preto ich hladina nemôže klesnúť (Obr. 1; DeWardener et al., 1961). Ak teda nie je nutné pre vznik nátriurézy, aby sa zvýšila glomerulárna filtrácia a ani aby sa znížila hladina mineralokortikoidov v krvi, deWardener usúdil, že v hre musí byť tretí faktor. Čo by môhol byť „*tretí faktor*“, naznačili výsledky jeho ďalšieho typu pokusu.

Keď sa totiž pes so zväčšeným objemom extracelulárnej tekutiny a s následnou nátriurézou - nazvime ho donor, alebo darca, spojil skríženou cirkuláciou s druhým psom, recipientom, alebo príjemcom, ktorý mal normálny objem extracelulárnej tekutiny, začal aj recipient zvýšene vylučovať sodík, i keď v menšom merítku (UNaV) (obr. 1). Signál na vylučovanie sodíka bol preto zrejme aspoň zčasti prenosný krvou. Z toho sa usúdilo, že nátriuréza, vyvolaná zväčšením objemu ECT, má pravdepodobne aj humorálnu komponentu.

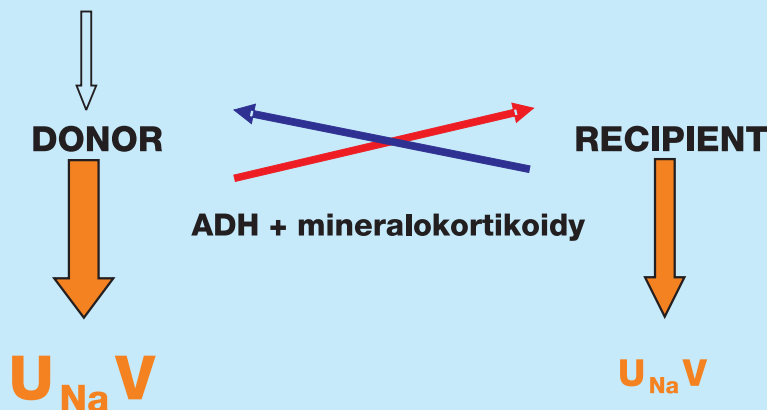
b) Náš pokus so skríženou cirkuláciou - Lichardus a Pearce

Nasledujúcim logickým krokom bol po-

POKUS SO SKRÍŽENOU CIRKULÁCIOU U PSOV deWardener (1961)

GF konštantná

Infúzia fyziologického roztoku



Obr. 1: Skrížená cirkulácia u psov v pokuse deWardenera. Popis obrázku je v texte.

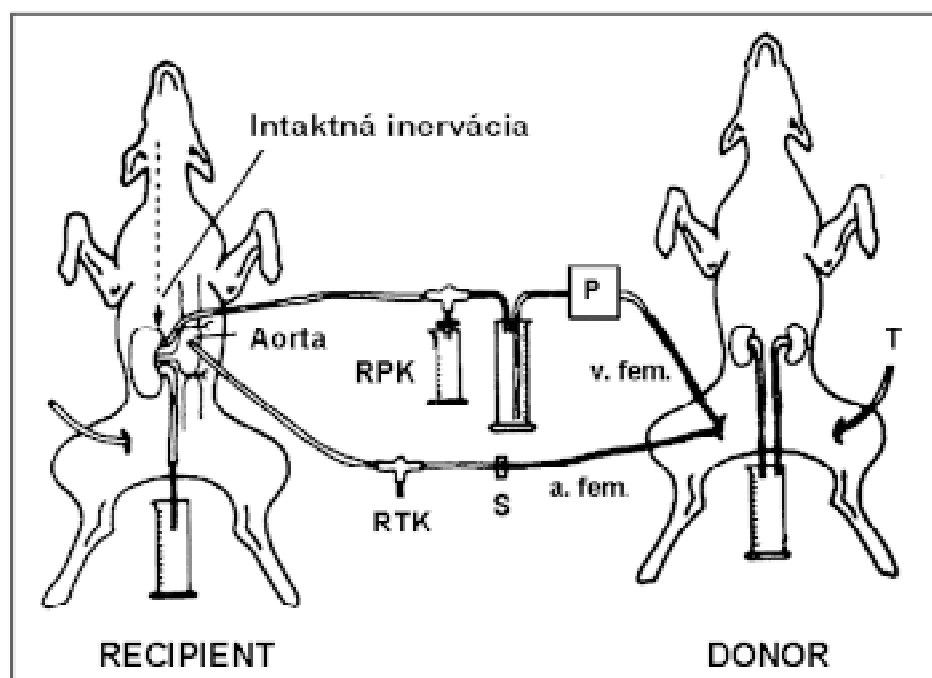
kus o objasnenie otázky, aká je podstata tejto prenosnej humorálnej komponenty nátriuretického signálu. V deWardenerovom pokuse to totiž mohlo byť aj zriedenie krvi infúziou fyziologického roztoku, o ktorom je známe, že má nátriuretický účinok.

Aby sa vnútorné prostredie následkom zväčšenia objemu ECT neriedilo, v našich pokusoch na psoch so skríženou cirkuláciou sme použili na zväčšenie objemu intravaskulárnej časti ECT transfúziu umelej krvi (premyté psie erytrocyty v 6% hovädzom albumíne v Ringer-Lockeho roztoku). Na vylúčenie novej, čo i len čiastočnej vzájomnej inkompatibility krvi medzi darcom a príjemcom, krvou darcu sme perfundovali len in situ izolovanú obličku príjemcu (obr. 2; 3; Lichardus, Pearce 1966).

Transfúzia umelej krvi vyvolala veľmi výrazné zvýšenie vylučovania sodíka a moča u psa - donora. A aj keď sa krv pokusných zvierat nezriedila, nátriuréza nastala, i keď v menšom rozsahu, aj u recipienta. Tak sa dokázalo, že nátriuretický signál prenášaný krvou nie je len výsledkom zriedenia krvi, ale má veľmi pravdepodobne aj špecifickú komponentu. Bolo preto reálne uvažovať o „tretom faktore“ ako o špecifickej nátriuretickej humorálnej látke (obr. 4).

Zistili sme však nielen prenos nátriurézy, ale aj prenos vazodilatačnej látky, ktorá

zvýšila mierne prietok krvi v obličke recipienta (RPK) napriek tomu, že bola perfundovaná počas celého pokusu konštantným perfúznym tlakom. Tieto hemodynamické zmeny sa tiež mohli na nátriuréze podieľať, aj keď bolo dokázané, že pre mechanizmus homeostatickej nátriurézy pri zväčšení objemu ECT sú len jedným z viacerých možných faktorov.



Obr. 2: Schéma skríženej cirkulácie u psov v pokuse Lichardusa a Pearcea. Oblička recipienta, izolovaná in situ od vlastného krvného obehu, bola perfundovaná konštantným tlakom krvou darcu (RTK=renálny tlak krvi), udržiavaným pomocou svorky na arteriálnej vetve spojenia (S). Ďalej bola kontrolovaná konštantnosť prietoku krvi perfundovanou obličkou (RPK=renálny prietok krvi) a venózna krv z perfundovanej obličky bola vracaná do kardiovaskulárneho riečišťa donora pomocou pumpy (P). (Lichardus, Kovács 1997)

Pokus o identifikáciu humorálnej nátriuretickej látky

Ďalším evidentným krokom bolo zistiť, či sa skutočne počas expanzie objemu ECT v krvi objavuje látka nátriuretická, možný nátriuretický hormón, alebo len klesne koncentrácia nejakej neznámej antinátriuretickej látky s podobným účinkom, ako má kortikosterón alebo aldosterón. Túto otázku sme riešili pokusom na kravách. Expandovali sme im intravaskulárny objem ECT infúziou izoonkotického dextranu vo fyziologickom roztoku. Pre výber kráv ako experimentálnych zvierat bolo rozhodujúce, že majú veľký objem krvi a dá sa jej odobrať na analýzu aj viac ako jeden liter bez toho, aby sa ohrozila ich hemodynamika a vyvolala by opačnú reakciu, teda retenciu sodíka. Krv sme krávam odobrali pred a po expanzii objemu ECT. Následne sa deproteinovala trichloroctovou kyselinou, precipitát sa zcentrifugoval a nízkomolekulárny supernatant sa extrahoval dietyl éterom.

Keď sa táto nízkomolekulárna frakcia krvi, odobranej po expanzii objemu ECT u kráv s výraznou nátriurézou, injikovala i.v. hydratovaným potkanom v dávke 0.2 ml., zvýšila u nich vylučovanie sodíka aj moča, ako aj tubulárnu rejekčnú frakciu sodíka. Ten istý objem nízkomolekulárnej



Obr. 3: Pokus so skríženou cirkuláciou medzi dvomi psami na Dept. of Physiology, Univ. of Alberta, Edmonton v r. 1964. Za vrcholom stola je prof. James W. Pearce, ďalej dvaja technici a autor tohoto článku.

frakcie, odobranej kravam pred expanziou objemu ECT, keď nemali nátriurézu, nezvýšil u potkanov ani vylučovanie moča ani sodíka (obr. 5.)

Na základe týchto výsledkov sme považovali za veľmi pravdepodobné, že nátriuretickým signálom počas zväčšenia objemu ECT je aktívna nátriuretická látka - nový hormón regulujúci vylučovanie sodíka obličkami (Lichardus et al., 1968).

Čo nasledovalo po získaní biologickej evidencie pre existenciu nátriuretického hormónu?

Uvedieme to už len v skratke. Ďalší výskum existencie nátriuretického hormónu viedol k dvom veľkým objavom:

1) k objavu endogenných digitálistu podobných látok a 2) átriálnych nátriuretických peptidov.

Objav digitálistu podobných látok

Áká bola cesta od výskumu nátriuretického hormónu k objavu digitálistu podobných látok?

Prakticky všetky bunky u vyšších živočíšnych druhov majú receptory na kardiálne steroidy. Sú na ubikvitárnych „sodíkových pumpách“, alebo, inými slovami, na transportnom enzýme Na-K-ATPáze, ktorá aktívne transportuje sodík z buniek. Sodíková pumpa je jediným známym receptorom pre exogénne kardiálne glykozidy, digoxín a ouabaín. Je ťažké uveriť, že by sa tento tak rozšírený receptor vyvinul

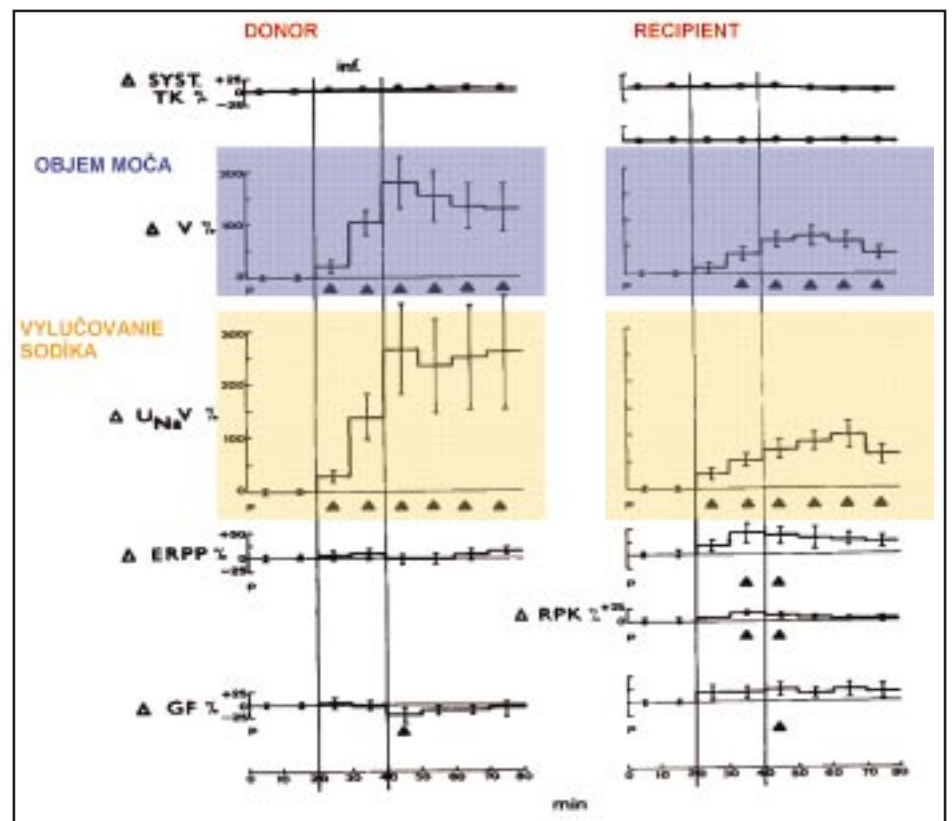
len preto, aby sa mohli jedného dňa kardiáci liečiť digitálistom.

Táto dilema viedla k špekulácii, či neexistuje endogenný ligand na tieto receptory. Laureát Nobelovej ceny Albert Szent-György v roku 1953, vyslovil hypotézu, skôr na empirickej ako na experimentálnej báze, že kardiálne glykozidy nie sú farma-

ká, ale skôr predstavujú chýbajúcu skrutku v našej telesnej aparátúre, ktorá má zásadnú úlohu v základných fyziologických reguláciách. Nemusíme byť preto prekvapení, ak najdeme digitálistu - podobné látky v ktorejkoľvek bunke.

Keď sa potom vo výskume nátriuretického hormónu zistilo, že parciálne purifikované nátriuretické látky z krvi alebo z moča inhibujú aktivitu transportného enzýmu Na-K-ATPázy (Kramer, Gonick 1974), urobilo sa skratové vysvetlenie, že nátriuretický hormón by mohol byť tým endogenným ligandom sodíkovej pumpy a teda digitálistu podobnou látkou (Gruber, Buckalew 1980). To sa však ku všeobecnej spokojnosti jednoznačne nepotvrdilo a pracuje sa na tomto probléme ďalej. Podstatné však je, že endogénne digitálistu podobné látky boli objavené a zistili sa aj ich klinické dôsledky pri liečbe kardiálnymi glykozidmi. Ak má totiž pacient zvýšené hladiny endogenných digitálistu podobných látok, treba exogénne kardiálne glykozidy opatrne dávkovať.

Objav endogenných digitálistu-podobných látok je analogicky objavu endogenných morfinu podobných látok - endorfinov.



Obr. 4: Reakcia donora-darcu a recipienta-prijemcu na expanziu krvného objemu donora umelou krvou v pokuse so skríženou cirkuláciou u psov. Priemerné hodnoty $\pm \sigma$ (n=8) z 30. až 80. min pokusu sú vyjadrené v percentách prírastku oproti predinfúznym hodnotám z 10. a 20. min. pokusu. Čierne trojuholníky vyjadrujú štatisticky významné zmeny pri $P < 0,05$ a nižšom (Studentov t-test; V=vylučovanie moča; UNaV=vylučovanie sodíka; ERPP=efektívny renálny prietok plazmy; RPK=renálny prietok krvi; GF=glomerulárna filtrácia) (Lichardus, Pearce 1966).

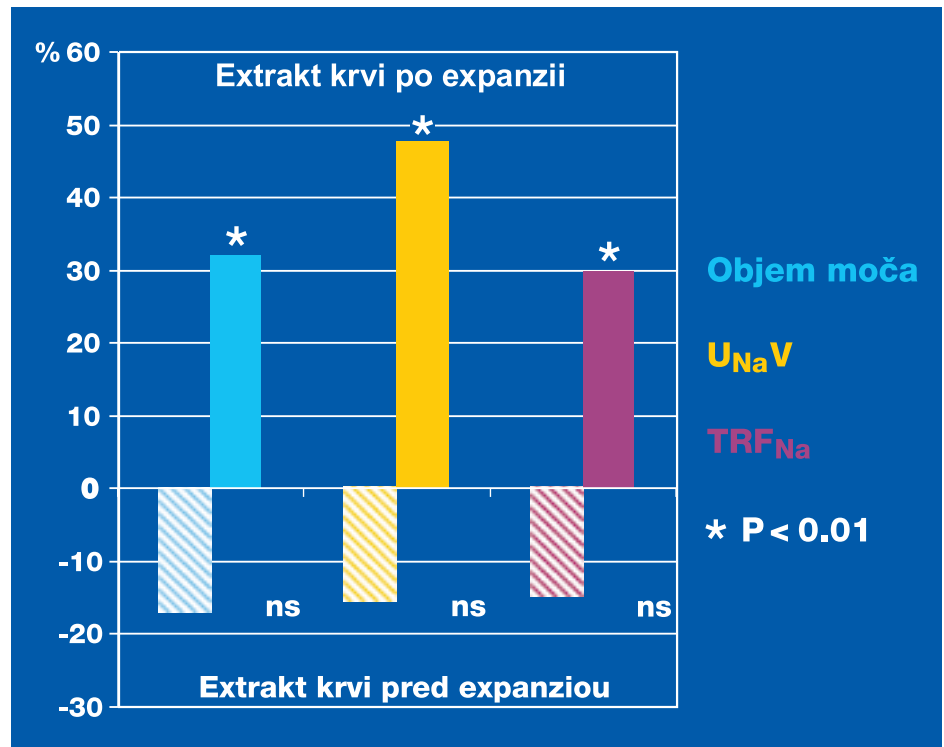
Objav átriálnych nátriuretických peptidov

Druhým a hlavným veľkým produktom výskumu nátriuretického hormónu bol v roku 1981 objav átriálnych nátriuretických peptidov. Predchádzal mu tiež biologický pokus. Adolfo DeBold ešte v roku 1957 (viď DeBold et al., 1981) počas študijného pobytu v Paríži, publikoval histologickú štúdiu, v ktorej popísal v myocytach srdcových predsiení granulá podobné takým, aké sa nachádzajú v endokrinných orgánoch, produkujúcich peptidové hormóny. Táto práca nevzbudila pozornosť fyziológov. DeBold sa k nej vrátil sám - po 24 rokoch - lebo ako kardiológ bol informovaný o naháňačke za nátriuretickým hormónom, ktorý stále odolával definitívnej identifikácii.

S profesorom Haraldom Sonnenbergom, v Toronte, predsiene laboratórnych potkanov zhomogenizovali a extrakt injikovali potkanom. A cesta k veľkému objavu bola otvorená, lebo potkany po injekcii extraktu predsieňového homogenátu začali profúzne močiť, vylúčili veľa sodíka a klesol im krvný tlak. Popísané granulá, ako sa neskôr ukázalo, predstavovali nový peptidový hormón. Publikovanie tohto objavu im údajne odmietli v Journal of Clinical Investigation, ale ju potom akceptovali v Life Sciences (DeBold et al., 1981).

Do tej doby úloha srdca v regulácii objemu telesných tekutín bola chápaná len ako sídlo volumových receptorov, ktoré detegujú objem cirkulujúcej krvi na báze rozpínania - stretchingu srdcových predsiení.

Na obr. 6 je demonštrované postupné zväčšovanie krvného objemu v nízkotlakovkej časti kardiovaskulárneho systému v hrudníku u stojaceho človeka (A), po ponorení vstojie najprv po pás (B) a potom po krk (C) do termoneutrálnej vody. Následkom postupného obmedzovania gravitácie sa krv redistribuje do najrozľáhlivejších partií cievného systému - do centrálného krvného riečišťa v hrudníku, do veľkých žíl, srdcových predsiení a do pľúc, ktoré rozpína. Simuluje to, ako sme už uviedli vyššie, zväčšenie celkového objemu krvi, lebo to isté sa stane napr. po transfúzii, teda po celkovom zväčšení objemu krvi. Signál z volumových receptorov o zväčšení srdcových predsiení vedú

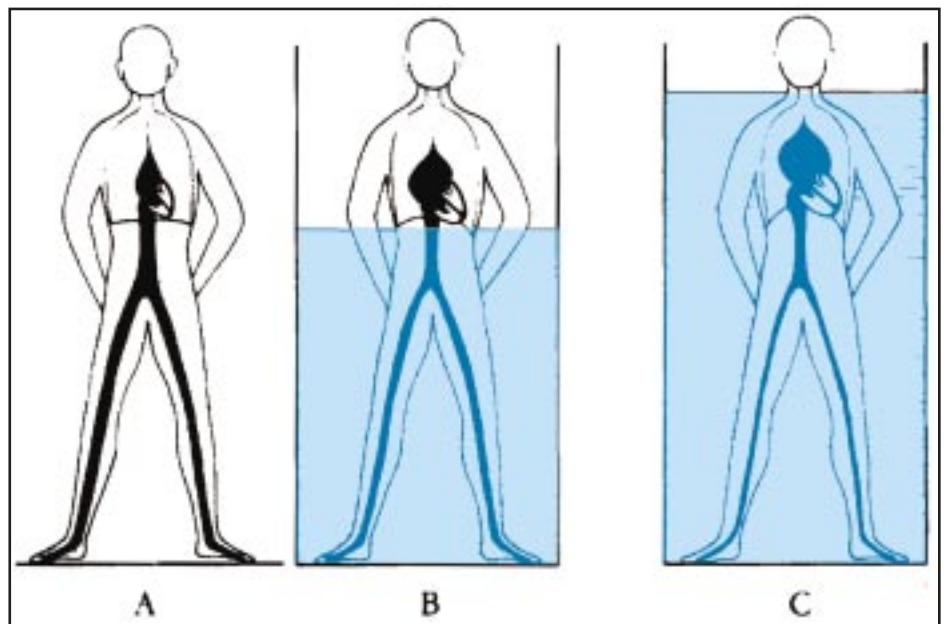


Obr. 5.: Štatistické vyhodnotenie výsledkov z testovania nízkomolekulárnej frakcie krvi kráv na hydratovaných potkanoch. Potkany, ktorým sa aplikoval extrakt krvi kráv s nátriurézou, vyvolanou expanziou ECT, zvýšili signifikantne tak vylučovanie sodíka (U_{NaV}), ako aj tubulárnu rejekčnú frakciu sodíka (TRF_{Na}) a následne aj vylučovanie moča. Na rozdiel od účinku extraktu krvi od kráv s nátriurézou, vylučovanie moča, sodíka a tubulárna rejekčná frakcia u potkanov, ktorým sa aplikoval extrakt krvi odobratej kravám pred expanziou, nesignifikantne kleslo, inými slovami, v podstate sa nezmenilo.

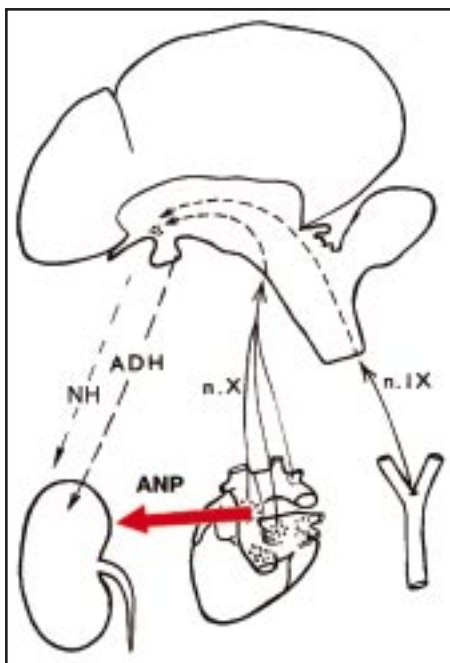
aferentné dráhy nn.vagi (n. X) do mozgu a odtiaľ vedie eferentný signál k obličkám, ktorý zvýši vylučovanie sodíka a vody, teda moča. Eferentný signál je tvorený zníženou sekréciou antidiuretického hormónu (ADH), čo je podnet na zvýšenie vylučovania vody. Predpokladalo sa, že nie dosť jasný eferentný signál (NH- nátriuretický hormón?) zvýši aj vylučovanie sodíka. Tento reflex objavili Henry a Gauer

a nesie ich mená-Henry-Gauerov reflex (obr. 7.; Henry et al., 1956).

Revolučným objavom bolo DeBoldovo a Sonnenbergovo zistenie, že átria nie sú len miestom receptorov objemu cirkulujúcej krvi, ale že sú aj zdrojom nátriuretického efektoru, lebo ako sa rýchlo dokázalo, v átriach sa tvoria átriálne nátriuretické peptidy (ANP), ktoré sú eferentným nátriuretickým signálom pre obličku, na



Obr. 6: Redistribúcia krvného objemu do krvného riečišťa v hrudníku počas imerzie probanda do termoneutrálnej vody. Popis obrázky je v texte.



Obr. 7.: Henry - Gauerov reflex. Popis schémy je v texte.

zvýšenie vylučovanie sodíka a sekundárne aj vody. Od tej doby sa srdce definitívne zaradilo medzi orgány s významnou endokrinnou funkciou. (obr. 7; DeBold et al., 1981).

Obrovské výskumné úsilie viedlo potom behom troch rokov k izolácii a syntéze atriólyných peptidov. Dokázalo, že nie sú inhibítormi sodíkovej pumpy, a hlavne, že sú regulátormi krvného tlaku.

Z hľadiska regulácie objemu ECT je záber účinkov nátriuretických peptidov fascinujúci. Je to hormón, resp. sú to hormóny, ktoré na podnet vyvolaný zvýšeným venóznym návratom v dôsledku

zvážšenia objemu ECT zvyšujú vylučovanie sodíka a vody, teda moča, potláčajú sekréciu renínu a aldosterónu, znižujú sekréciu antidiuretického hormónu a kortikotropínu, znižujú chuť na soľ a potláčajú smäd, znižujú aktivitu sympatika, spôsobujú periférnu vazodilatáciu a zvyšujú kapilárnu permeabilitu a tak filtráciu do extravazálneho priestoru s konečným výsledkom homeostatického zníženia objemu ECT.

Záver

Napriek dlhodobej kritike koncepcie existencie nátriuretického hormónu mnohými veľkými laboratóriami, ktorým sa nedarilo hormón rýchlo izolovať v šesťdesiatich a sedemdesiatich rokoch, vrátane úrovn



Obr. 8: Titulné strany zborníkov z dvoch medzinárodných sympózií o nátriuretických hormónoch v Kongresovom centre SAV v Smoleniciach a v Bratislave. Sympóziium v Smoleniciach v roku 1969 bolo vôbec prvým vo svete na túto tému (Cort, Lichardus 1970). Sympóziium v Bratislave v roku 1980 bolo prvým, kde sa hovorilo o endogenných digoxínu podobných látkach a posledným, kde sa ešte nehovorilo o atriólyných nátriuretických peptidoch (Lichardus a spol., 1980).

z Bethesdy, originálna hypotéza sa nakoniec ukázala ako schodný smer pre mimoriadne produktívny základný i klinický výskum s impaktom na pokrok diagnostiky a i terapie závažných ochorení, najmä kardiovaskulárneho a renálneho systému.

Literatúra:

- 1) Cort, J.H., Lichardus, B., eds.: *Regulation of Body Fluid Volumes by the Kidney*, Karger, Basel 1970, pp. 192
- 2) DeBold, A. J. et al.: *Life Sci.* 1981, 28, 89-94
- 3) DeWardener, H.E. et al.: *Clin. Sci.* 1961, 21, 249-258
- 4) Gruber, K.A., Buckalew jr. V. M.: In: *Hormonal Regulation of Sodium Excretion*, eds.: B.Lichardus et al., Elsevier/North Holland, Amsterdam 1980, 349-355
- 5) Henry, J. P. et al.: *Circulat. Res.* 1956, 4, 91-94
- 6) Kramer, H.J., Gonick, H.C.: *Nephron* 1974, 12, 281-296
- 7) Lichardus, B. et al.: *Lancet* i 1968, 127-129
- 8) Lichardus, B. et al., eds.: *Hormonal Regulation of Sodium Excretion*, Elsevier/North Holland, Amsterdam 1980, pp. 410
- 9) Lichardus, B., Kovács, L.: In: *Principles in Medical Biology*, eds. E.E. Bittar, N. Bittar, JAI Press Inc., London, England 1997, 501-515
- 10) Lichardus, B., Pearce, J.W.: *Nature*, 1966, 209, 407-409
- 11) Smith, H.W.: *Amer. J. Med.* 1957, 23, 623-652

Nový PCR test dovolí identifikovať vírus H5N1 během několika hodin

Z tesné spolupráce vedců z Roche Diagnostics a TIB MOLBIOL (Berlín, Německo) vznikl test k průkazu přítomnosti viru H5N1 založený na technologii PCR (polymerase chain reaction, polymerázové řetězové reakce) určený pro využití ve vědeckých a veterinárních laboratořích.

PCR test pro detekci ptačí chřipky bude fungovat na analyzátořech Light Cycler společnosti Roche Diagnostics. Tyto analyzátoře jsou v laboratořích běžně dostupné. Princip testů založených na

PCR technologii umožňuje v odebraném biologickém materiálu detekci úseku genetického kódu samotného viru. Stačí i jeden jediný úsek (sekvence), který je pomocí PCR reakce pomnožen na množství, jež lze detekovat. To znamená, že nákazu můžeme rozpoznat ve velmi krátké době po jejím vzniku, nikoliv až po vytvoření dostatečného množství protilátek v těle nakaženého organismu. Většina dnes běžně používaných laboratorních testů využívá právě detekci protilátek, které se

však v organismu tvoří několik dní až týdnů.

„Tento nový test umožní vědcům rychle identifikovat virus H5N1 u ptáků a sledovat vývoj potenciální pandemie ptačí chřipky. To by mohlo umožnit úřadům a zdravotníkům získat informace potřebné k zavedení příslušných opatření mnohem dříve a omezit tak dopady takového vývoje,“ říká Heino von Prondzynski, výkonný ředitel Roche Diagnostics a člen představenstva Roche Group.