

Stop-flow 方法으로 分析한 Guanethidine 의 利尿作用

高錫太 · 金成源 · 金聖五

朝鮮大學校 藥學大學

(Received May 9, 1975)

Suk Tai Ko, Sung Wun Kim and Sung Oh Kim (College of Pharmacy,
Cho Sun University, Kwang Ju) : Stop-flow Analysis of the Diuretic
Action of Guanethidine in the Dog

Abstract—The diuretic action of guanethidine was investigated in the dogs by means of the stop-flow technique. Guanethidine increased the rejection of sodium in the ascending limb of Henle's loop, as well as in the proximal and distal tubules, resulting in the decrease of the concentrating ability of the kidney, in marked natriuresis and diuresis. It was also effective during an osmotic diuresis, which was induced by infusing 10% mannitol solution intravenously with a speed of 10 ml/min. The drug can exhibit its effect even under the diuretic action of mercurophylline, suggesting a different mechanism from that of mercuric diuretics.

Guanethidine ([2-(octahydro-1-azocinyl)-ethyl] guanidine)은 交感神經遮斷劑로써 高血壓에 有効한 藥物^{1~3}일 뿐 아니라 利尿作用이 있음이 여러研究者에 依하여 報告되었다^{4~7}. 특히 Williams 等⁵은 개를 利用한 實驗에서 靜脈內에 guanethidine을 投與하면 尿量, osmolar clearance 및 saluresis를 이르키며 腎動脈에 直接 投與하는 境遇에는 投與한 腎臟에 限하여 尿量과 더불어 Na⁺, K⁺ 및 Ca⁺⁺等의 排泄이 增加하였다. 그러나 어느 境遇에도 hemodynamic state (GFR, RPF)의 變化에는 何等의 影響을 미치지 못하였다. 따라서 개에 있어서의 guanethidine의 利尿作用은 腎細尿管에서 直接的으로 Na⁺의 tubular rejection의 增加에 그 原因이 있는 것으로 報告하였으나 그 作用部位에 關하여서는 알려진 바 없으므로 著者等은 stop-flow technique를 利用하여 guanethidine의 腎細尿管內에서의 作用點을 明白히 하고 나아가서 水銀利尿劑와의 作用機轉上의 差異點과 腎髓質 血流增加와의 關聯性을 究明하고자 本實驗을 施行하였다.

實驗方法

實驗動物로는 雌雄雜犬을 使用하였으며 stop-flow technique는 Malvin 等⁸의 方法에 準하였

다. 即 개를 pentobarbital sodium 30 mg/kg 의 靜注로 麻醉시킨 後 呼吸을 容易하게 하기 為하여 endotracheal tube 를 捷入하고 背位로 固定하여 正中線을 따라 開腹하여 兩側 輸尿管에 polyethylene 管 (No. 190)을 腎盂 가까이 까지 捷入固定하여 尿를 各各 採集하였다.

Clearance 物質은 一定한 血中濃度에 一時에 到達하도록 prime 을 注射한 後 creatinine 과 PAH (*p*-aminohippuric acid)를 包含하는 10% mannitol 溶液을 10 ml/min 的 速度로 上股의 靜脈內에 注入하여 尿量이 每 腎當 8~10 ml/min 에 이르렀을 때 stop-flow 實驗을始作하였다.

먼저 2回, 2分間씩 集尿(free-flow urine)後에 一側 catheter 를 止血鉗子로 눌러서 尿를 遮斷하였다. 遮斷時間은 8分으로 하되 遮尿한지 7分 經過時에 새로 濾過되는 級濾體濾過液를 標識하기 為하여 10% inulin 溶液 10 ml 를 靜脈內에 注入하였다. 放遮外 同時に 排泄되는 尿를 미리 무게를 탈아둔 小試驗管內에 0.5~1.0 ml 씩 約 30個 程度 分割으로 하여 받고(stop-flow urine) 다시 2回, 2分間씩 集尿(free-flow urine)하였다.

血液은 股動脈에 미리 捷入 固定하여 动脈栓을 通하여 遮尿 前과 後의 集尿期 中間과 遮尿始作 4分後에 採血하여 遠沈, 血漿을 分離하여 尿와 함께 分析에 供하였다.

다음 guanethidine 15 mg/kg 을 靜脈內로 注入한 約 10分後에 利尿作用이 最高에 이르렀을 때 前記와 같은 方法으로 stop-flow 實驗을 反復하였다. 水銀利尿劑와의 作用機轉의 差異를 알기 為한 實驗에서는 對照實驗後 mercurophylline 을 投與하여 約 20分後에 最高利尿作用이 나타났을 때 stop-flow 實驗을 施行하고 다시 guanethidine 을 投與하여 約 10分後에 尿量이 더욱 增加하였을 때 stop-flow 實驗을 行하였다.

血漿, 各 分割尿 및 各 對照尿에 있어서의 creatinine 은 Phillips의 方法⁹⁾에 依하였고 PAH 는 Smith 等의 方法¹⁰⁾, inulin 은 Schreiner의 方法¹¹⁾에 依하여 測定하였으며 Na⁺과 K⁺은 Coleman의 flame photometer 로 測定하였다.

實驗結果

Stop-flow 實驗에서 充分한 尿量을 維持하기 為하여 10% mannitol 을 繼續 注入하였는데 이 球狀態에서도 guanethidine이 利尿効果를 나타낼 수 있는가를 實驗하였다. 다시 말하면 腎髓質血流가 增大된 狀態에서의 guanethidine의 作用에 關한 實驗이다.

Table I은 mannitol로 osmotic diuresis 를 일으킨 狀態에서의 guanethidine의 利尿作用을 clearance technique로 檢討한 結果를 綜合한 것이다.

여기에서 “before”는 guanethidine 投與前의 2~3 clearance 期를 平均한 것이고 “after”는 藥物投與後의 平均值이며 그 右側의 値는 그 差를 나타냈다. 이때에 尿量의 增加와 더불어 Na⁺과 K⁺의 排泄量이 增加되나 級濾體濾過率(GFR)나 腎血流(RPF)는 何等의 影響이 없다. 따라서 腎髓質血流가 最大로 增大된 osmotic diuresis 狀態에서도 saline diuresis 時⁵⁾와 同一한 樣相을 觀察하였다.

Creatinine은 개에 있어서 級濾體에서 濾過된 後 細尿管에서는 再吸收 또는 分泌되지 않기 때문에¹²⁾ stop-flow 實驗에 있어서 各 分割中의 creatinine의 濃度와 血漿內의 濃度의 比(U/Pcr)는 水分의 再吸收를 나타낸다. 따라서 水分의 再吸收에 따르는 他成分의 濃縮을 是正하기 為하여 Na⁺, K⁺, PAH의 各 U/P ratio를 U/Pcr로 나누어 주었다. 그 값이 1以下면 net reabsorption 을, 1以上이면 net secretion 을 意味한다.

Fig. 1은 guanethidine 15 mg/kg 을 靜注한 前과 後의 stop-flow pattern이다. 여기에서 橫

Table I—Effects of guanethidine (15 mg/kg) on the renal function of dog during osmotic diuresis

	Vol (ml/min)	GFR (ml/min)	RPF (ml/min)	$U_{Na}V$ (μ Eq/min)	U_KV
Before	13.3	39.4	127.0	743.0	60.8
After	+ 9.5	37.3	- 4.0	1178.0	+ 31.7
Before	18.5	60.3	181.0	1160.0	72.3
After	+ 2.5	60.1	- 0.2	1350.0	+ 32.7
Before	11.5	53.6	183.3	713.5	86.1
After	+ 2.0	47.9	- 5.7	1035.0	+ 22.9
Before	11.5	56.2	165.0	1038.0	65.6
After	+ 13.8	52.5	- 3.7	2735.0	+ 49.9
Before	16.0	44.3	129.5	1090.3	71.7
After	+ 12.0	48.1	+ 30.0	1850.0	+ 36.3
Before	19.0	44.4	124.5	1750.0	68.5
After	+ 3.8	43.2	- 22.5	2165.0	+ 5.3
Mean	+ 7.27	- 1.50	- 2.88	+ 546.4	+ 29.80
S.E.	± 2.20	± 1.33	± 7.65	± 73.7	± 6.07
P.	< 0.03	ns	ns	< 0.001	< 0.01

Osmotic diuresis was induced by infusing 10% mannitol solution intravenously with a speed of 10 ml/min.

Mean values from two clearance periods before and after administration of guanethidine and their differences are shown. Abbreviations: Vol; urine flow, GFR; glomerular filtration rate, RPF; renal plasma flow, $U_{Na}V$ and U_KV ; amounts of sodium and potassium excreted in urine.

軸의 數値는 遷尿을 놔주기 1分前에 靜注한 inulin 最高濃度의 1/2^o 出現하기 까지의 尿量(accumulated volume)을 100으로 하여 各 分割을 表示한 것이다, U_1, U_2 는 stop-flow 前의 對照尿(free-flow urine)이고 U_3, U_4 는 stop-flow 後의 對照尿이다. 따라서 左側은 腎細尿管의 近位部, 右側은 遠位部에 該當한다.

對照實驗을 보면 U/Pcr 은 近位部에서 約 3.0으로 約 1% 增加하고 遠位部는 約 6.0으로 顯著히 增加하였다. 따라서 大部分의 水分이 近位部에서 吸收되며 遠位部에서 少量의 濾液이 高度로 濃縮됨을 가르치고 있다. 한편 U/P_{PAH} 와 U/Pcr 와의 比($U/P_{PAH}:U/Pcr$)는 近位部에서 顯著히 增加하여(約 8.5) PAH (*p*-aminohippuric acid)는 近位細尿管에서 主로 排泄됨을 나타냈다. 다음 Na^+ 과 creatinine의 U/P ratio의 比는 大略, 0.1에서 거의 0에 가깝게 下降하였다. 이 0에 가깝게 下降하여 最下位點의 Henle's loop의 上行脚로 보아진다. K^+ 은 Na^+ 처럼 커다란 變動은 없으나 Henle's loop 部位에서 約 1% 下降點을 나타내고 있다.

이와 같이 對照實驗을 한 後 guanethidine 15 mg/kg 을 靜脈內에 投與하면 約 10分後에 尿量의 增加가 最高에 이른다. 이때 다시 stop-flow 實驗을 施行하였다. 이 實驗에서의 U/Pcr 는 對照實驗에 比하여 1/2程度로 減少現象을 보이고 있는데 이는 全細尿管에서 水分의 再吸收가 抑制됨을 뜻하는 것이다. Na^+ 는 對照值에 比하여 近位部에서 顯著하게 再吸收가 抑制되었고 遠位部에서도 약간 抑制되었을 뿐 아니라 Na^+ -minimum 即 Henle's loop에 該當되는 部으로 看做되는 部位에서도 그 值가 上昇하였다. 이는 guanethidine의 Henle's loop의 上行脚에서도 Na^+ 의 再吸收를 抑制하는 것으로 보아진다. $U/P_K:U/Pcr$ 는 近位部의 0.51에서 0.92程度로 增加하였고 遠位部에서도 0.3에서 0.59程度로서 細尿管 全域에서 甚한 再吸收抑制現象을 나타냈다.

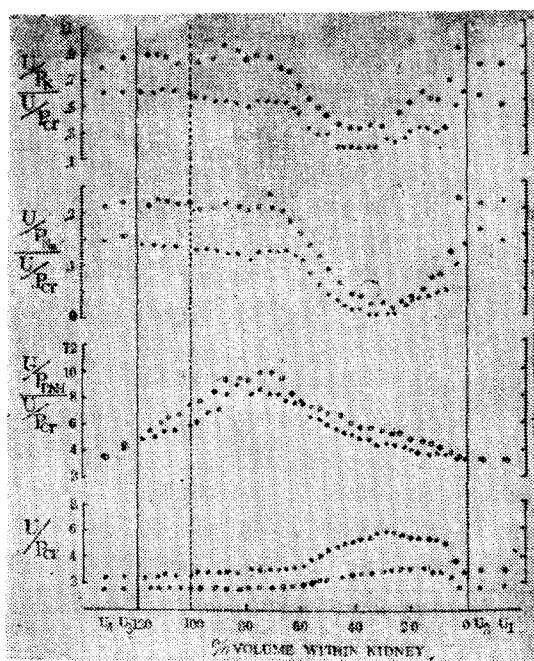


Fig. 1—Stop-flow patterns before and after administration of guanethidine (15 mg/kg, *i.v.*) in the dog. U_1 , U_2 and U_3 , U_4 are free-flow urines collected before and after the stop-flow (exp. 53, 14kg female).

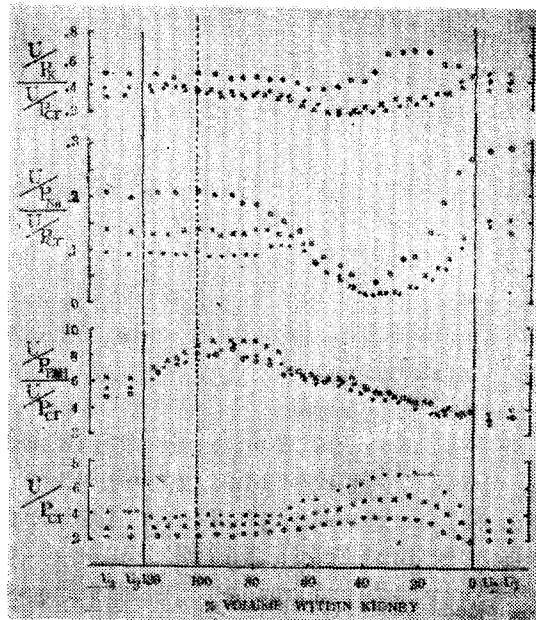


Fig. 2—Effects of mercurophylline and mercurophylline+guanethidine on the stop-flow patterns in the dog. ... Control experiment, $\times \times \times$ after mercurophylline, 3 mg/kg Hg, *i.v.*, and $\circ \circ \circ \circ$ after mercurophylline and guanethidine, 15mg/kg, *i.v.* (exp. 67, 17kg male).

$U/P_{PAH}:U/Pcr$ 는 guanethidine 投與後 커다란 變化가 없는 것으로 보아진다. 이는 Williams 等⁵⁾이 主張한대로, 개에 있어서 guanethidine 은 hemodynamic state 의 變化에 何等의 影響이 없음을 알 수 있다.

Fig. 2는 水銀利尿劑와의 作用機轉의 差異를 파악하기 爲한 stop-flow pattern이다. 對照實驗後 有機水銀利尿劑인 mercurophylline 을 Hg로 換算하여 3 mg/kg 靜注로, 投與後의 $U/P_{Na}:U/Pcr$ 的 減少는 利尿作用, 即水分의 再吸收抑制를 意味한다. 이때 近位部의 $U/P_{Na}:U/Pcr$ 는相當한 增加를 招來하여 Na^+ 의 再吸收抑制를 나타냈으나 遠位部에 있어서는 何等의 變化가 없었다. 따라서 水銀利尿劑는 Henle's loop 上行脚이나 遠位部에서의 Na^+ 再吸收에는 影響을 미치지 못함을 쉽게 알 수 있었다. $U/P_K:U/Pcr$ 나 $U/P_{PAH}:U/Pcr$ 에도 意義있는 變化가 없었다. 이어서 投與한 guanethidine에 依하여서는 U/Pcr 가 더욱 減少하여 利尿作用이 增大됨을 알 수 있으며, $U/P_{Na}:U/Pcr$ 的 特異한 增加現象을 볼 수 있었고 Henle's loop 를 包含한 遠位部에서도 그 値가 上昇함을 觀察할 수 있었다. 또한 $U/P_K:U/Pcr$ 는 全般的으로 그 値가 上昇하였으나 特異하게 遠位部에서의 頂點이 出現함을 볼 수 있는데 이는 Berliner¹³⁾와 Hierholzer 等¹⁴⁾이 말하는 K^+ -secretion site에 該當하는 것으로 看做된다. 結果的으로 guanethidine의 作用點은 水銀利尿劑와 相異하며 水銀利尿劑의 存在下에서도 그 作用을 나타낸다.

考　　察

本實驗의 結果, Na^+ 排泄의 增加와 더불어 利尿效果를 나타냈는데 이와 같은 利尿作用을 現今의 腎臟生理學의 見地에서 生覺하여 보면 i) 近位細尿管에서 Na^+ 再吸收가 抑制되고 Henle's loop의 上行脚 및 遠位部에 아무런 作用이 없는 即 counter-current multiplier system(對向流增幅系)에는 變動이 없는 境遇, ii) 近位部에는 作用이 없고 Henle's loop의 上行脚을 包含한 遠位部에서 Na^+ 輸送抑制 郡 濃縮能力의 減少로써 Na^+ 排泄量을 增加시키는 境遇, iii) Na^+ 輸送機轉에는 影響을 미치지 않고 腎髓質의 血流增加등을 들수 있다. 腎髓質의 血流量은 8~10%를 차지하고 있으나¹⁵⁾ counter-current exchanger system으로써 腎臟의 濃縮稀釋等에 重要한役割을 하고 있으며, i) 血流의 增加는 腎臟組織間에 形成된 濃度分配를 消散시키는 結果가 되므로 濃縮能力의 低下가 招來되어 尿量增加와 Na^+ 배설의 增大現象이 招來된다^{16~18)}.

Guanethidine의 作用點이 上記와 같은 諸可能性中의 어느것에 該當되는 것인지는 clearance 實驗으로서는 明白한 結論을 期待하기 困難하므로 stop-flow 實驗을 通하여 그것을 決定하고자 試圖한 것이다. Stop-flow 方法은 Malvin 等⁵⁾이 1958年에 創案한 方法으로 nephron各部分의 機能을 파악하는 데는 貢獻을 하였으나 i) 個個의 nephron의 길이의 差異에 따른 誤差¹⁹⁾, ii) 遮尿中에도 線毛體에서의 濾過持續²⁰⁾, iii) 放遮後에 近位部에 있는 濾液을 流出時에 遠位部의 作用을 받지 않을 수 있기 때문에 差異가 鈍化된다는 點¹⁹⁾, iv) mannitol로써 甚한 滲透壓利尿를 일으켜야 되며, 또 이때 腎臟機能이 多少 變動을 받지 않을 수 없다는 點²¹⁾ 등의 缺點을 列舉할 수 있다. 그러나 여러 研究者에 依하여 多方面으로 證明한바와 같이 微細穿刺成績과 잘一致된다는 點^{8,22~24)}과 무엇보다도 그 方法의 容易性 때문에 腎臟生理學에 있어서는 不可缺의 方法으로 確立되어 있다. 本實驗에서의 guanethidine은 滲透利尿狀態에서도 Na^+ 과 K^+ 의 排泄增加에 依한 利尿作用이 나타났고, stop-flow pattern에서 近位部 뿐만 아니라 Henle's loop 를 包含한 遠位部에서도 作用하였다. 또한 水銀利尿劑와는 作用點이 相異할 뿐 아니라 水銀利尿劑의 存在下에서도 何等의 影響없이 相加的으로 作用하였다.

以上의 結果로 보아 앞에서 論한 三條件의 可能性中 第 3의 可能性은 直接 體質血流를 測定하지 않았기 때문에 完全히 否定할 수는 없지만 腎臟에 미치는 guanethidine의 作用이 迅速하다는 點과 滲透利尿로써 體質血流가 最大로 增大된 狀態에서도 作用이 나타나는 點으로 미루어 排除할 수 있을 것으로 生覺되며, 第 1과 第 2의 可能성이 安當한 것으로 思料된다. 그 理由는 本 stop-flow 實驗에서 guanethidine이 近位細尿管에 對한 作用外에도 Henle's loop를 包含한 遠位部에 있어서의 作用도 뚜렷이 볼 수 있는 根據를 提示해 주고 있다. 그 結果로 counter-current multiplier system^{25,26)}에 依한 腎體質에 있어서의 Na^+ 濃度 分配가 減少하게 된다. 따라서 集合管에 있어서의 水分의 再吸收도 減少하게 될 것이다. 이와 같은 點은 水銀利尿劑의 作用과는 다르다. 水銀利尿劑는 Fig. 2에서 나타난 것과 같이 近位細尿管에만 作用하고 Henle's loop를 包含한 遠位部에서는 作用하지 않는다.

다음, 遠位部에서의 guanethidine에 依한 K^+ 의 頂點의 出現은 (Fig. 2) 水銀利尿劑와 同時に guanethidine이 強力하게 近位部에서 Na^+ 再吸收를 抑制하므로써 遠位部에 存在하는 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 交換에 對한 Na^+ 負荷가 增加되어 이 pump의 促進에 依한 結果로 보아진다²⁷⁻²⁹⁾. 따라서 guanethidine이 相當量의 K^+ 損失을 招來함은 一般 諸利尿劑에서도 흔히 볼 수 있는 것으로 強力한 natriuresis에 必須의 으로 隨伴되는 結果이며 缺點이라고 볼 수 있다.

結論

개에 있어서 guanethidine의 腎臟內의 作用點을 stop-flow technique로 究明하고자 하였다. Guanethidine은 近位, 遠位細尿管 및 Henle's loop의 上行脚에 있어서도 Na^+ 再吸收를 抑制하였으며 그 結果 腎濃縮能力의 低下 및 利尿效果를 招來하였다.

10% mannitol 10 ml/min로 滲透利尿를 일으킨 狀態에서도 利尿作用을 나타냈다. Guanethidine은 水銀利尿劑의 作用下에서도 그 效果를 나타낼 수 있어 그 作用機轉이 相異한 것으로 思料되었다.

文獻

1. I.H. Page and H.P. Dustan, *J.A.M.A.*, **170**, 1265 (1959).
2. A.L.A. Bouraand A.F. Green, *Brit. J. Pharmacol.*, **14**, 536 (1959).
3. R.A. Maxwell, A.J. Plummer, H. Povalski and F. Schneider, *J. Pharmacol. exptl. Ther.*, **129**, 24 (1960).
4. J.R. Gill and F.C. Barter, *N. Engl. J. Med.*, **275**, 1466 (1966).
5. R.L. Williams, J.E. Maines III and J.E. Pearson, *J. Pharmacol. exptl. Ther.*, **177**, 69 (1971).
6. J.E. Maines III, R.L. Williams and J.E. Pearson, *Am. J. Physiol.*, **222**, 829 (1972).
7. 高錫太, 金成源, 本誌, **17**, 31 (1973).
8. R.L. Malvin, L.P. Shlivan and W.S. Wilde, *Am. J. Physiol.*, **194**, 125 (1958).
9. R.A. Phillips, Inpeters and Van Slyke, *Quantitative Clinical Chemistry*, Vol. 2, methods, Williams & Wilkins, Baltimore, 1943.
10. H.W. Smith, N. Finkelstein, L. Aliminosa, B. Crawford and M. Graber, *J. Clin. Invest.*, **24**, 288 (1945).
11. G. Schreiner, *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, **74**, 11 (1950).

12. A.N. Richards, B.B. Westfall and P.A. Bott, *J. Biol. Chem.*, **116**, 749 (1936).
13. R.W. Berliner, *Fed. Proc.*, **11**, 695 (1952).
14. K. Hierholzer, *Am. J. Physiol.*, **201**, 318, (1961).
15. K. Kramer, K. Thurau und P. Deetjen, *Arch. ges. Physiol.*, **270**, 251, 270 (1950).
16. K. Thrau, *Am. J. Med.*, **36**, 698 (1964).
17. E.E. Selkurt, I. Womack und W.N. Daily, *Arch. ges. Physiol.*, **283**, R 72 (1965).
18. L.E. Earley and R.M. Friedler, *J. Clin. Invest.*, **44**, 929 (1965).
19. G. Barac, *Soc. Biol. (Paris)*, **151**, 1771 (1957).
20. A. Omachi and R.I. Macey, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **386**, 101 (1959).
21. R.L. Malvin and W.S. Wilde, *Am. J. Physiol.*, **197**, 177 (1959).
22. C.W. Gottschalk and M. Mylle, *Am. J. Physiol.*, **196**, 927 (1959).
23. J.H. Ullrich und K.H. Jarausch, *Arch. ges. Physiol.*, **262**, 537 (1956).
24. R.H. Kessler, K. Hierholzer, R.G. Gurd und R.F. Pitts, *Am. J. Physiol.*, **196**, 1946 (1959).
25. H. Wirz, B. Hargitai and W. Kuhn, *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, **9**, 196 (1951).
26. R.F. Pitts, *Physiology of the Kidney and Body Fluids*, Yearbook Med. Publ. Co., Chicago, 1963, p-105.
27. R.W. Berliner, *Fed. Proc.*, **11**, 695 (1952).
28. K. Hierholzer, *Am. J. Physiol.*, **201**, 318 (1961).
29. R.F. Pitts, *Prog. Cardiovas. Dis.*, **3**, 537 (1961).