

Medisinske merkesteiner

Hanssens metode for måling av filtrasjon i enkeltglomeruli

Nyrefunksjonen hos mennesker måles oftest som summen av filtrasjoni omtrenttommillionerglomeruli. Forskjell i størrelsemellomglomeruli i dype og overflatiske lag av nyrebarken fikk fysiologer til å mistenke en forskjell i både filtrasjon og regulering av denne.

I 1963 presenterte den norske legen Odd E. Hanssen (1917–64) ved Patologisk anatomisk institutt ved Rikshospitalet en metode for måling av filtrasjon i enkeltglomeruli i alle lag av nyrebarken hos forsøksdyr. Utvikling og utprøving av metoden hadde tatt nærmere ti år og gav nye og vesentlige bidrag til forståelse av nyrens funksjon.

Etter flere års forsinkelse ble metoden tatt i bruk i 17 laboratorier rundt om i verden. I omkring 50 publikasjoner ble distribusjon av filtrasjonen beskrevet i mange arter under basale forhold, ved forandringer i saltinntak og under forskjellige stimuli. Odd Hanssen fikk ikke selv oppleve denne utbredelsen av metoden. Han døde i 1964, 47 år gammel.

Engelsk sammendrag finnes i artikkelen på www.tidsskriftet.no

Basert på en artikkel publisert i *American Journal of Physiology Renal Physiology* (14)

Knut Aukland
knut.aukland@fys.uib.no
 Fysiologisk institutt
 Universitetet i Bergen
 5009 Bergen

Allerede fra midten av 1800-tallet var man klar over at filtrasjon av plasma i glomeruluskapillærene er utgangspunktet for danning av urin. Imidlertid kom det først i 1920–40-årene metoder til måling av filtrasjonen (GFR) ved hjelp av urinclearance av inulin og kreatinin. Med mikropunksjon kunne man punktere og samle filtratet fra enkelte overflatiske glomeruli og derved få et mål for enkeltnefronsfiltrasjon (single nephron GFR, snGFR) i disse. De dype, som man visste var betydelig større, var fortsatt utilgjengelige.

Problemet var ikke av bare teoretisk interesse. I 1947 viste Trueta og medarbeidere i dyreeksperimenter at en rekke omfattende traumer, f.eks. store blodtap, hemolyse og store bløtdelsskader, kan føre til nyresvikt, angivelig ved en omfordeling av nyrens blodstrøm og filtrasjon fra overflatiske til dype jukstamedullære glomeruli (1). En del år senere ble det fremsatt en hypotese om at nyrens saltutskillelse kunne være bestemt av filtrasjonen i dype, antatt saltkonserverende nefroner i forhold til overflatiske salttapere. Det var et åpenbart behov for ny metodikk.

Svaret på denne utfordringen kom overraskende nok fra en ung norsk lege ved Rikshospitalet i Oslo. Odd E. Hanssen (fig 1) hadde siden 1948 arbeidet ved Institutt for patologisk anatomi. Han hadde tatt utgangspunkt i natriumferrocyanid, $\text{Na}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, som til tross for sitt noe skremmende navn er meget lite toksisk, vannløselig, men felles som berlinerblått med ferriklorid. Disse egenskapene hadde anatomer helt fra begynnelsen av 1900-tallet utnyttet for å markere og identifisere vevsstrukturer. Det ble også funnet en oppkonsentrering av stoffet i nyretubuli, og fysiologer påviste at ferrocyanid hadde praktisk talt samme nyre-clearance som inulin. Hanssen startet med å benytte ferrocyanid til å studere nyreskaden av bacitracin hos rotter og bekreftet at filtrert ferrocyanid ble akkumulert i lumen av den proksimale tubulus (2).

Disse observasjonene gav opphav til større vyer som han beskriver i en artikkel i *Acta*

pathologica et microbiologica Scandinavica i 1958 (3): Hvis filtrert ferrocyanid ikke tapes fra tubuluslumen, må man kunne få et mål for filtrasjonen i enkeltglomeruli ut fra presipitert ferrocyanid i utdissekerte tubuli. Siden bare proksimale tubuli kan dissekeres ut intakt, må sirkulasjonen stanses og nyren fryses momentant innen 15–30 sekunder etter intravenøs injeksjon av $\text{Na}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. Etter frysesubstitusjon med ferriklorid i etanol er nyren klar for maserering i saltsyre og utdissekering av glomeruli med sine proksimale tubuli. Ferrocyanid vises som blått presipitat i tubuluslumen, og utstrekningen vil gi et relativt mål for snGFR.

Metodeutprøving og nye observasjoner

Hanssen begynte med å forsikre seg om at filtrert ferrocyanid ikke lekket ut av tubuli. Dokumentert med fargefoto av snitt fant han 5–25 sekunder etter intravenøs bolusinjeksjon av ferrocyanid og påfølgende felling med ferriklorid at berlinerblått var lokalisert til glomeruli og de proksimale tubuluslumen (3).

For å oppnå raskest mulig gjennomfrysing av nyren valgte han å benytte mus med en nyrevekt på bare ca. 0,1 g. Etter intravenøs bolusinjeksjon av ferrocyanid ble blodstrøm og filtrasjon i nyren stoppet ved samtidig overskjæring av aorta og v. cava i høyde med diafragma. Nyren ble så raskt tatt ut, frosset og preparert for utdissekering av glomeruli med tilhørende proksimale tubulus. For å undersøke om ferrocyanid fortsatte å bevege seg nedover i tubuli etter sirkulasjonsstans, gjorde han forsøk med den ene nyren fremlagt for raskest mulig ekstirpasjon og frysing, mens frysingen av motstående nyre ble utsatt i varierende tid. Som den perfekteksjonist han var, forsikret han seg først om at den fremlagte nyren hadde normal funksjon – et prosjekt i seg selv på et så lite forsøksdyr (4). Det viste seg at frysingen kunne utsettes med opptil 25 sekunder etter kutting av aorta og v. cava uten vesentlig forskyvning av filtrert ferrocyanid nedover i tubuli.

Forklaringen på dette kom i det neste arbeidet (5). Ved stopp i glomerulær filtrasjon falt nyrens vanninnhold raskt og proksimale tubuli falt sammen. Dette skyldtes tydeligvis at væskestrømmen nedover i proksimale tubuli stanset opp mens tubulusvæske fortsatte å reabsorberes på stedet. Dette var



Odd E. Hanssen (1917–64). Foto privat

en ny observasjon som gav Leyssac (6) grunnlaget for utvikling av «tubular collapse time» (tid for tømning av proksimale tubuli etter sirkulasjonsstans) som mål for proksimal reabsorpsjon av salt og vann.

Lengden av det ferrocyanidholdige tubulus-avsnittet viste seg å være proporsjonal med total proksimal tubuluslengde, et sterkt indisium på at dype nefroner med større glomeruli og lengre tubuli filtrerer mer enn de mindre nefronene i ytre cortex (7).

Ferrocyanidmetoden gav også grunnlag for å avkrefte en gammel hypotese om intermitterende filtrasjon i enkeltglomeruli (8). Ti sekunder etter intravenøs injeksjon av ferrocyanid i normalt hydrerte mus fant han at bare 14 av 10 186 undersøkte nefroner manglet berlinerblått i proksimale tubuli.

Doktoravhandling og stipend

Alle disse observasjonene ble publisert i fem utførlige artikler i *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* 1958–62 (3–5, 7, 8). Sammen med en kort introduksjon utgjorde disse hans doktorgradsarbeid som ble innlevert i februar 1961.

Avhandlingen fikk mye ros av de tre medlemmene av bedømmelseskomiteen, Bertil Josephson, Stockholm, Kristen Arnesen og Helge Laake, Oslo. De fremhevet doktorandens fantasi, kritiske sans, oppfinnsomhet, tålmodighet og store arbeidskapasitet som grunnlag for nye og viktige bidrag til nyrefysiologien. Ifølge vennen og kollegaen Åsmund Kjærheim var han nærmest monomant opptatt av sin forskning. Til forskjell fra mange av sine kolleger tok han ikke del i de mer profitable sider ved patologien, men klarte seg med en beskjeden universitetslønn.

I 1960 fikk Hanssen et stipend fra US Public Health for å arbeide ett år i Department of Pathology, State University New York, Downtown Medical Center. Oppholdet ble forlenget med ett års midlertidig engasjement. Han deltok her i en elektronmikroskopisk studie av børstesømmen i proksimale tubuli, men fortsatte på egen hånd å arbeide videre med utvikling av metodikk for en kvantitativ sammenlikning av filtrasjonen i dype og overflatiske glomeruli. Løsningen ble anvendelse av ^{14}C -merket ferrocyanid med måling av radioaktivitet i utdissekerte enkeltnefroner. Preliminære resultater ble publisert i april 1962 (9), og senere i et mer utførlig referat i august 1963 (10). Han benyttet nå rotter og fant at gjennomsnittlig snGFR i indre cortex var 56 % høyere enn i ytre cortex.

Liten interesse for ferrocyanid-metoden?

Til tross for et klart behov for en slik metode så det lenge ut til at den kunne gå i glemmeboken for godt. Årsaken var trolig lite effektiv markedsføring. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* leses sjelden av nyrefysiologer, og et møtereferat fra en stor kongress drukner lett i de tusen andre. Det viste seg imidlertid at bruken av ferrocyanid hadde «overvintret» i Canada, for deretter å slå ut i full blomst i Frankrike.

Andrew D. Baines hadde i sitt doktorgradsarbeid i 1964 ved University of Toronto benyttet seg av å måle lengden på ferrocyanidholdig tubulusinnhold ad modum Hanssen, men resultatene ble først publisert i 1969. I mellomtiden hadde Baines vært stipendiat i Paris, og hadde sammen med Christian deRouffignac tatt i bruk ^{14}C -merket ferrocyanid for kartlegging av filtrasjonen hos rotte og psammomys (ørkenmus) (11). I de følgende år kom det en lang rekke artikler om anvendelse av metoden på fysiologiske problemstillinger fra denne gruppen.

Beregning av absolutt snGFR er bare mulig med kjennskap til plasmakonsentrasjonen av ferrocyanid i løpet av clearanceperioden. To relativt kompliserte metoder for å oppnå dette ble utviklet av deRouffignac og medarbeidere (12) og av Coelho og medarbeidere (13).

Hanssen-metoden brer seg

Arbeidene til deRouffignac, Baines, Coelho og deres medarbeidere utløste en rask utbredelse av ^{14}C ferrocyanid-metoden, oftest betegnet som The Hanssen Method. Frem til 1985 var den blitt tatt i bruk av 17 forskergrupper i ni land, med publikasjon av til sammen ca. 50 artikler.

Distribusjonen av snGFR ble undersøkt på en rekke forskjellige pattedyr som rotte, mus, kanin, sau, katt og hund. Under postnatal utvikling fantes en markert økning av snGFR i ytre i forhold til i indre cortex. Derimot

fantas liten eller ingen redistribusjon ved en rekke eksperimentelle stimuli som dehydrering, vannndiurese, blodtap, ensidig nefrektomi, senkning av nyrearterietrykk og injeksjon av en rekke vasoaktive stoffer. Det store stridsspørsmål om natriurese kunne forårsakes av en relativ økning i snGFR i overflatiske nefroner, ble bekreftet av sju forskergrupper, mens sju andre grupper fant ingen slik sammenheng. Også komparative fysiologer deltok med studier på hai, fisk og fugl, dvs. på arter med meget store intrarenale forskjeller i nefronstørrelse.

Bruken av Hanssen-metoden sluttet i 1980-årene, delvis fordi de mest interessante spørsmål var blitt besvart, men kanskje mer fordi nyrefysiologene da hadde fått andre interesser. I 1980–90-årene utviklet fysiologer i Bergen og Uppsala mindre arbeidskrevende metoder for måling av glomerulær filtrasjon per gram vev i dyp og overflatisk cortex, den ene av dem også med mulighet for to påfølgende målinger i samme nyre. Fremdeles er det likevel slik at mesteparten av vår kunnskap om distribusjon av glomerulær filtrasjon er blitt oppnådd med Odd Hanssens metode.

Litteratur

1. Trueta J, Barclay AE, Daniel PM, Franklin KJ, Pritchard MM. Studies of the renal circulation. Oxford: Blackwell, 1947.
2. Hanssen OE. The effect of bacitracin on renal function in mice. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1956; 39 (suppl 111): 121.
3. Hanssen OE. A histochemical method for evaluation of excreted sodium ferrocyanide in isolated tubules of the mouse kidney. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1958; 44: 363–71.
4. Hanssen OE. Early post mortem renal changes studied in mice with one kidney exteriorized. 1. The reliability of the experimental method as evaluated by the diuretic response to mannitol and sodium ferrocyanide. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1960; 49: 280–96.
5. Hanssen OE. Early post mortem renal changes studied in mice with one kidney exteriorized. 2. The functional and early post mortem morphology of the kidney. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1960; 49: 297–320.
6. Leyssac PP. Dependence of glomerular filtration rate on proximal tubular reabsorption of salt. *Acta Physiol Scand* 1963; 58: 236–42.
7. Hanssen OE. The relationship between glomerular filtration and length of the proximal convoluted tubules in mice. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1961; 53: 65–79.
8. Hanssen OE. The frequency of temporarily inactive glomeruli in mice under physiological conditions. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1961; 53: 253–64.
9. Hanssen OE. Method for comparison of glomerular filtration in rat kidney nephrons. *Fed Proc* 1962; 21: 433.
10. Hanssen OE. Method for comparison of glomerular filtration in individual rat nephrons. I: 2. International Congress of Nephrology 1963. Praha: Excerpta Medica Internat Congress Series 1963: 527–9.
11. Baines AD, de Rouffignac C. Functional heterogeneity of nephrons. II. Filtration rates, intraluminal flow velocities and fractional water reabsorption. *Pflügers Arch* 1969; 308: 260–76.
12. de Rouffignac C. Heterogeneity of nephron population. I: Guyton AC, red. International review of physiology. London: Butterworths, 1974: 391–409.
13. Coelho JB, Chien K-CH, Bradley SE. Measurement of single-nephron glomerular filtration rate without micropuncture. *Am J Physiol* 1972; 223: 832–9.
14. Aukland K, Odd E. Hanssen and the Hanssen method for measurement of single-nephron glomerular filtration rate. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: F407–F413.