

*Serdecznie dziękuję Panu Profesorowi Januszowi Sadowskiemu za inspirację, wyrozumiałość i cenne wskazówki w przygotowaniu niniejszej rozprawy oraz wszystkim współpracownikom za wszechstronną pomoc oraz miłą i życzliwą atmosferę.*

Dr n. przyr. Elżbieta Kompanowska-Jeziarska

**Eikozanoidy w nerce: Rola w regulacji filtracji  
kłębuszkowej, transportu kanalikowego i ukrwienia**

**Rozprawa habilitacyjna z Pracowni Fizjologii Nerek  
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk**



25 244

Warszawa, 2003



## SPIS TREŚCI

1.	Prace wchodzące w skład cyklu habilitacyjnego	2.
2.	Eikozanoidy w nerce: rola w regulacji filtracji kłębuszkowej, transportu kanalikowego i ukrwienia	3.
2.1	Eikozanoidy a filtracja kłębuszkowa	9.
2.2	Eikozanoidy a transport głównych jonów w kanalikach nerkowych	12.
2.3	Eikozanoidy a ukrwienie nerki	22.
3.	Podsumowanie	26.
4.	Piśmiennictwo	31.

## **PRACE WCHODZĄCE W SKŁAD CYKLU HABILITACYJNEGO**

**I. Modulation of renal medullary ionic hypertonicity by prostaglandins: data from tissue admittance studies in the rat. Dobrowolski L., Kompanowska-Jeziarska E. i Sadowski J. *J. Physiol.* (1995), 485.3, 827-834**

**II. Mechanism of vasopressin natriuresis in the dog: role of vasopressin receptors and prostaglandins. Kompanowska-Jeziarska E., Emmeluth C., Grove L., Christensen P., Sadowski J. i Bie P. *Am. J. Physiol.* (1998), 43, R1619-R1625**

**III. Exaggerated volume expansion natriuresis in rats preloaded with hypertonic saline: a paradoxical enhancement by inhibition of prostaglandin synthesis. Kompanowska-Jeziarska E., Walkowska A. i Sadowski J. *Acta Physiol. Scand.* (1999), 167, 189-194**

**IV. Prostaglandin E<sub>2</sub> concentrations in rat renal cortical and medullary interstitium: effect of volume expansion and renal perfusion pressure. Kompanowska-Jeziarska E., Berndt T. J. i Knox F. G. *Acta Physiol Scand* (2001), 172, 287-289**

**V. Role of prostaglandin cyclooxygenase and cytochrome P450 pathways in the mechanism of natriuresis which follows hypertonic saline infusion in the rat. Kompanowska-Jeziarska E., Walkowska A. i Sadowski J. *Acta Physiol Scand* (2003), 177, 93-99**



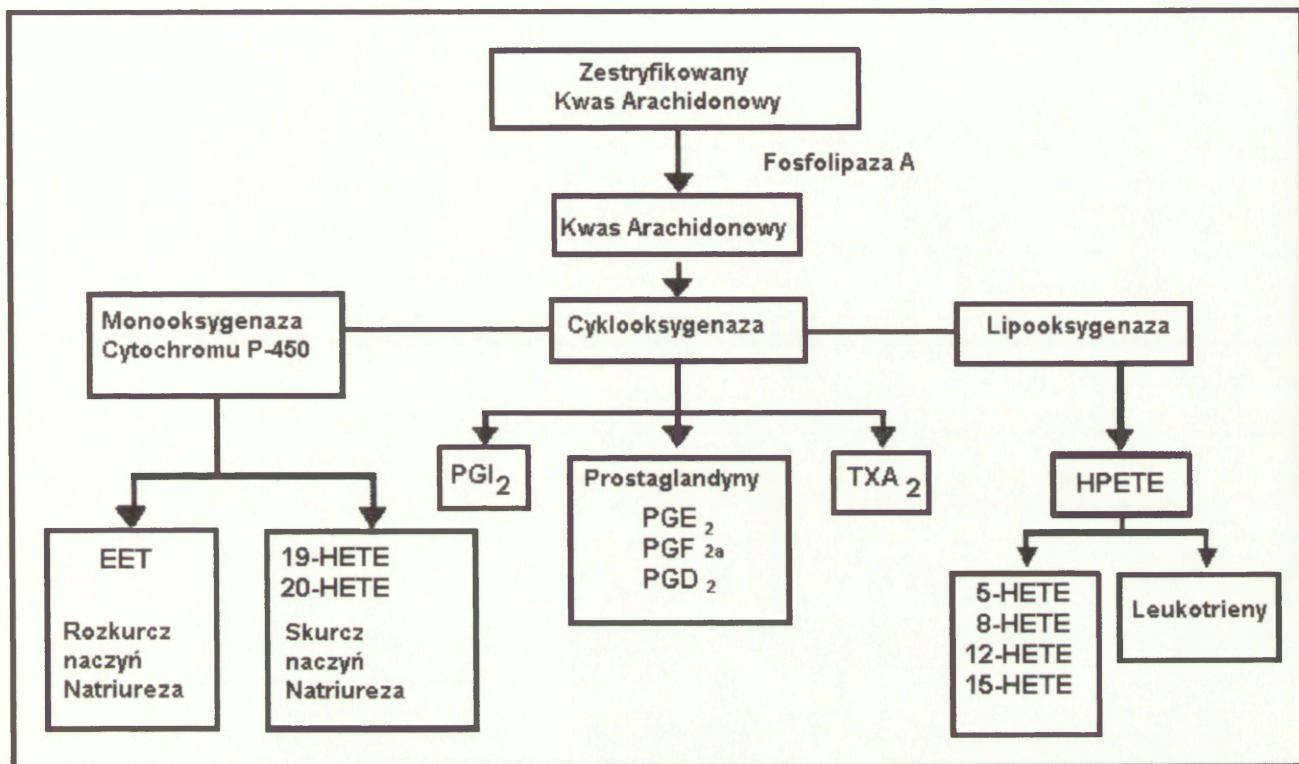
## **EIKOZANOIDY W NERCIE: ROLA W REGULACJI FILTRACJI KŁĘBUSZKOWEJ, TRANSPORTU KANALIKOWEGO I UKRWIENIA**

Kwas arachidonowy (AA) uwalniany z fosfolipidów błonowych jest przekształcany enzymatycznie w całą rodzinę metabolitów zwanych eikozanoidami. Istnieją trzy główne szlaki prowadzące do wytworzenia biologicznie aktywnych eikozanoidów: szlak cyklooksygenazy (COX), lipooksygenazy i cytochromu P-450 (CYP450) a liczne produkty przemian pełnią ważną rolę w regulacji ukrwienia nerki, filtracji kłębuszkowej i transportu kanalikowego (Ryc. 1.).

Ważnym osiągnięciem ubiegłej dekady było odkrycie, że w nerce funkcjonuje nie jeden ale dwa odrębne enzymy cyklooksygenacji: COX-1 i COX-2 przekształcające AA w metabolity zwane prostanoidami. COX-1, podlegająca ekspresji konstytutywnej, wykrywana jest w kłębuszku i nerkowym kanaliku zbiorczym natomiast COX-2, określana jako izoforma indukowana, wykrywana jest stale (w pewnych ilościach podstawowych) w komórkach płamki gęstej kanalika dystalnego, w ramieniu wstępującym pętli Henlego oraz w rdzeniowym odcinku kanalika zbiorczego, co wskazuje także na jej ekspresję konstytutywną w tych strukturach nerki (Khan i wsp., 1998). Bardzo wysoką ekspresję obu izoform wykazano w hodowlach komórek śródmięszu rdzenia. Interesujący jest fakt, że ekspresja COX-2 w komórkach śródmięszowych położonych w sąsiedztwie naczyń prostych i pętli Henlego jest kontrolowana przede wszystkim przez lokalne warunki w tkance, takie jak zmiany osmolalności i mechaniczne ściskanie (Yang i wsp., 1998)

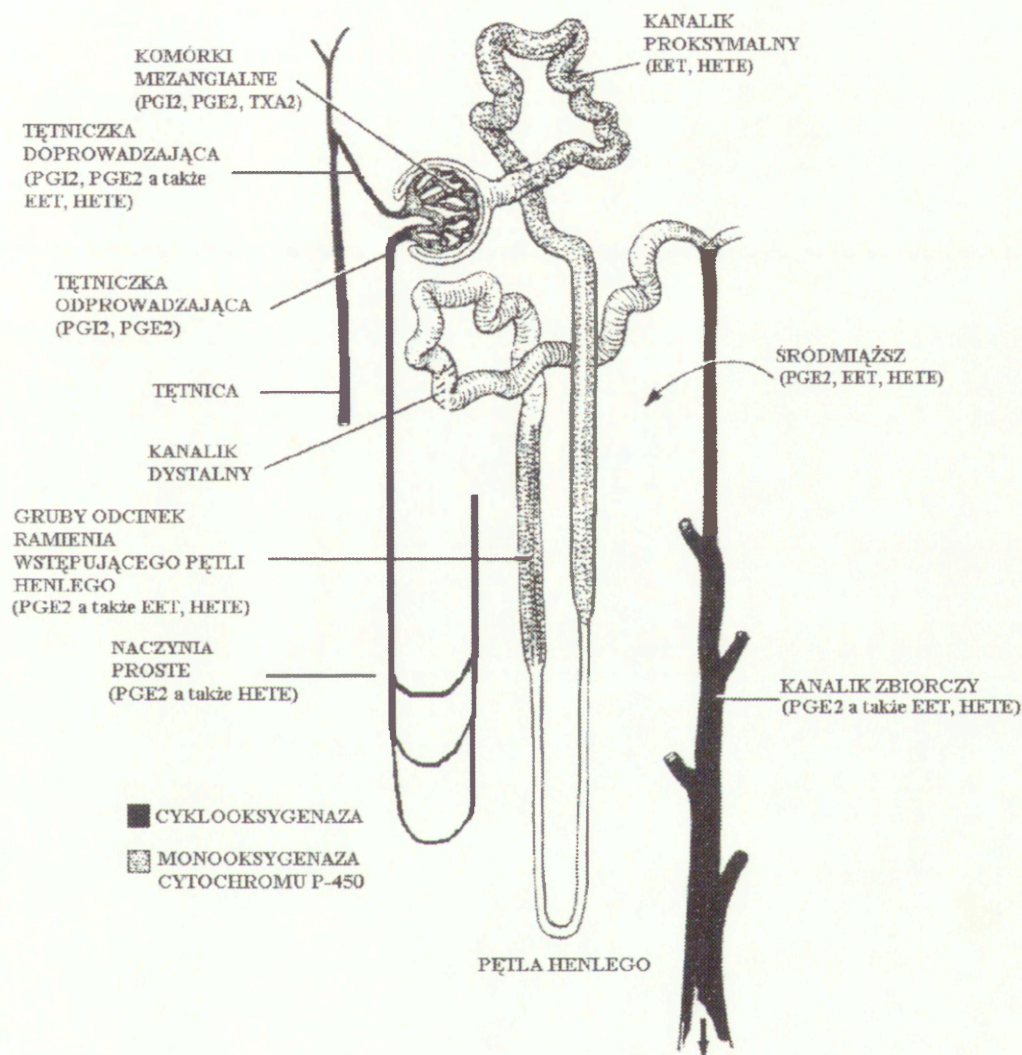
Prostaglandyna E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) jest głównym produktem cyklooksygenacji w nerce (Ryc. 2.) a jej receptory (EP) są najbardziej rozpowszechnionymi w tym narządzie receptorami dla eikozanoidów. Kanaliki zbiorcze na całej swojej długości posiadają receptory typu EP<sub>1</sub> natomiast pozostałe struktury kanalikowe w korze i rdzeniu zewnętrznym - receptory EP<sub>3</sub>, przy czym aktywność tych ostatnich jest największa w odcinku rdzeniowym ramienia wstępującego pętli Henlego. Receptory EP<sub>2</sub> występują w naczyniach tętniczych, podobnie jak receptory EP<sub>4</sub>, które ponadto wykryto w komórkach ziarnistych aparatu przykłębuszkowego. Taka lokalizacja receptorów dla PGE<sub>2</sub> wiąże się z jej specyficznymi efektami fizjologicznym w poszczególnych obszarach nerki (Imig, 2000 a). Prostaglandyna E<sub>2</sub> za pośrednictwem receptorów EP<sub>1</sub>





Rycina 1. Szlaki metabolizujące kwas arachidonowy w nerce. PG – Prostaglandyny, TX – Tromboksany, EET – kwasy hydroksyeikozatrienowe, HETE – kwasy hydroksyeikozatetraenowe, HPETE – kwasy hydroperoksyekozatrienowe.





Rycina 2. Rozmieszczenie eikozanoidów w obrębie naczyń i struktur kanalikowych – nefron przyrdzeniowy.



hamuje reabsorpcję sodu w kanalikule zbiorczym przyczyniając się do natriurezy a za pośrednictwem receptorów EP<sub>2</sub> rozszerza naczynia krwionośne, szczególnie w rdzeniu nerki. Receptory EP<sub>3</sub> rozmieszczone w ramieniu wstępującym pętli Henlego i kanalikule zbiorczym pośredniczą w działaniu PGE<sub>2</sub> antagonizującym procesy transportu wody i sodu stymulowane przez wazopresynę. Wreszcie receptory EP<sub>4</sub> znajdujące się w kłębuszku pośredniczą we wpływie prostaglandyny E<sub>2</sub> na filtrację kłębuszkową i uwalnianie reniny (Breyer i Breyer, 2000)

Drugim istotnym dla nerki metabolitem szlaku cykloksygenacji jest prostaglandyna I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>, prostacyklina) działająca poprzez receptory IP. Naczyniorozkurczający wpływ pobudzenia receptorów IP nie jest tak silny jak receptorów EP; również bezpośrednie porównania ilościowe wskazują na dwukrotnie niższą naczyniorozszerzającą aktywność PGI<sub>2</sub> w porównaniu z PGE<sub>2</sub>. Jednak to prostaglandyna I<sub>2</sub> wydaje się być dominującym czynnikiem łagodzącym naczyniokurczące efekty substancji presyjnych w obrębie naczyń kłębuszka (Ryc. 2.), ponieważ jej synteza w mięśniówce tętniczki doprowadzającej i naczyń kapilarnych jest istotnie wyższa niż produkcja PGE<sub>2</sub> (Imig, 2000 a). W nerce naczyniokurczące działanie takich substancji jak angiotensyna II, katecholaminy i wazopresyna buforowane jest przez prostaglandyny dużo efektywniej niż w innych obszarach naczyniowych, dzięki czemu przepływ krwi, filtracja kłębuszkowa i wydalanie sodu utrzymywane są na prawidłowym poziomie. Ponadto prostaglandyny, poprzez stymulację uwalniania reniny, mogą mieć udział w utrzymywaniu prawidłowego ciśnienia krwi w warunkach niedoboru sodu (Breyer i Breyer, 2000).

Tromboksan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), jeden z dwóch naczyniokurczących metabolitów COX powstaje głównie w komórkach mezangialnych i podocytach kłębuszków (Ryc. 2.), przy czym w normalnych warunkach jest produkowany w niewielkich ilościach. Wpływa on na hemodynamikę nerek poprzez receptory TP a jego znaczenie istotnie rośnie w stanach patologicznych.

Głównym metabolitem szlaku lipooksygenazy są leukotrieny (LTs) produkowane przez komórki śródbłonna i komórki mezangialne kłębuszków. Metabolity szlaku lipooksygenazy są czynnikami wpływającymi na hemodynamikę nerek i filtrację kłębuszkową jedynie w stanach chorobowych (np. w stanach zapalnych).



W nerkach funkcjonują dwa szlaki monoooksygenacji kwasu arachidonowego zależne od cytochromu P450: szlak  $\omega$ -hydroksylacji produkujący związki typu HETE (kwasy hydroksyeikozatetraenowe) i szlak epoksygenacji produkujący związki typu EET (kwasy epoksyekozatrienowe, epoksydy). Powstawanie tych metabolitów w nerce jest regulowane przez czynniki hormonalne i parakrynne oraz jest wyraźnie zależne od zawartości sodu w diecie (Imig, 2000 a). Wazopresyna (AVP) wzmacnia produkcję pochodnych CYP450 i to właśnie one pośredniczą w hemodynamicznej odpowiedzi kłębuszków na hormon. Prawdopodobnie pośredniczą one również w zwiększeniu powierzchni błony filtracyjnej zależnemu od działania AVP (odpowiedź proliferacyjna kłębuszków) (Imig, 2000a).

Tętniczki wewnątrznerkowe, kłębuszki oraz pericyty (kurczliwe komórki naczyń prostych) są miejscem powstawania 20-HETE (Ryc. 2.), metabolitu działającego naczyniokurcząco i pełniącego szczególną rolę w autoregulacji nerkowego przepływu krwi. W pewnych warunkach doświadczalnych u niektórych gatunków zwierząt, 20-HETE może rozszerzać naczynia ale efekt ten jest zależny od obecności cyklooksygenazy (Edwards i wsp., 2000). Ponadto 20-HETE ma bardzo istotne działanie natriuretyczne poprzez hamowanie transportu w kanaliku proksymalnym i rdzeniowym odcinku ramienia wstępującego pętli Henlego. Jest on inhibitorem ATP-azy sodowo-potasowej ( $\text{Na}^+$ -  $\text{K}^+$ - ATPaza) w błonie podstawnobocznej komórek kanalika proksymalnego oraz kotransportu  $\text{Na}^+$ -  $\text{K}^+$ -  $\text{Cl}^-$  w ramieniu wstępującym pętli (Maier i Roman, 2001).

W dotychczasowych badaniach nie stwierdzono aby pochodne  $\omega$ -hydroksylacji zależnej od cytochromu P450 posiadały specyficzne receptory w komórkach docelowych. Najprawdopodobniej 20-HETE działa w obrębie tej samej komórki w której powstaje, bądź w komórkach bezpośrednio z nią sąsiadujących (Pallone i wsp., 1998).

EET, podobnie jak produkty  $\omega$ -hydroksylacji nie posiadają receptorów natomiast działają lokalnie w pobliżu miejsca powstawania wpływając między innymi na przepływ krwi i filtrację kłębuszkową (Ryc. 2.). Wyróżniamy cztery podstawowe metabolity tego szlaku: 5,6-EET; 8,9-EET oraz 11,12-EET i 14,15-EET. Dwa ostatnie działają naczyniorozszerzająco na tętniczki doprowadzające kłębuszków i ich działanie nie zależy od COX, natomiast 5,6-EET i 8,9-EET są zależne od COX. Mogą być one wtórnie przekształcane przez cyklooksygenazę w pochodne podobne do prostaglandyn



lub tromboksanów i w zależności od tego rozszerzać lub kurczyć naczynia nerkowe (Imig, 2000 b).

Niezależnie od wpływu na krążenie nerkowe bardzo istotne jest działanie produktów epoksygenacji na transport kanalikowy. Wszystkie cztery pochodne hamują antydiuretyczne działanie wazopresyny w korowym odcinku kanalika zbiorczego. 5,6-EET działa natriuretycznie hamując  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPazę w błonie podstawnobocznej kanalika proksymalnego i rdzeniowego odcinka ramienia wstępującego pętli Henlego (McGiff i wsp., 1993), natomiast 14,15-EET zwiększa wydalanie sodu dodatkowo poprzez hamowanie uwalniania reniny a więc aktywności układu renina - angiotensyna - aldosteron (Imig, 2000 a). Najnowsze badania sugerują również, że metabolity epoksygenacji mogą działać jako wtórne przekaźniki wewnątrzkomórkowe, regulując transkrypcję i produkcję innych enzymów (Imig, 2000 b).

Na szczególną uwagę zasługuje rola eikozanoidów w regulacji krążenia wewnątrznerkowego i nerkowej regulacji bilansu ustrojowego sodu.

Coraz więcej doniesień wskazuje na kluczową rolę ukrwienia rdzenia nerki w kontrolowaniu wydalania sodu i zagęszczania moczu. Wiele hormonów, substancji parakrynych i autokrynych, oraz neuroprzekaźników zaangażowanych jest w regulację oporu naczyniowego a w konsekwencji regulację dystrybucji przepływu krwi przez różne obszary nerki. Rola prostaglandyn a w szczególności  $\text{PGE}_2$  w modulowaniu krążenia wewnątrznerkowego jest dosyć dobrze poznana. Stymulacja ich syntezy wiąże się z redystrybucją przepływu krwi do głęboko położonej tzw. kory przyrdzeniowej z jednoczesnym obniżeniem perfuzji kory powierzchniowej. Większość badań potwierdza też obniżenie przepływu krwi przez rdzeń czy brodawkę nerkową po zastosowaniu inhibitorów COX, takich jak indometacyna czy meklofenamian sodu (Edwards i wsp., 2000).

Najnowsze dane wskazują, że  $\text{PGE}_2$  utrzymuje nerkowy przepływ krwi w sytuacji niedoboru sodu działając na receptory  $\text{EP}_4$ , których liczba w kłębuszkach, komórkach mezangialnych i ziarnistych aparatu przykłębuszkowego, rośnie u zwierząt na diecie niskosodowej. Ponadto, przy obniżonym spożyciu sodu, syntetyzowana w korze  $\text{PGE}_2$  stymuluje sekrecję reniny. Produkty cytochromu P-450 odgrywają natomiast istotną rolę w procesach autoregulacji nerkowego przepływu krwi, np. w warunkach podwyższenia ciśnienia tętniczego (Imig, 2000 a).



Adaptacja czynności nerki do nadmiaru lub niedoboru sodu w organizmie prowadząca do jego usuwania lub oszczędzania ma bezpośredni związek z udziałem tego narządu w regulacji ciśnienia tętniczego krwi. Wiele doniesień wskazuje na istotne znaczenie metabolitów kwasu arachidonowego w tym procesie adaptacyjnym.

Zmiany spożycia sodu nie wpływają na ekspresję izoformy COX-1 ani w korze ani w rdzeniu nerki. Dieta wysokosodowa hamuje natomiast ekspresję COX-2 w korze a stymuluje jej aktywność w rdzeniu nerki, a niska podaż sodu stymuluje korową ekspresję tej izoformy obniżając nieco jej aktywność w rdzeniu. Taki odmienny wpływ diety sodowej na aktywność izoformy COX-2 w korze i rdzeniu sugeruje, iż prostaglandyny produkowane w tych obszarach pełnią nieco inne funkcje. Wydaje się, że prostaglandyny powstające w rdzeniu wspomagają usuwanie sodu i wody w stanie przewodnienia organizmu, natomiast te powstające w korze nerki chronią filtrację kłębuszkową w warunkach spadku objętości płynów (Yang i wsp., 1998).

Dieta wysokosodowa zwiększa również produkcję EET w korze i rdzeniu nerki oraz wzmacnia wydalanie tych metabolitów z moczem, podczas gdy produkcja 20-HETE w korze nerki zostaje obniżona. Poza bezpośrednim hamującym wpływem produktów epoksygenacji na reabsorpcję sodu, ich udział w zwiększonej odpowiedzi wydalniczej zależy również od hamującego efektu 14,15-EET na uwalnianie reniny. Rozwój nadciśnienia u szczurów karmionych dietą bogatą w sód i otrzymujących inhibitory epoksygenacji potwierdza antyhipertensyjne działanie tych metabolitów. Stwierdzono ponadto, że dieta wysokosodowa hamuje powstawanie EET i 20-HETE w kłębuszkach, podczas gdy dieta niskosodowa stymuluje wewnątrz-kłębuszkowe powstawanie 20-HETE. Dane te wskazują, że produkty szlaku cytochromu P-450 odgrywają istotną rolę w utrzymywaniu homeostazy objętości i składu płynów ustrojowych przy zmiennej podaży sodu, a dokonuje się to w znacznym zakresie poprzez kontrolowanie hemodynamiki kłębuszków i całego krążenia wewnątrznerkowego (Imig, 2000 a).

Duże trudności w interpretacji wyników podawania poszczególnych metabolitów kwasu arachidonowego lub blokowania ich syntezy wynikają z możliwości wykorzystywania dostępnego substratu (tu AA) przez różne szlaki enzymatyczne. Wydaje się, że kwas arachidonowy, uwolniony z błon cytoplazmatycznych musi być przekształcony w jednym ze wspomnianych wyżej trzech szlaków. Już od dość dawna sugerowano jednak, że np. zablokowanie cyklooksygenazy może prowadzić do przesunięcia substratu na jeden lub oba pozostałe szlaki metabolizujące AA. W



następstwie tego procesu obserwujemy zjawiska wynikające nie tylko z prostego wyeliminowania produktów COX, lecz zależne dodatkowo od działania nowo powstających produktów cytochromu P450 czy lipooksygenazy (Murray i Brater, 1993). Trudności te nie ominęły również i moich badań, w których widoczne są problemy z interpretacją otrzymanych wyników, zwłaszcza wobec braku oznaczeń stężeń badanych substancji w tkance nerkowej lub w moczu.

Poniżej przedstawiono wprowadzenie w problematykę opublikowanych pięciu prac (I.–V.) dotyczących znaczenia eikozanoidów w regulacji hemodynamiki i transportu kanalikowego w nerce. Uznając, że komentowanie treści artykułów w kolejności chronologicznej ich opublikowania byłoby mało uzasadnione, zastosowano klucz merytoryczny przedstawiając kolejno co wniosły wymienione prace do wiedzy dotyczącej znaczenia eikozanoidów jako czynników determinujących lub częścię modulatorów filtracji kłębuszkowej, transportu kanalikowego i krążenia wewnątrznerkowego.



## EIKOZANOIDY A FILTRACJA KŁĘBUSZKOWA

Zablokowanie syntezy prostanoidów za pomocą indometacyny lub meklofenamianu sodu u uśpionych szczurów (I.) nie powodowało istotnych zmian w filtracji kłębuszkowej (GFR). Również infuzja PGE<sub>2</sub> do tętnicy nerkowej ani jej zaprzestanie, nie wpłynęło na poziom GFR.. Nasze doświadczenia nie potwierdziły więc przypuszczenia, że obserwowane niekiedy obniżenie wydalania wody i sodu po inhibitorach cyklooksygenazy zależy przynajmniej po części od obniżenia filtracji kłębuszkowej. Wyniki nasze, podobnie jak szereg danych z literatury, wskazują raczej, że w normalnych warunkach zablokowanie szlaku cyklooksygenacji może zupełnie nie wpłynąć na filtrację kłębuszkową lub zmienić ją tylko w niewielkim stopniu (Breyer i Badr, 1996).

Zgromadzono już liczne dane wskazujące, że prostacyklina (PGI<sub>2</sub>) i prostaglandyna E<sub>2</sub> uwalniane są w odpowiedzi na zwiększoną aktywność substancji naczyniokurczących i działają rozkurczająco na naczynia kłębuszków nerkowych. Antagonizują one wpływ takich czynników jak: Ang II i AVP czy też noradrenalina uwalniana na zakończeniach nerwów współczulnych (Breyer i Badr, 1996). Wydaje się jednak, że w naszych doświadczeniach (II.) podanie wazopresyny, co prawda w dawkach subpresyjnych, nie prowadziło do istotnego antagonistycznego działania produktów COX na filtrację kłębuszkową. U psów otrzymujących AVP lub agonistę receptorów V<sub>2</sub> nie stwierdzono zmian w GFR oraz - co istotniejsze - podanie indometacyny na tle infuzji AVP nie wpłynęło na wielkość filtracji. Należy jednak zauważyć, że zastosowanie w naszych badaniach modelu doświadczalnego, w którym precyzyjnie kontrolowano objętość płynów ustrojowych ("servo-control"), zapobiegło zwiększeniu przestrzeni pozakomórkowej, towarzyszącemu zwykle długotrwałej infuzji AVP (Smith i wsp., 1979) i tym można tłumaczyć brak zmian GFR.

W badaniach na szczurach, którym podawano infuzję soli 5% doszło z pewnością do wzrostu objętości pozakomórkowej, jednak i tym razem fakt ten nie wpłynął na poziom filtracji kłębuszkowej (III.). Dalsze niewielkie zwiększenie objętości płynów ustrojowych przez podanie małej objętości soli izotonicznej, krwi lub soli zawierającej indometacynę nie wpłynęło na tempo filtracji. Nie można jednak w sposób jednoznaczny stwierdzić, że zablokowanie COX w warunkach zwiększonej



objętości płynu pozakomórkowego (ang. extracellular volume expansion – dalej krótko ekspansja pozakomórkowa) nie zmienia filtracji kłębuszkowej, ponieważ podanie innego inhibitora – meklofenamianu sodu, istotnie ją podwyższyło.

Również kolejna praca nie dostarczyła dowodów, że filtracja kłębuszkowa znajduje się pod szczególną kontrolą prostaglandyny E<sub>2</sub> (IV.). Postępująca ekspansja pozakomórkowa oraz zmiany ciśnienia perfuzyjnego i związane z nimi fluktuacje stężenia PGE<sub>2</sub> w tkance kory i rdzenia nerki (mierzone w mikrodializatach) nie wpłynęły na poziom GFR u badanych szczurów.

W badaniach mających na celu wyjaśnienie ewentualnej regulacyjnej roli produktów różnych szlaków metabolizujących kwas arachidonowy w warunkach natriurezy po soli hipertonicznej (V.) wykorzystano dwa różne protokoły doświadczalne. W pierwszym typie doświadczeń (doświadczenia “ostre”) podczas infuzji soli hipertonicznej szczurom podawano dożylnie indometacynę (inhibitor COX) lub klotrimazol (inhibitor epoksygenazy zależnej od CYP450) lub hamowano obydwa szlaki podając inhibitory po sobie w odstępie 40 minut. W drugim typie doświadczeń (doświadczenia “chroniczne”) szlak epoksygenazy hamowano podając klotrimazol dootrzewnowo przez trzy kolejne dni przed rozpoczęciem badań z ekspansją hipertoniczną i następczym hamowaniem COX. W doświadczeniach “ostrych” wykazano, że zahamowanie szlaku cyklooksigenazy u szczurów z ekspansją hipertoniczną również nie wpłynęło na GFR, chyba, że indometacynę podano wkrótce po zablokowaniu szlaku epoksygenazy - taki manewr spowodował bowiem 20% spadek filtracji kłębuszkowej (V.). Jeśli jednak szlak epoksygenazy został zablokowany wcześniej (przed infuzją soli hipertonicznej) przez chroniczne podawanie klotrimazolu, podanie indometacyny nie wpłynęło na filtrację. Jest natomiast uderzające, że u szczurów chronicznie traktowanych klotrimazolem poziom GFR był już wyjściowo wyraźnie obniżony, co może sugerować istotną rolę metabolitów epoksygenacji (EET) w utrzymywaniu prawidłowej hemodynamiki kłębuszków. Wyniki doświadczeń “ostrych” również wskazują na szczególną rolę EET w utrzymaniu prawidłowego poziomu filtracji, zwłaszcza pod nieobecność aktywnego szlaku cyklooksigenacji, czy też jego naczyniorozszerzających produktów.

W doświadczeniach “ostrych” zwraca również uwagę prawie 25% wzrost GFR obserwowany po dożylnym podaniu klotrimazolu. Zgodnie z danymi z literatury



głównym produktem epoksygenacji powstającym w kłębuszkach jest 8,9-EET, wykazujący w obecności COX działanie naczyniokurczące (Breyer i Badr, 1996; Maier i Roman, 2001). Pod wpływem infuzji soli hipertonicznej, stymulującej jak wiadomo szlak epoksygenazy (Makita i wsp., 1992), prawdopodobnie wzrosła również synteza 8,9-EET, co z kolei mogło uruchomić produkcję działających antagonistycznie prostaglandyn (zapobieganie drastycznemu obniżeniu GFR). Po podaniu clotrimazolu filtracja mogła wzrosnąć przynajmniej z dwóch powodów: po pierwsze wyeliminowane zostało naczyniokurczące działanie 8,9-EET a po drugie, w dalszym ciągu działały naczyniorozszerzające prostaglandyny. Kolejny krok, czyli zablokowanie COX musiało w sposób oczywisty wiązać się z obserwowanym obniżeniem filtracji (patrz wyżej).

Ten dość skomplikowany obraz zmian obserwowanych po zastosowaniu w różnych konfiguracjach inhibitorów szlaków metabolizujących AA wynika z ich rywalizacji o ten sam substrat (AA) oraz zjawiska wtórnego przekształcania produktów epoksygenacji przez szlak cyklooksygenacji.

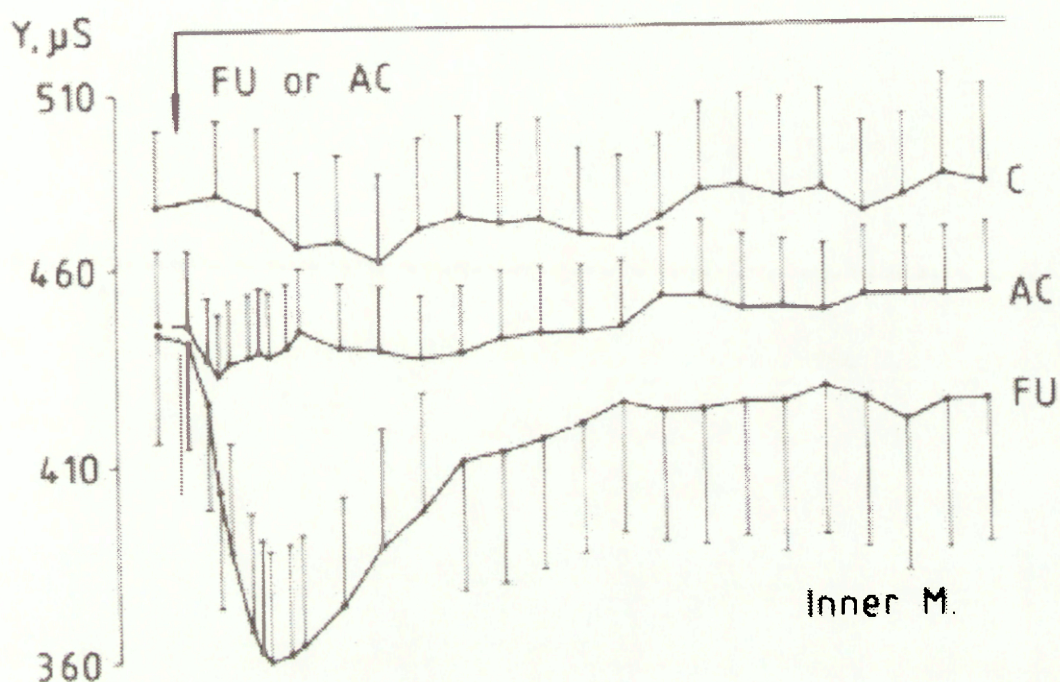


## EIKOZANOIDY A TRANSPORT GŁÓWNYCH JONÓW W KANALIKACH NERKOWYCH

Zablokowanie szlaku cyklooksygenazy u narkotyzowanych, euwolemicznych szczurów przy użyciu dwóch chemicznie odmiennych inhibitorów: indometacyny lub meklofenamianu sodu spowodowało istotne zmiany w tzw. gradiencie elektrolitowym nerki związanym z narastającym od kory do rdzenia stężeniem substancji elektrolitowych (głównie NaCl) (I.). Posługując się opublikowaną przez Sadowskiego i Portalską metodą (1983) umożliwiającą ciągły pomiar i ocenę dynamiki zmian właściwości przewodzących tkanki nerkowej a ściślej tzw. admitancji elektrycznej (odwrotność impedancji, miara stężenia elektrolitów w płynie śródmiąższowym) stwierdzono iż zablokowanie cyklooksygenazy powoduje istotny wzrost stężenia elektrolitów (głównie NaCl) zarówno w rdzeniu zewnętrznym jak i wewnętrznym nerki. Ponieważ wcześniej udowodniono, że zmiany admitancji są odbiciem zmian tempa transportu NaCl poprzez ścianę kanalików nerkowych (Bączyńska i wsp., 1990; Kompanowska-Jeziarska i wsp., 1990), można z dużym prawdopodobieństwem powiedzieć, iż obserwowany wzrost admitancji rdzenia po zablokowaniu szlaku cyklooksygenazy wskazuje na zwiększenie transportu NaCl ze światła kanalików (przede wszystkim ramienia wstępującego pętli Henlego) do płynu śródmiąższowego (I.). (Ponieważ wspomniana metoda nie jest powszechnie znana zamieszczono Ryc. 3. przedstawiającą wyniki wcześniejszych badań nad jej ewaluacją. Zahamowanie transportu w pętli Henlego przez podanie furosemidu powoduje obniżenie admitancji w otaczającym pętlę śródmiąższu, natomiast podanie acetazolamidu działającego w innym odcinku nefronu pozostaje bez wpływu na mierzony parametr).

Wyniki te stanowiły potwierdzenie *in vivo* danych z literatury wskazujących, że prostaglandyna E<sub>2</sub>, jeden z głównych produktów COX w nerce szczura, hamuje zależny od hormonu antydiuretycznego (ADH, wazopresyna, AVP) transport chlorku sodu w ramieniu wstępującym pętli Henlego (Bankir, 2001). Dostarczono dowodów, że wazopresyna za pośrednictwem cAMP zwiększa dyfuzję jonów Cl<sup>-</sup> przez błonę podstawnoboczną komórek pętli stwarzając lepsze warunki dla transportu sodu przez błonę luminalną, zwiększając jego reabsorpcję i gromadzenie w śródmiąższu. Mechanizm ten istnieje z całą pewnością u gryzoni i hamowany jest przez PGE<sub>2</sub> (Ryc.





Rycina 3. Zmiany w admitancji ( $Y$ , mikrosiemens) rdzenia wewnętrznego (odzwierciedlające lokalne stężenie elektrolitów w śródmiaższu) po dożylnym podaniu diuretyków. C – kontrola, AC – acetazolamid hamujący transport w kanalikule proksymalnym, FU – furosemid hamujący transport w ramieniu wstępującym pętli Henlego. (wg. Bądryńska i wsp. Tissue electrical admittance (electrolyte concentration) in rat renal medulla: effect of furosemide and acetazolamide. *Arch. Internat. Physiol. Bioch.* (1990), 98, 131-140)

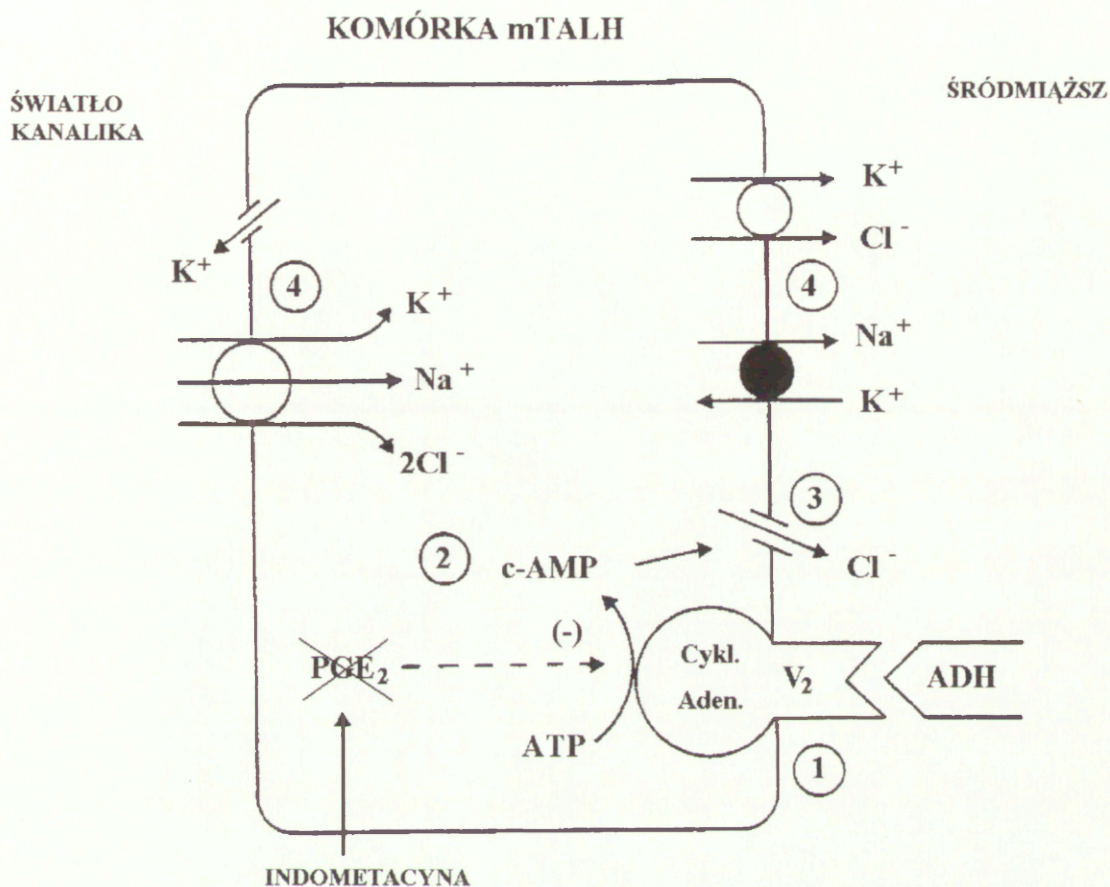


4.), której generacja jest zresztą stymulowana przez samą wazopresynę: Dunn i współpracownicy (1983) donosili, że wazopresyna za pośrednictwem receptorów  $V_1$  stymuluje uwalnianie  $PGE_2$  przez komórki śródmiąższowe, ta zaś antagonizuje zależną od wazopresyny reabsorpcję NaCl w grubym odcinku ramienia wstępującego pętli. Potwierdzeniem tej tezy w doświadczeniach z nerką *in situ* jest obserwowane przez nas 14% i 8% obniżenie admitancji odpowiednio w rdzeniu wewnętrznym i zewnętrznym u szczurów otrzymujących infuzję  $PGE_2$  do tętnicy nerkowej. Po zaprzestaniu infuzji zanotowano następnie w ciągu 15–20 min powrót admitancji a więc powrót reabsorpcji sodu w pętli Henlego do wartości kontrolnych (I.).

Dla potwierdzenia wpływu zablokowania COX na gradient elektrolitowy i szerzej, osmotyczny nerki (dotyczy wszystkich substancji osmotycznych, szczególnie zaś mocznika), zmierzono *ex vivo* tzw. standardową konduktancję skrawków rdzenia nerki (Dobrowolski i wsp., 1992). Wartość konduktancji jest miarą całkowitego stężenia elektrolitów w płynie śródmiąższowym badanego fragmentu tkanki (odpowiednik admitancji mierzonej *in vivo* i *in situ*). Ponadto zmierzono zawartość  $Na^+$ ,  $K^+$ , całkowitą osmolalność jak i zawartość wszystkich elektrolitów w płynie zrównoważonym z tkanką rdzeniową uzyskując informację co do zawartości poszczególnych składników w pełnej tkance tzn. łącznie w przestrzeni wewnątrzkomórkowej i pozakomórkowej. Zahamowanie COX istotnie zwiększyło mierzoną w skrawkach rdzenia zawartość  $Na^+$ ,  $K^+$  jak i wszystkich elektrolitów łącznie, zarówno w płynie śródmiąższowym jak i w całej tkance. Jednocześnie stężenie substancji nieelektrolitowych (głównie mocznika) w różnych przestrzeniach rdzenia nerki pozostało takie samo jak w grupie kontrolnej. Wyniki te potwierdziły nasze dane uzyskane *in vivo* i wskazują, że zablokowanie COX prowadziło do eliminacji antagonizującego wpływu  $PGE_2$  na stymulowaną przez wazopresynę (AVP) reabsorpcję NaCl w pętli Henlego; prowadziło to do znaczącego zwiększenia hipertonii elektrolitowej rdzenia stwarzając tym samym lepsze warunki dla zagęszczania moczu. Istotnie, osmolalność moczu ( $U_{osm}$ ) wzrosła znacznie po podaniu każdego z dwóch inhibitorów cyklooksygenazy a nieco obniżyła się w grupie szczurów, którym infundowano  $PGE_2$  do tętnicy.

Zdecydowanie trudniejszy do przewidzenia był wpływ zablokowania szlaku COX na tempo wydalania sodu ( $U_{NaV}$ ), gdyż wielkość wydalania zależy od przefiltrowanego ładunku sodu oraz jego transportu w kolejnych odcinkach kanalika. Odblokowanie zależnej od AVP reabsorpcji sodu w pętli Henlego po zablokowaniu





Ryc. 4. Schemat procesów transportu jonów w komórce rdzeniowego grubego odcinka wstępującego pętli Henlego (mTALH). Hormon antydiuretyczny (ADH) za pośrednictwem receptorów  $V_2$ , cyklazy adenylanowej i cAMP aktywuje kanał chlorkowy błony podstawnobocznej (3), co z kolei przyspiesza procesy transportu jonów poprzez obie ściany komórki mTALH (4) i zwiększa reabsorpcję, głównie NaCl, ze światła pętli Henlego do śródmiąszcu. Proces ten hamowany jest przez  $PGE_2$  – zniesienie tego hamowania za pomocą indometacyny powoduje “odhamowanie” stymulującego działania ADH, transport NaCl wzrasta i stężenie elektrolitów w śródmiąszcu otaczającym pętle podwyższa się.



COX oraz wzrost zawartości sodu w samej tkance nerkowej nie prowadziły do zmian wydalania sodu w moczu badanych szczurów. Należy jednak podkreślić, że rdzeniowy odcinek wstępującego ramienia pętli Henlego, którego dotyczy rozważany antagonizm ADH i PGE<sub>2</sub>, ma wpływ głównie na tzw. wewnątrznerkowy bilans sodu, natomiast nie decyduje o tzw. zewnętrznym bilansie sodu, który zależy przede wszystkim od transportu NaCl w korowym odcinku pętli Henlego. (Reeves i wsp., 1996). Dlatego sprzeczność między rosnącą reabsorpcją NaCl w rdzeniowych odcinkach pętli i brakiem zmian wydalania Na<sup>+</sup> jest tylko pozorna.

W badaniach wykonanych na czuwających psach (II.) stworzono lepsze możliwości określenia mechanizmu wpływu zablokowania prostaglandyn na wydalanie sodu, gdyż równoległe z pomiarem  $U_{Na}V$  "netto" oceniano tu także wybiórczo transport proksymalny za pomocą klirensu litu oraz mierzono tempo wydalania PGE<sub>2</sub> w moczu, co w sposób pośredni określa tempo syntezy tego związku w nerce (Frolich i wsp., 1975). Dodatkową zaletą protokołu doświadczalnego było niestosowanie narkozy i zabiegu chirurgicznego, które to czynniki mogą same w sobie wpływać na funkcjonowanie nerki. Głównym celem pracy było ustalenie czy rzeczywiście w warunkach fizjologicznych interakcja pomiędzy wazopresyną a prostaglandyną E<sub>2</sub> zmienia w sposób istotny transport NaCl w pętli lub innym odcinku kanalika oraz który z receptorów AVP jest zaangażowany w ten mechanizm.

Czuwające psy wprowadzano w stan diurezy wodnej co w sposób naturalny obniżało prawie do zera poziom endogennej wazopresyny. Stopień przewodnienia utrzymywano precyzyjnie na poziomie 2% masy ciała. Podanie wazopresyny w dawce fizjologicznej spowodowało istotne obniżenie wydalania moczu z jednoczesnym znacznym wzrostem wydalania sodu. U psów, którym podano dDAVP, antydiuretyczny analog wazopresyny pozbawiony działania na receptory typu V<sub>1</sub>, stwierdzono kilkukrotnie niższe wydalanie sodu niż u psów, u których stymulowano obydwa typy receptorów za pomocą naturalnej wazopresyny. Podobnie niskie wydalanie sodu zaobserwowano także u psów, u których na tle infuzji AVP zablokowano syntezę prostaglandyn za pomocą indometacyny. Jednocześnie tempo wydalania PGE<sub>2</sub> w moczu było najwyższe u psów otrzymujących AVP; u zwierząt otrzymujących dDAVP wydalanie PGE<sub>2</sub> było dwukrotnie niższe. Zanotowano także wysoką korelację ( $r = 0.85$ ) pomiędzy wydalaniem sodu a wydalaniem prostaglandyn w moczu. Dane te w pełni potwierdzają postawioną hipotezę, że wazopresyna stymuluje syntezę prostaglandyny



$E_2$  za pośrednictwem receptorów  $V_1$  oraz, że zmniejsza ona całkowitą reabsorpcję sodu, co prowadzi do wzrostu jego stężenia i tempa wydalania w moczu (ang. "AVP natriuresis"). Okazało się również, że obniżenie reabsorpcji  $Na^+$  nie dotyczy kanalików proksymalnych na co wskazuje niezmienny klirens litu, będący dobrym wskaźnikiem transportu w tym odcinku. Nie można natomiast jednoznacznie rozstrzygnąć czy antagonistyczny w stosunku do wazopresyny wpływ prostaglandyn na transport kanalikowy dotyczy zarówno pętli Henlego jak i kanalików zbiorczych czy też wyłącznie jednego z nich. Wątpliwość ta jest tym bardziej zasadna, iż opisany u gryzoni mechanizm obniżania transportu  $NaCl$  w grubym odcinku pętli Henlego przez  $PGE_2$  wydaje się nie występować u ludzi i psów (Bankir, 2001).

Interesujące są uzyskane w tych doświadczeniach (II.) dane dotyczące osmolalności moczu oraz wzajemnego ilościowego stosunku głównych jego składników - elektrolitów i mocznika. Podanie dDAVP lub zablokowanie syntezy prostaglandyn na tle infuzji AVP spowodowało istotny wzrost udziału mocznika w osmolalności wydalanego moczu. U psów, którym podawano AVP bez jednoczesnej blokady COX, mocznik stanowił jedynie 42% całej osmolalności moczu (dla porównania, 81% i 67% w pozostałych grupach); osmolalność zależała przede wszystkim od bardzo wysokiego stężenia sodu. Natomiast całkowita osmolalność moczu była najwyższa u psów otrzymujących indometacynę na tle infuzji wazopresyny, a więc u takich, u których stymulowane są zarówno receptory  $V_1$  jak i  $V_2$  a jednocześnie zablokowana jest synteza prostaglandyn. Niższa osmolalność w grupie otrzymującej dDAVP mogła zależeć od wyższego, w porównaniu z grupą otrzymującą indometacynę, poziomu prostaglandyn lub/i od braku stymulacji receptorów  $V_1$ . Należy też brać pod uwagę, że w przypadku AVP, stymulacja receptorów  $V_1$  mogła prowadzić do zmniejszenia przepływu krwi przez rdzeń nerki a więc zmiany, która sama przez się mogła stwarzać lepsze warunki do zagęszczania moczu (por. także niżej: Eikozanoidy a ukrwienie nerki).

Jeżeli prawdą jest, że selektywne obniżenie transportu w grubym odcinku ramienia wstępującego pętli ma niewielki wpływ na wydalanie sodu a wpływa głównie na zawartość  $Na^+$  w tkance rdzenia czyli na tzw. wewnątrznerkowy bilans sodu (Reeves i wsp. 1996) a ponadto antagonizm pomiędzy AVP i PG w tym odcinku występuje jedynie u gryzoni, wyniki naszych badań na psach sugerują, że obniżenie reabsorpcji sodu dotyczyło korowego i rdzeniowego odcinka kanalików zbiorczych. Zgodnie z najnowszymi poglądami wazopresyna działając na receptory  $V_{1a}$  w błonie luminalnej stymuluje syntezę prostaglandyn, które hamują jej hydroosmotyczne działanie będące



podstawą właściwości antydiuretycznych (Bankir, 2001). Prostaglandyny obniżają aktywność cykazy adenylationowej zaangażowanej w procesy prowadzące do zwiększenia przepuszczalności ścian kanalik zbiorczego dla wody i mocznika oraz zwiększonej reabsorpcji sodu, są to zarazem procesy stymulowane przez AVP za pośrednictwem receptorów  $V_2$  zlokalizowanych na błonie podstawnobocznej komórek kanalikowych (Bankir, 2001). Tak więc zablokowanie syntezy prostaglandyn lub selektywna stymulacja receptorów  $V_2$  przez dDAVP prowadziły nie tylko do zwiększenia zagęszczania moczu ale także w sposób bezpośredni i pośredni zmniejszały wydalanie sodu i wody.

W kolejnej pracy podjęliśmy próbę rozstrzygnięcia w jakim stopniu zmieniony bilans wodno-elektrolitowy ustroju (zwiększona zawartość soli i zwiększona objętość płynu) wpływa na wzajemne zależności i rolę pochodnych kwasu arachidonowego w regulacji czynności nerki (III.). Większość doniesień wskazuje, iż synteza prostaglandyn oraz ich wydalanie z moczem wzrasta w stanie zwiększonej objętości płynu pozakomórkowego (Shimizu i wsp., 1973; Knox i Granger, 1992) i podczas przewlekłego podawania soli (Conrad i Dunn, 1992). Wiadomo, że zwiększona podaż sodu (z wtórnym wzrostem objętości płynów) zmniejsza także reaktywność wazopresyny na zmiany osmolalności osocza tzn. krzywa zależności stężenia hormonu w osoczu od zmian jego osmolalności ulega spłaszczeniu i przesunięciu w stronę wyższych osmolalności. W związku z tym można było także oczekiwać, że w stanie przewodnienia organizmu wzajemne oddziaływanie AVP i eikozanoidów na różne bodźce będzie także inne niż w stanie prawidłowej objętości płynów ustrojowych (euwolemii).

Narkotyzowanym szczurom infundowano sól 5% do aorty powyżej odejścia tętnic nerkowych wywołując ekspansję pozakomórkową, której towarzyszył wzrost stężenia sodu w osoczu (maksymalnie o 5 mM) (III.). W celu wyeliminowania wpływu wzrastającego w tej sytuacji ciśnienia krwi, co *per se* może zmieniać czynność nerki (np. "natriureza z nadciśnienia"), ciśnienie perfuzyjne narządu utrzymywano na stałym poziomie. W czasie infuzji soli hipertonicznej razem ze wzrostem wydalania wody i sodu w moczu obserwowano postępujący wzrost stężenia chlorku sodu w płynie śródmiąższowym rdzenia nerki (wzrost admitancji), co wskazywało na zwiększenie



reabsorpcji NaCl ze światła ramienia wstępującego pętli Henlego. \* W sytuacji zwiększonej objętości płynu pozakomórkowego i dodatniego bilansu  $\text{Na}^+$ , wywołanych infuzją soli hipertonicznej, podawano w krótkim czasie dożylnie małą objętość izotonicznego płynu stanowiącą 0,5% masy ciała. Podanie soli 0,9% lub takiej samej objętości pełnej krwi (dla wyeliminowania ewentualnej roli rozcieńczenia krwi krążącej lub zmiany jej właściwości reologicznych), zwiększało wydalanie sodu i wody, znacznie bardziej niż by to wynikało z przewidywanego postępującego wzrostu zależnego od kontynuowanej infuzji soli hipertonicznej.

W kolejnych doświadczeniach (III.) wraz z małą objętością soli izotonicznej podawano znane inhibitory COX: indometacynę lub meklofenamian sodu. Wbrew oczekiwaniom, zablokowanie szlaku cyklooksygenazy nie tylko nie zmniejszyło nieproporcjonalnie wielkiego przyrostu diurezy i natriurezy u zwierząt z ekspansją hipertoniczną lecz wręcz ten przyrost spotęgowało. Przyrost admitancji rdzenia po zablokowaniu COX u zwierząt z podwyższoną objętością płynów pozakomórkowych był ilościowo podobny (20%) jak u zwierząt euwolemicznych. Zmiana ta, przeciwnie niż u zwierząt kontrolnych, nie była związana ze wzrostem osmolalności moczu. Takiej wzmożonej odpowiedzi natriuretycznej na niewielki "impuls" objętościowy nie obserwowano u zwierząt otrzymujących stałą infuzję soli izotonicznej.

Wydaje się, że antagonizm AVP i  $\text{PGE}_2$  dotyczący transportu NaCl w ramieniu wstępującym pętli Henlego u badanych szczurów nie zależy od samej objętości płynów pozakomórkowych. Wyniki naszych badań sugerują natomiast, że w stanie zaburzonej równowagi wodno-elektrolitowej ustroju ("ekspansja pozakomórkowa") różnica w reakcji na zablokowanie COX w stosunku do warunków normalnych dotyczy przede wszystkim zagęszczania moczu (brak wzrostu jego osmolalności i zwiększona diureza) oraz wydalania sodu, co może sugerować zaangażowanie innych czynników diuretycznych i natriuretycznych. Bardzo prawdopodobny jest udział metabolitów kwasu arachidonowego powstających w wyniku przemian innych niż cyklooksygenacja. Wiadomo np., że produkty epoksygenacji zależnej od CYP450 hamują antydiuretyczne działanie wazopresyny w korowym odcinku kanalika zbiorczego oraz hamują transport

\* Ta pozorna sprzeczność nie była dla nas zaskoczeniem i jest kolejnym przykładem, że wzrost reabsorpcji  $\text{Na}^+$  w pętli Henlego nie musi oznaczać obniżenia wydalania tego jonu w moczu.



sodu w kanaliku proksymalnym i rdzeniowym odcinku ramienia wstępującego pętli Henlego. Jak wiadomo wyeliminowanie jednego ze szlaków metabolizujących ten sam substrat (tu kwas arachidonowy, AA) może prowadzić do zwiększenia aktywności pozostałych szlaków (por. str. 8.).

W celu ograniczenia pola spekulacji dotyczących roli prostaglandyn, szczególnie PGE<sub>2</sub>, w opisanych wyżej zjawiskach, podjęto próbę ustalenia jak zmienia się jej poziom w tkance nerkowej w czasie narastającej ekspansji pozakomórkowej (wywołanej za pomocą infuzji soli izotonicznej) przy stałym lub obniżonym ciśnieniu perfuzyjnym nerki (IV.). Stężenie PGE<sub>2</sub> oznaczano w płynie mikroperfuzyjnym pozostającym w równowadze z płynem śródmiąższowym (metoda mikrodializy). W okresie kontrolnym stwierdzono około 10-krotnie niższe stężenie tego związku w korze niż w rdzeniu nerki (średnio 50 pg/ml w korze i 560 pg/ml w rdzeniu); oznaczano także tempo wydalania PGE<sub>2</sub> w moczu, co przy stosunkowo stabilnej diurezie jest dobrym wskaźnikiem jej syntezy w nerce.

Zgodnie z oczekiwaniem, postępująca ekspansja pozakomórkowa przy stałym ciśnieniu perfuzyjnym nerki wywoływała znaczny wzrost wydalania wody i sodu. Istotnie podwyższony klirens litu wskazywał na upośledzenie reabsorpcji proksymalnej jako przynajmniej jednej z przyczyn narastającej diurezy i natriurezy. Jednocześnie obserwowano istotne obniżenie stężenia PGE<sub>2</sub> w rdzeniu nerki oraz obniżenie jej wydalania w moczu natomiast stężenie PGE<sub>2</sub> w korze nerki podczas narastającej objętości płynu pozakomórkowego utrzymywało się na stałym poziomie.

Mimo postępującej ekspansji pozakomórkowej, obniżenie ciśnienia perfuzyjnego nerki (RPP) powodowało istotne obniżenie wydalania sodu, bez zmian diurezy i klirensu litu. Sugeruje to, iż obniżenie RPP nie tylko zahamowało spadek transportu proksymalnego zależny od narastającej ekspansji pozakomórkowej ale również zwiększyło reabsorpcję Na<sup>+</sup> w dalszych odcinkach kanalika. Podobnie jak przy stałym RPP - obniżało się stężenie PGE<sub>2</sub> w rdzeniu nerki i tempo jej wydalania w moczu. Wydaje się więc, że poziom syntezy prostaglandyn w nerce w większym stopniu zależy od zmian objętości płynu pozakomórkowego niż od ciśnienia perfuzyjnego tego narządu, przynajmniej w badanym zakresie wartości tego ciśnienia.



Odmienne niż to obserwowano przy stałym ciśnieniu perfuzyjnym, jego obniżenie przy narastającej ekspansji pozakomórkowej spowodowało niewielkie obniżenie stężenia PGE<sub>2</sub> w śródmiąszu kory nerki. Interesująca była też uboczna obserwacja, że szczury u których początkowe ciśnienie perfuzyjne było wyższe, wykazywały również większe stężenie PGE<sub>2</sub> w korze, co sugeruje związek pomiędzy syntezą prostaglandyn w korze nerki i RPP.

Reasumując, powyższe dane wskazują, że zwiększone wydalanie sodu i wody oraz upośledzenie transportu proksymalnego w związku z narastającą ekspansją pozakomórkową nie zależy od zwiększonego uwalniania prostaglandyny E<sub>2</sub>, gdyż jej synteza w rdzeniu nerki i wydalanie z moczem ulega jednocześnie obniżeniu a stężenie w korze utrzymuje się na stałym poziomie. Obserwacje te zgodne są z wynikami otrzymanymi w poprzedniej pracy (III.) i mogłyby na przykład sugerować, że metabolity kwasu arachidonowego inne niż PGE<sub>2</sub>, odpowiedzialne są za zwiększoną diuretyczną i natriuretyczną odpowiedź organizmu znajdującego się w stanie dodatniego bilansu NaCl i wody. Zablockowanie syntezy PGE<sub>2</sub> nasilało nawet obserwowaną natriuretyczną odpowiedź nerek, co nasuwa myśl, że wyeliminowanie jednego ze szlaków metabolizujących ten sam substrat zwiększało syntezę w obrębie innych szlaków i ich udział w regulacji czynności nerki.

Celem kolejnych badań (V.) była weryfikacja hipotezy, że zwiększona odpowiedź natriuretyczna i diuretyczna w czasie ekspansji pozakomórkowej oraz spotęgowanie tej odpowiedzi przez indometacynę zależy od innych niż prostaglandyny metabolitów kwasu arachidonowego, np. epoksydów (patrz str. 5/6). Dane z literatury wskazują, że dieta wysokosodowa i zwiększona objętość płynów sprzyja aktywacji metabolizmu AA zależnego od cytochromu P450 (CYP450); stymulacja ta dotyczyła szczególnie szlaku epoksygenacji (Capdevila i wsp., 1992).\* W naszej pracy oceniano wpływ zablokowania szlaku epoksygenazy za pomocą klotrimazolu na czynność wydalniczą nerki a także efekt podania indometacyny po uprzednim zablokowaniu

\* Jednocześnie stwierdzono, że dodatni bilans sodu hamuje ekspresję izoformy COX-2 w korze nerki natomiast stymuluje jej ekspresję w rdzeniu (Yang, 1998)



epoksygenazy u szczurów otrzymujących infuzję soli hipertonicznej, zarówno w doświadczeniach “ostrych” jak i “przewlekłych” (patrz wyżej: Eikozanoidy a filtracja kłębuszkowa).

Jak poprzednio (III.), infuzja soli hipertonicznej spowodowała wzrost stężenia  $\text{Na}^+$  w osoczu, znaczne podwyższenie stężenia elektrolitów w śródmiąszu rdzenia nerki (wzrost admitancji) wskazujące na nasilenie reabsorpcji  $\text{NaCl}$  w pętli oraz wzrost wydalania wody i sodu w moczu (V.). Zablockowanie w tych warunkach syntezy prostaglandyn spowodowało pięciokrotny wzrost wydalania sodu, natomiast zablockowanie syntezy epoksydów za pomocą klotrimazolu zwiększyło wprawdzie znacznie wydalanie sodu, jednak wzrost ten nie różnił się znamienne od efektu samego rozpuszczalnika.

Stężenie elektrolitów w śródmiąszu nerki wzrosło po zablockowaniu COX, zgodnie z oczekiwaniem, natomiast zablockowanie epoksygenazy nie wpłynęło na tę zmienną. Zablockowanie COX po wcześniejszym wyłączeniu szlaku epoksygenazy spowodowało pewne obniżenie diurezy i wydalania sodu oraz wywołało 30% wzrost admitancji w rdzeniu nerki. Obniżenie natriuretycznej reakcji na indometacynę poprzez wstępne wyeliminowanie EET wydawało się przemawiać na korzyść postawionej przez nas hipotezy, że metabolity te odpowiadają za wzmożoną natriurezę, która pogłębia się dodatkowo po zablockowaniu COX w stanie ekspansji pozakomórkowej.

Ponieważ w omówionych wyżej ostrych doświadczeniach nie było pewności, że jednorazowe podanie klotrimazolu efektywnie hamuje epoksygenację, wykonano serię doświadczeń, w których inhibitor ten podawano w zawieszynie oleju przez trzy kolejne dni. Zablockowanie szlaku epoksygenazy jeszcze przed podaniem soli hipertonicznej istotnie zwiększyło nagromadzenie sodu w organizmie (stężenie  $\text{Na}^+$  w osoczu było wyższe o około 5mM w porównaniu do poziomu zmierzonego u zwierząt kontrolnych); oraz bardzo wyraźnie upośledziło wydalanie sodu i wody w trakcie infuzji soli.

Niestety podanie indometacyny w tym układzie doświadczalnym nie potwierdziło obiecujących wyników otrzymanych w doświadczeniach “ostrych”. Zablockowanie COX zwiększyło wydalanie sodu i wody u wszystkich badanych zwierząt, niezależnie od tego czy szlak epoksygenazy został wcześniej zablockowany czy też nie. Jednocześnie w każdym przypadku po zablockowaniu COX obserwowano wzrost stężenia elektrolitów w śródmiąszu, z tym, że wzrost ten był największy u zwierząt otrzymujących wcześniej klotrimazol.



Wyniki naszej pracy potwierdziły ogólną hipotezę, że zwiększone wydalanie sodu i wody w stanie ekspansji pozakomórkowej przynajmniej w części mediowane jest przez epoksydy hamujące transport NaCl w kanaliku proksymalnym i dystalnym. Nie udało się natomiast udowodnić, że te same metabolity mają swój udział w zwiększonej odpowiedzi diuretycznej i natriuretycznej na indometacynę.



## EIKOZANOIDY A UKRWIENIE NERKI

Zablokowanie szlaku cyklooksygenazy przy użyciu indometacyny lub meklofenamianu sodu nie spowodowało istotnych zmian w całkowitym przepływie krwi przez nerkę (RBF) u uśpionych szczurów (I.). Wyniki nasze pozostawały w pewnej sprzeczności z wczesnymi danymi z literatury, które choć niejednoznacznie, w większości przypadków wskazywały na pewne obniżenie przepływu krwi przez nerkę pod wpływem zablokowania COX. Najprawdopodobniej rozbieżne wyniki zależały od różnej narkozy, stanu nawodnienia i gatunku zwierząt użytych do eksperymentu oraz różnic samego protokołu doświadczalnego (Conrad i Dunn, 1992). W miarę gromadzenia się nowych danych okazało się, że obniżenie ukrwienia dotyczy głównie rdzenia (MBF) (Conrad i Dunn, 1992; Mene i Dunn 1992), małej frakcji całkowitego ukrwienia, co najprawdopodobniej nie zostało wychwycone przez pomiar całkowitego RBF.

Można oczekiwać, iż obniżenie ukrwienia rdzenia będzie upośledzało ewakuację substancji osmotycznie czynnych ze śródmiąższu rdzenia i tym samym będzie prowadziło do równoległego wzrostu zarówno gradientu elektrolitowego jak i nieelektrolitowego w nerce. Zwiększenie nagromadzenia tylko elektrolitów w rdzeniu nerki po zablokowaniu COX (I.) (por. wyżej: Eikozanoidy a transport głównych jonów w kanalikach nerkowych) przy jednoczesnym braku wpływu na gromadzenie nieelektrolitów, przemawiało pośrednio przeciwko zmianom MBF. Zastosowana przez nas metodyka pomiaru RBF na podstawie wypływu krwi żyłnej nerkowej (Sadowski i wsp., 1988) nie pozwalała również ze względów technicznych na pomiar RBF u szczurów otrzymujących infuzję  $PGE_2$  do tętnicy nerkowej, co utrudniło wyciąganie wniosków o wpływie prostaglandyn na hemodynamikę nerek. Nie można było jednak wykluczyć, że spadek nagromadzenia NaCl w płynie śródmiąższowym rdzenia (admitancja tkanki) po infuzji  $PGE_2$  zależał przynajmniej w części od wzrostu przepływu krwi i "wypłukiwania" elektrolitów (tzw. zjawisko "wash out") z tkanki nerkowej. Jednak ostateczna ocena wpływu prostaglandyn czy zablokowania szlaku cyklooksygenazy na krążenie nerkowe stała się możliwa dopiero po wprowadzeniu techniki laserowo-Dopplerowskiej do pomiarów lokalnego ukrwienia nerki.



Badania prowadzone na nienarkotyzowanych psach (II.) z powodów metodycznych nie obejmowały pomiarów ukrwienia nerki. Mogłoby to wnieść ważne informacje lecz doświadczenia tego typu bardzo rzadko przeprowadza się na czuwających zwierzętach (Evans i wsp., 2000). Zarówno wazopresyna jak i prostaglandyny są substancjami zaangażowanymi w regulację przepływu krwi przez nerkę. Wiadomo jest, że wazopresyna za pośrednictwem receptorów  $V_1$  powoduje skurcz naczyń nerkowych, szczególnie w obrębie rdzenia nerki (Bankir, 2001). Mimo, iż infuzja AVP w naszych doświadczeniach nie wywoływała wzrostu ciśnienia tętniczego (dawki subpresyjne), nie można wykluczyć, że u badanych psów dochodziło do selektywnego spadku przepływu krwi przez rdzeń. Z drugiej strony wiadomo, że wazopresyna, za pośrednictwem tych samych receptorów  $V_1$ , stymuluje uwalnianie w komórkach śródmiąższowych rdzenia naczyniorozszerzających prostaglandyn, co ostatecznie może prowadzić do wzajemnego znoszenia efektów obu tych substancji czynnych na ukrwienie rdzenia. Nasze wyniki mogą pośrednio sugerować, że do istotnego obniżenia rdzeniowego przepływu krwi mogło dojść u psów, u których infuzja AVP była skojarzona z zablokowaniem syntezy naczyniorozszerzającej  $PGE_2$ . W grupie tej osmolalność moczu była najwyższa, co sugeruje bardzo wysokie stężenie substancji osmotycznie czynnych w rdzeniu nerki. Tak duże nagromadzenie NaCl i mocznika prawdopodobnie zależało nie tylko od ich zwiększonego transportu do śródmiąższu ale także od upośledzenia ewakuacji tych substancji z śródmiąższu w związku z obniżeniem przepływu krwi w tym rejonie.

Zjawisko wypłukiwania elektrolitów z śródmiąższu przez krew perfundującą rdzeń nerki mogło być również jedną z przyczyn zwiększonej natriurezy w stanie zwiększonej objętości płynu pozakomórkowego, bowiem szereg danych wskazuje, że stan taki zwiększa ukrwienie rdzenia nerki (Roman i Zou, 1993). W celu wyjaśnienia jaki jest udział tego mechanizmu w natriurezie obserwowanej po podaniu małej objętości płynów u szczurów euwolemicznych i zwierząt z ekspansją pozakomórkową, mierzono w tych doświadczeniach także korowy i rdzeniowy przepływ krwi (III.). Odrębny pomiar hemodynamiki kory i rdzenia był możliwy dzięki zastosowaniu techniki laser-Doppler określającej wielkość przepływu (tzw. laser-Doppler flux) na podstawie pomiaru iloczynu liczby oraz średniej szybkości krwinek czerwonych



poruszających się w pewnym obszarze. Odpowiedni przyrząd pomiarowy wyposażony jest w sondy igłowe, które po wprowadzeniu do nerki mierzą przepływ w obszarze poniżej końca sondy, nie powodując jednocześnie istotnych uszkodzeń tkanki.

Okazało się, że wstępna infuzja soli hipertonicznej (5%) nie powoduje wzrostu ukrwienia kory i rdzenia nerki. Także dodanie małej objętości płynów (mały "impuls" objętościowy) nie wpływało na wielkość przepływów ani u szczurów euwolemicznych ani u tych z ekspansją pozakomórkową. W świetle otrzymanych wyników, należy uznać, że możliwy mechanizm wypłukiwania elektrolitów z rdzenia przez zwiększony przepływ krwi, nie mógł być odpowiedzialny za zwiększenie wydalania sodu w czasie infuzji soli 5% lub paradoksalną natriurezę po "impulsie" objętościowym. Natomiast zablokowanie COX obniżało wyraźnie (średnio o 30%) przepływ krwi przez rdzeń nerki, niezależnie od wyjściowego stanu nawodnienia zwierząt; jednocześnie ukrwienie kory nerki nie zmieniło się. Systematyczne i powtarzalne obniżenie MBF po podaniu różnych inhibitorów COX, potwierdza wnioski wypływające z licznych (choć nie ze wszystkich) badań (Breyer i Breyer, 2000; Brenner i Rector, 1996), iż w wielu warunkach doświadczalnych przepływ krwi w tym rejonie nerki jest pod tonicznym naczyniorozszerzającym wpływem prostaglandyn, szczególnie  $PGE_2$ .

Ogólnie rzecz biorąc, nie ma podstaw by sądzić, że zmiany ukrwienia rdzenia mogłyby w jakikolwiek sposób przyczyniać się do natriurezy po zablokowaniu COX u szczurów z ekspansją pozakomórkową.

W badaniach mających na celu ustalenie roli metabolitów szlaku CYP450 w natriurezie obserwowanej u zwierząt z ekspansją pozakomórkową (V.) również mierzono przepływ krwi w różnych obszarach nerki i podobnie jak poprzednio (III.) infuzja soli 5% nie wpłynęła na ukrwienie. Zablokowanie szlaku epoksygenazy zarówno w doświadczeniach ostrych jak i przewlekłych również nie wpłynęło na żaden z mierzonych przepływów krwi. Podobnie jak w poprzednich badaniach, podanie indometacyny w każdym przypadku powodowało spadek przepływu krwi przez rdzeń nerki, niezależnie od tego czy szlak epoksygenazy został wcześniej zablokowany czy nie; przepływ przez korę nie ulegał zmianie. Wyniki te potwierdzają nasze dotychczasowe wnioski, iż prostaglandyny u narkotyzowanych szczurów odgrywają



ważną rolę w utrzymywaniu prawidłowego ukrwienia rdzenia. Nie ma podstaw by sądzić, że zmiany przepływu przez rdzeń przyczyniały się do wzrostu wydalania sodu po indometacynie u zwierząt z ekspansją pozakomórkową.



## PODSUMOWANIE

W cyklu prac poświęconych roli pochodnych kwasu arachidonowego, ze szczególnym uwzględnieniem prostaglandyn, w regulacji czynności i ukrwienia nerki uzyskano szereg wyników, które przybliżyły nas do lepszego zrozumienia jaki jest udział tych substancji parakrynnych w procesach fizjologicznych zachodzących w nerce. Jednocześnie na niektóre z postawionych pytań nie uzyskaliśmy jednoznacznej odpowiedzi.

Na podstawie wyników wielu serii doświadczalnych stwierdziliśmy, że w standardowych warunkach zablokowanie szlaku cyklooksygenacji u narkotyzowanych zwierząt może zupełnie nie wpłynąć na filtrację kłębuszkową lub zmienić ją tylko w niewielkim stopniu. Wyniki te są zgodne z większością danych przedstawianych w piśmiennictwie. Nie udało się potwierdzić, że PGE<sub>2</sub> (lub PGI<sub>2</sub>), będąca czynnikiem antagonizującym depresyjny wpływ różnych substancji na mikrokrążenie nerkowe, była również czynnikiem przeciwstawiającym się naczyniokurczącemu działaniu wazopresyny, przynajmniej u czuwających psów w badanym zakresie stężeń hormonu. Nie stwierdzono również związku między stężeniem PGE<sub>2</sub> a tempem filtracji kłębuszkowej w stanie postępującej ekspansji pozakomórkowej wywołanej infuzją soli izotonicznej lub hipertonicznej. Wydaje się natomiast, że produkty epoksygenacji zależnej od cytochromu P450 t. j. EET pełnią istotną rolę w utrzymywaniu prawidłowej hemodynamiki kłębuszków, zwłaszcza pod nieobecność aktywnego szlaku cyklooksygenacji, czy też jego naczyniorozszerzających produktów.

Główne wyniki dotyczące wpływu metabolitów COX na transport NaCl w rdzeniowym odcinku pętli Henlego potwierdziły wnioski wysnuwane przez innych na podstawie badań przeprowadzanych techniką *in vitro*. Zablokowanie COX prowadziło do eliminacji antagonizującego wpływu PGE<sub>2</sub> na stymulowaną przez wazopresynę (AVP) reabsorpcję NaCl w tym odcinku pętli. Zahamowanie COX nie wpłynęło na stężenie substancji nieelektrolitowych (głównie mocznika) natomiast istotnie zwiększyło zawartość Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> oraz wszystkich elektrolitów łącznie, zarówno w płynie



śródmiażdżowym jak i w pełnej tkance rdzeniowej. Wszystkie te zmiany przyczyniły się do znaczącego zwiększenia hipertonii elektrolitowej rdzenia stwarzając tym samym lepsze warunki dla zagęszczania moczu. Odblokowanie zależnej od AVP reabsorpcji sodu w rdzeniowym odcinku pętli Henlego po zablokowaniu COX oraz wzrost zawartości sodu w samej tkance nerkowej nie prowadziły natomiast do zmian wydalania sodu w moczu. Nie jest to zaskakujące bowiem wiadomo, że o ostatecznym tempie wydalania sodu decyduje transport NaCl w korowym odcinku pętli Henlego.

W badaniach na czuwających psach potwierdzono wyniki badań mikropunkcyjnych (zwierzęta w narkozie) wskazujące, że wazopresyna stymuluje syntezę prostaglandyny  $E_2$  za pośrednictwem receptorów  $V_1$  oraz, że prostaglandyna ta zmniejsza reabsorpcję sodu w odcinkach położonych dystalnie w stosunku do kanalika proksymalnego, co prowadzi do wzrostu stężenia i tempa wydalania  $Na^+$  w moczu.

Nie potwierdzono natomiast postulatu, że zwiększone wydalanie sodu i wody oraz upośledzenie transportu proksymalnego w związku z narastającą ekspansją pozakomórkową zależy od zwiększonego uwalniania prostaglandyny  $E_2$ . Ustalono, że (w warunkach kontrolnych) 10-krotnie wyższa niż w korze synteza  $PGE_2$  w rdzeniu nerki oraz wydalanie tego metabolitu w moczu ulegają obniżeniu wraz z rozwijającą się ekspansją pozakomórkową. Na tempo syntezy  $PGE_2$  w korze wysokość ciśnienia perfuzyjnego miała jedynie niewielki wpływ. Wyniki naszych kolejnych badań sugerują, że zwiększone wydalanie sodu i wody w stanie ekspansji pozakomórkowej wywołanej infuzją soli hipertonicznej przynajmniej w części mediowane jest przez epoksydy (EET) hamujące transport NaCl w kanaliku proksymalnym i dystalnym. Nie udało się natomiast udowodnić, że te same metabolity mają swój udział w paradoksalnie zwiększonej odpowiedzi diuretycznej i natriuretycznej na indometacynę.

Obserwowane przez nas systematycznie obniżenie ukrwienia rdzenia po podaniu różnych inhibitorów COX w pełni potwierdza wnioski wypływające z innych badań, iż przepływ krwi w tym rejonie nerki jest pod tonicznym naczyniorozszerzającym wpływem prostaglandyn, szczególnie  $PGE_2$ . Nie ma natomiast podstaw by sądzić, że możliwy mechanizm wypłukiwania elektrolitów z rdzenia przez zwiększony przepływ krwi, mógł być odpowiedzialny za zwiększenie wydalania sodu w czasie infuzji soli 5% lub za paradoksalną natriurezę po "impulsie" objętościowym. Tym bardziej nie można oczekiwać aby ten mechanizm pośredniczył w natriurezie po zablokowaniu COX.



Syntetycznie ujęta opinia, że prostaglandyny powstające w rdzeniu nerki mają odpowiadać za usuwanie nadmiaru wody i sodu i zabezpieczać organizm przed wzrostem objętości pozakomórkowej, podczas gdy te same związki powstające w korze nerki odpowiadają za hemodynamikę kłębuszków, zabezpieczając je przed wpływem czynników naczyniokurczących uwalnianych w stanie obniżonej objętości płynów ustrojowych (Yang i wsp., 1997), nie znalazł pełnego potwierdzenia w naszych badaniach. Szczególnie dane dotyczące rozwijającej się ekspansji pozakomórkowej zależnej od infuzji soli izo- lub hipertonicznej (III, IV i V) wskazywały raczej, że poziom prostaglandyny E<sub>2</sub> w tym stanie obniża się a zupełne zahamowanie szlaku COX wzmagало diurezę i natriurezę u narkotyzowanych szczurów. W pewnej sprzeczności do tak ogólnikowo sformułowanego poglądu (Yang i wsp., 1997) na temat roli prostaglandyn jest także fakt, że metabolity COX-2 powstające w śródmięszu rdzenia nerki umożliwiają komórkom tego obszaru przetrwanie stresu hipertonicznego w czasie rozwijającego się odwodnienia (Harris i Breyer, 2001). W tej sytuacji nie dziwi obserwowany przez nas spadek produkcji PGE<sub>2</sub> w rdzeniu nerki w czasie postępującej ekspansji pozakomórkowej (IV.). Niewątpliwa jest natomiast rola metabolitów COX w utrzymywaniu prawidłowego krążenia rdzeniowego. Wspomniane zaskakujące nas efekty podania inhibitorów COX, (wzmoczona diureza i natriureza u szczurów z ekspansją pozakomórkową) można próbować tłumaczyć w świetle pewnych najnowszych badań. Wykazano mianowicie, że PGE<sub>2</sub> działając od strony luminalnej kanalików może stymulować reabsorpcję wody a także w pewnych warunkach zwiększać reabsorpcję sodu w kanalikach nerkowych. Sugerowano, że PGE<sub>2</sub> dostaje się do światła kanalika na poziomie pętli Henlego i wpływa na zależny od cAMP receptor luminalny zwiększając reabsorpcję Na<sup>+</sup> w rdzeniowym odcinku kanalika zbiorczego (Breyer i Breyer, 2000).

Szerszy kształt zrealizowanych przez nas badań przedstawia się bardzo interesująco. Bardzo ważny wydaje się związek pomiędzy fizjologicznym znaczeniem eikozanoidów w czynności nerki a rolą tego narządu w retencji sodu i powstawaniu choroby nadciśnieniowej. Obok natriuretycznie działających prostaglandyn, jednym z najistotniejszych czynników wydaje się być 20-HETE, produkt ω-hydroksylacji, który wpływa na hemodynamikę nerek, wydalanie sodu a także jest ważnym mediatorem w tzw. kanalikowo-kłębuszkowym sprzężeniu zwrotnym, będącym swego rodzaju



receptorem i efektem decydującym o homeostazie płynów i elektrolitów w organizmie. W świetle dzisiejszej wiedzy wydaje się, że metabolity szlaku cytochromu P450 mają działanie przeciwstawne tzn. wykazują zarówno działanie pro- i antyhipertensyjne. Ze względu na depresyjny wpływ na krążenie nerkowe i obwodowe, wzrost syntezy 20-HETE zwiększa napięcie mięśniówki naczyń i sprzyja powstawaniu nadciśnienia. Z drugiej jednak strony, ze względu na działanie EET i 20-HETE hamujących transport w kanaliku proksymalnym i pętli Henlego, zmniejszenie ich syntezy również będzie prowadziło do rozwoju nadciśnienia (Maier i Roman, 2001). Ostateczne wyjaśnienie roli jaką pełnią metabolity cytochromu P450 w powstawaniu nadciśnienia niewątpliwie wymaga dalszych badań, szczególnie w warunkach różnej podaży  $\text{Na}^+$ .

Godny szczególnego zainteresowania jest również związek metabolitów kwasu arachidonowego z niedotlenieniem nerki. Jest rzeczą znaną, że rdzeń nerki w warunkach fizjologicznych funkcjonuje na granicy hipoksji a jednocześnie mobilizowane są liczne czynniki endo- i parakryne zapobiegające krytycznemu obniżeniu ciśnienia parcjalnego tlenu w tym rejonie nerki i pomagające utrzymać wszystkie funkcje narządu. Między innymi tempo powstawania naczyniokurczącego 20-HETE jest limitowane przez dostępność tlenu w tkance nerkowej. Postuluje się, że metabolit ten moduluje lokalny przepływ krwi w rdzeniu w zależności od stężenia parcjalnego tlenu w tym obszarze (Pallone i wsp., 1998). W świetle ostatnich doniesień wydaje się, że duże znaczenie w odpowiedzi na stres niedotlenienia w nerce ma ostatnie utlenowanie (peroksydacja) AA do izoprostanoidów, najmniej poznanej rodziny pochodnych kwasu arachidonowego. Ta peroksydacja jest dokonywana przez rodniki tlenowe i odbywa się bez uprzedniego uwolnienia kwasu AA z błony komórkowej, co jest dość niezwykle. Istnienie izoprostanoidów udowodniono w mięśniach gładkich naczyń krwionośnych oraz w komórkach mezangialnych i nabłonkowych a ich poziom rośnie u spontanicznie nadciśnieniowych szczurów. W ciągu najbliższych lat zainteresowanie tymi metabolitami będzie szczególnie duże ze względu na ich potencjalny udział w chorobach nerek i zaburzeniach krążenia (Imig, 2000 a).

Rozwój technik eksperymentalnych i narzędzi farmakologicznych takich jak stabilne analogi pochodnych AA, selektywne inhibitory enzymów, wyłączenie genów odpowiedzialnych za powstawanie poszczególnych eikozanoidów czy też indukowanie ich wzmożonej ekspresji przy użyciu plazmidów pozwolą w najbliższej przyszłości na



lepsze zrozumienie jaki jest udział każdego z metabolitów kwasu arachidonowego w regulacji czynności i ukrwienia nerki. Każdy kolejny wyjaśniony mechanizm przybliża nas do pełniejszego określenia i zrozumienia w jaki sposób nerka decyduje o homeostazie płynów ustrojowych i elektrolitów w organizmie.



**PIŚMIENICTWO**

1. Bankir L. Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects. *Cardiovascular Research*. (2001), 51, 372-390
2. Bądryńska B., Sadowski J., Kompanowska-Jeziarska E. Tissue electrical admittance (electrolyte concentration) in rat renal medulla: effects of furosemide and acetazolamide. *Arch. Int. Physiol. Bioch.* (1990), 98, 131-140
3. Breyer M.D., Breyer R.M. Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am. J. Physiol: Renal Physiology*. (2000), 279, F12-F23
4. Breyer M.D., Badr K.F. Arachidonic Acid Metabolites and the Kidney. In *Brenner & Rector's The Kidney*, ed. Brenner B.M. (1996), pp. 754-788, W.B. Saunders Company, Philadelphia
5. Capdevila J.H., Wei S., Yang J., Karara A, Jacobson H.R., Falck J.R., Gungerich F.P., Dubois R.N. Cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase: Regulatory control of the renal epoxygenase by dietary salt loading. *J. Biol. Chem.* (1992), 267, 21720-21726
6. Conrad K.P., Dunn M.J. Renal prostaglandins and other eicosanoids. In *Renal Physiology*, ed. Windhager E.E. (1992), pp. 1707-1757, Oxford University Press, New York
7. Dobrowolski L., Sadowski J., Kompanowska-Jeziarska E. Conductance studies of rat renal medulla for rapid estimation of extracellular electrolyte concentration. *Clin. Phys. Physiol. Meas.* (1992), 13, 257-262



8. Dunn M.J., Beck T.R., Kinter L.B., Hassid A. The effects of vasopressin analogues upon renal synthesis of prostaglandins. In *Prostaglandins and the kidney*, ed. Dunn M.J., Patrono C., Cinotti G.A. (1983), pp. 151-166, Plenum, New York
9. Edwards A., Silldorff E.P., Pallone T.L. The renal microcirculation. *Frontiers in Bioscience*. (2000), 5, 36-52
10. Evans R.G., Madden A.C., Denton K.M. Diversity of responses of renal cortical and medullary blood flow to vasoconstrictors in conscious rabbits. *Acta Physiol. Scand.* (2000), 169, 297-308
11. Frolich J.C., Wilson T.W., Sweetman B.J., Smigel M., Nies A.S., Carr K., Watson J.T., Oates J.A. Urinary prostaglandins: identification and origin. *J. Clin Invest.* (1975), 55, 763-770
12. Harris R.C., Breyer M.D. Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am. J. Physiol.* (2001), 281, F1-F11
13. Imig J.D. Eicosanoid regulation of the renal vasculature. *Am. J. Physiol: Renal Physiology*. (2000 a), 279, F965-F981
14. Imig J.D. Epoxygenase Metabolites: Epithelial and vascular actions. *Molecular Biotechnology*. (2000 b), 16, 233-251
15. Khan K.N., Venturini C.M., Bunch R.T., Brassard J.A., Koki A.T., Morris D.L., Trump B.F., Maziasz T.J., Alden C.L. Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: implications in nonsteroidal antiinflammatory drug-related nephrotoxicity. *Toxicol Pathol.* (1998), 26, 612-620
16. Knox F.G., Granger J.P. Control of sodium excretion: an integrative approach. In *Renal Physiology*, ed. Windhager E.E. (1992), pp. 927-967, Oxford University Press, Oxford



17. Kompanowska-Jeziarska E., Dobrowolski L., Sadowski J. Cysteine enhances in vivo natriuretic potency of ethacrynic acid in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* (1990), 68, 1275-1277
18. Maier K.G., Roman R.J. Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the control of renal function. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* (2001), 10, 81-87
19. Makita K., Takahashi K., Karara A., Jacobson H.R., Falck J.R., Capdevila J.H. Experimental and/or genetically controlled alterations of the renal microsomal cytochrome P450 epoxygenase induce hypertension in rats fed high salt diet. *J. Clin. Invest.* (1994), 94, 2414-2420
20. Mene P., Dunn M.J. Vascular, glomerular, and tubular effects of angiotensin II, kinins, and prostaglandins. In *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, ed. Seldin D.W., Giebisch G. (1992), pp. 1205-1248, Raven Press, New York
21. McGiff J.C., Quilley C.P., Carroll M.A. The contribution of cytochrome P450-dependent arachidonate metabolites to integrated renal function. *Steroids.* (1993), 58, 573-579
22. Murray M.D., Brater D.C. Renal toxicity of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (1993), 33, 435-465
23. Pallone T.L., Silldorff E.P., Turner M.R. Intrarenal blood flow: microvascular anatomy and the regulation of medullary perfusion. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* (1998), 25, 383-392
24. Reeves W.B., Winters C.J., Zimniak L., Andreoli T.E. Medullary thick limbs: Renal concentrating segments. *Kidney Int.* (1996), 50, 154-164
25. Roman R., Zou A-P. Influence of the renal medullary circulation on the control of sodium excretion. *Am. J. Physiol.* (1993), 265, R963-R973



26. Sadowski J., Kulczykowska E., Kulczykowski M., Bączyńska B. Renal vein outflow recording in rats and rabbits: alternative method of RBF measurement. *Acta Physiol. Hungar.* (1988), 72, 335-342
27. Sadowski J., Portalska E. Dynamic evaluation of renal electrolyte gradient by in situ tissue impedance studies. *Kidney Int.* (1983), 24, 800-803
28. Shimizu K., Yamamoto M., Yoshitoshi Y. Effect of saline infusion on prostaglandin-like materials in renal venous blood and medulla of canine kidney. *Jpn. Heart J.* (1973), 14, 140-145
29. Smith M.J., Jr., Cowley A.W., Jr., Guyton A.C., Manning D., Jr. Acute and chronic effects of vasopressin on blood pressure, electrolytes, and fluid volumes. *Am. J. Physiol: Renal fluid Electrolyte Physiol.* (1979), 6, F232-F240
30. Yang T., Singh I., Pham H., Sun D., Smart A., Schnermann J.B., Briggs J.P. Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am. J. Physiol: Endocrinology and Metabolism.* (1998), 274, F481-489



## Modulation of renal medullary ionic hypertonicity by prostaglandins: data from tissue admittance studies in the rat

Leszek Dobrowolski, Elżbieta Kompanowska-Jeziarska and Janusz Sadowski\*

*Department of Applied Physiology, Medical Research Centre of the Polish Academy of Sciences, Jazgarzewska 17, PL-00730 Warsaw, Poland*

1. Modulation of the cortico-papillary electrolyte gradient by prostaglandins (PG) was studied in the kidney of anaesthetized rats. The intrarenal PG activity was varied by synthesis blockade with indomethacin (Ind) or meclophenamate (Me) and by intrarenal infusion of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>).
2. The interstitial electrolyte concentration in the medulla was continuously recorded in the kidney *in situ* as tissue electrical admittance (reciprocal impedance); the total renal blood flow (RBF), inulin clearance ( $C_{in}$ ) and renal excretion were measured simultaneously.
3. Indomethacin and Me (15 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) increased tissue admittance 15–20% in the inner and 12–15% in the outer medulla ( $P < 0.001$ ) whereas PGE<sub>2</sub> (300 ng kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) decreased admittance 14 and 8%, respectively ( $P < 0.01$ ).
4. Renal blood flow and  $C_{in}$  were not affected by intrarenal PG activity changes. There was an increase in urine concentration after PG blockade and a delayed decrease after PGE<sub>2</sub> infusion.
5. A joint analysis of the dynamics of medullary tissue admittance, renal haemodynamics and renal excretion provides evidence that PGs modify the medullary ionic hypertonicity by affecting NaCl transport in the ascending limb of the loop of Henle.

The renal medullary tissue is the site of intense biosynthesis of prostaglandins (PG) which can modify medullary circulation and transport processes in medullary tubule segments (Conrad & Dunn, 1992; Mene & Dunn, 1992). Analyses of tissue slices have shown that PG can dissipate Na<sup>+</sup> ions accumulated in the medulla (Martinez-Maldonado, Tsaparas, Eknoyan & Suki, 1972; Haylor & Lote, 1982), whereas the blockade of PG synthesis increases the ionic hypertonicity (Ganguli, Tobian, Azar & O'Donnell, 1977; Stoff, Rosa, Silva & Epstein, 1981; Haylor & Lote, 1982). A possible mechanism of this action could be an inhibition by PG of antidiuretic hormone (ADH)-dependent NaCl transport in the medullary ascending limb of the loop of Henle, as indicated by studies of isolated microperfused tubule segments (Stokes, 1979; Culpepper & Andreoli, 1983). The changes in NaCl concentration would then occur almost exclusively in the interstitium whereas the intracellular and intratubular compartments, which constitute more than 50% of the medullary volume, would be little affected.

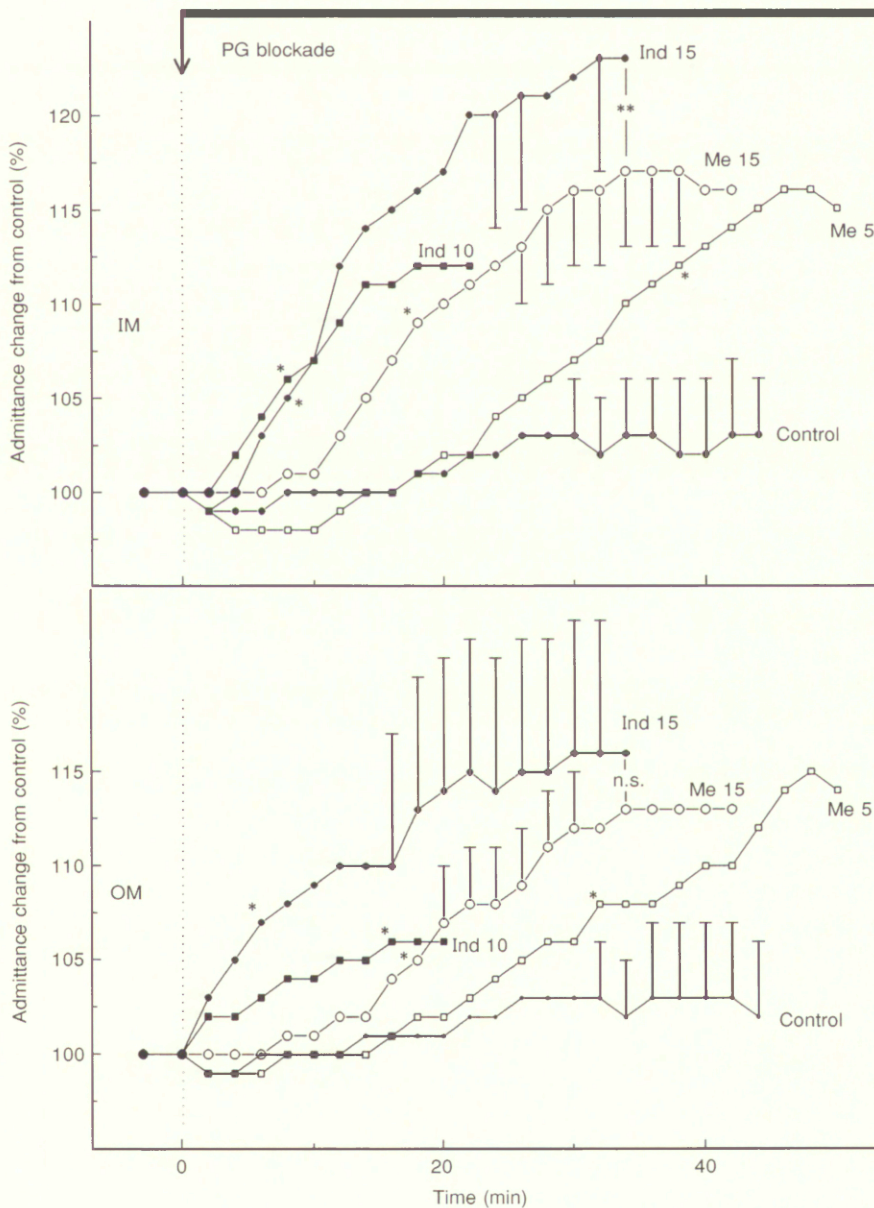
Since the whole tissue NaCl may not be an optimal index of PG-dependent changes in medullary ionic hypertonicity, and the mechanism of these changes remains uncertain, we reinvestigated the subject by measuring tissue electrical admittance, an index of electrolyte (mostly NaCl) concentration in the renal interstitium (Sadowski & Portalska, 1983). A further advantage of this approach is that electrolyte concentration is continuously recorded in the kidney *in situ*, which enables establishment of a time course in each animal studied. Since renal haemodynamics and excretion were measured simultaneously, their relation to electrolyte gradient changes could be assessed. The intrarenal PG activity was varied by inhibition of cyclo-oxygenase using two chemically different blocking agents: indomethacin (Ind) and meclophenamate (Me) and by an intrarenal infusion of PGE<sub>2</sub>. An assessment of the dynamics of medullary ionic hypertonicity changes from tissue admittance was supplemented by analyses of tissue slices providing the data for both the electrolyte and non-electrolyte components of the cortico-medullary solute gradient.

\* To whom correspondence should be addressed.



medullary zones increased 3% during 50 min. A significant elevation in tissue admittance was observed with both Me and Ind, more pronounced for the inner compared with the outer medulla. With the dose of 15 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> the increase in medullary tissue admittance became significant between 5 and 15 min after infusion and tended to level off between 30 and 40 min. The greatest increments exceeded 20% for the inner and 15% for the outer medulla.

Infusion of PGE<sub>2</sub> in animals in which the medullary ion concentration had been previously elevated by inhibition of endogenous PG synthesis with Ind induced a significant progressing decrease in the admittance of 14% in the inner and 8% in the outer medulla (Fig. 2). After cessation of PGE<sub>2</sub> infusion, admittance recovery was seen.



**Figure 1. Admittance changes from control (100%) during infusion of indomethacin or meclophenamate**

Drug doses as follows. Ind 10: 10 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, *n* = 6; Ind 15: 15 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, *n* = 11; Me 5: 5 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, *n* = 10; Me 15: 15 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, *n* = 7. Control group (untreated rats, *n* = 10). IM, OM, inner and outer medulla. \*The starting point of significant difference from concurrent values in the control group, *P* < 0.01. \*\*Significant difference between responses to Ind 15 and Me 15; *P* < 0.05.



### Analysis of medullary tissue slices after PG inhibition

As shown in Fig. 3, in comparison with the medulla of control rats the tissue obtained from Ind-treated animals contained more sodium, potassium and total electrolytes (approximated from  $2[\text{Na} + \text{K}]$  or based on the conductance of the extraction fluid). Also, the standard conductance ( $g_{st}$ ), which is a measure of ion concentration in the interstitium, was significantly higher after Ind. Remarkably, the inhibitor did not increase the non-electrolyte component (mostly urea) of medullary tissue osmolality. Thus, total osmolality of the inner medulla was about  $200 \text{ mosmol kg}^{-1}$  higher after PG blockade than in the control, due exclusively to higher electrolyte concentration.

### Renal function

No significant changes in renal function were observed in the time control group (Group I, Table 1). Both inhibitors of PG synthesis enhanced urine concentration, as indicated by significant increases in urine osmolality ( $U_{osm}$ ) and  $T_{H_2O}^c/C_{osm}$ , where  $T_{H_2O}^c$  is free water transport and  $C_{osm}$  is osmolal clearance. Total RBF, glomerular filtration rate (GFR) and sodium excretion ( $U_{Na}V$ ) were not significantly altered by PG blockade with Me or Ind.

PGE<sub>2</sub> infusion into the renal artery had no influence on GFR (Table 1). The fact that the baseline (control) GFR value was higher than in other groups was probably due to less manipulation of the kidney: the preparatory procedure

did not include the usual clamping of the renal artery, cannulation of the renal vein and establishment of the renal vein–jugular vein circulation, all manoeuvres necessary for RBF measurement. During PGE<sub>2</sub> infusion,  $U_{osm}$  and  $T_{H_2O}^c/C_{osm}$  tended to decline, though not significantly.

After cessation of PGE<sub>2</sub> infusion, urine flow ( $V$ ) and  $C_{osm}$  increased significantly (Fig. 4) as did sodium excretion ( $U_{Na}V$ , not shown), from  $2.5 \pm 0.8$  to  $6.5 \pm 2.0 \mu\text{mol min}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ), whereas GFR was not significantly altered. Simultaneously, a moderate increase in tissue admittance was observed in the inner medulla. In the outer zone, admittance returned to a value not significantly different from that measured before PGE<sub>2</sub> infusion (Fig. 4).

## DISCUSSION

The concentration of electrolytes in the medullary interstitium of the rat kidney, continuously recorded as tissue admittance, was shown in the present work to increase significantly after inhibition of PG synthesis. Similar effects observed after the two chemically different blocking agents (Ind and Me) indicated that the change depended on the elimination of renal PGs and not on any non-specific side action of either drug. In contrast, increased intrarenal PG activity induced by PGE<sub>2</sub> infusion into the renal artery reduced ion concentration in the medulla.

Table 1. Renal function changes in Groups I–IV

	<i>n</i>	RBF (ml min <sup>-1</sup> )	GFR (μl min <sup>-1</sup> )	<i>V</i> (μl min <sup>-1</sup> )	$U_{osm}$ (mosmol (kg H <sub>2</sub> O) <sup>-1</sup> )	$T_{H_2O}^c/C_{osm}$ (%)	$U_{Na}V$ (μmol min <sup>-1</sup> )
Group I	10						
(0–30 min)		7.5 ± 0.5	678 ± 31	15.7 ± 2.9	602 ± 55	48 ± 3	2.2 ± 0.4
(65–85 min)		7.7 ± 0.5	641 ± 43	18.8 ± 3.6	532 ± 37	46 ± 3	2.3 ± 0.5
Group II	7						
Control		6.4 ± 0.4	602 ± 40	9.4 ± 1.3	692 ± 43	57 ± 3	1.0 ± 0.2
Me		7.0 ± 0.4	718 ± 67	12.6 ± 4.1	926 ± 110*	68 ± 3*	1.9 ± 0.7
Group III	11						
Control		8.1 ± 0.7	649 ± 43	11.2 ± 2.8	836 ± 153	58 ± 6	1.4 ± 0.6
Ind		7.9 ± 0.7	561 ± 32	7.1 ± 2.8*	1130 ± 152*	65 ± 6*	1.2 ± 0.5
Group IV	5						
Ind		—	920 ± 113†	19.6 ± 6.1	966 ± 266	60 ± 10	2.2 ± 0.9
PGE <sub>2</sub>		—	929 ± 155	20.5 ± 7.4	682 ± 129	50 ± 10	2.5 ± 0.8

Mean values ± S.E.M. for control periods (Control, no drug infusion), followed by the second urine collection period after Me or Ind infusion; in Group IV data for the control period and the single urine collection period during Ind or PGE<sub>2</sub> infusion, respectively. *n*, number of animals; Me, meclophenamate; Ind, indomethacin; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>. \*  $P < 0.05$  or less vs. control period; †  $P < 0.001$  vs. control periods in Groups I, II and III.



the experimental protocol etc. (Conrad & Dunn, 1992). In our experiments great care was taken to replace fluid losses inescapable in anaesthetized, acutely operated and heparinized animals. This was done by infusing albumin solution and repeated small transfusions of blood from a donor rat. It can be suspected, but not proved, that owing to this strict replacement regime the maintenance of renal haemodynamics and excretion was not dependent on PGs, as in the case of conscious intact animals; hence there was no decrease after PG blockade.

During PGE<sub>2</sub> infusion, tissue admittance decreased while renal excretion and  $U_{osm}$  initially were not significantly affected (Fig. 4). PG-dependent natriuresis and diuresis commonly reported in the literature occurred late in this study, after cessation of PGE<sub>2</sub> infusion, at the time when recovery of tissue admittance was observed. The reasons for the delay require some comment. It has been emphasized that exogenous PG, even when infused directly into the kidney, may not readily attain an effective concentration at all intrarenal sites of action (Ballermann, Levenson & Brenner, 1986; Lote & Haylor, 1989). PG action on collecting duct transport, responsible for diuresis and natriuresis, is not rapid in onset: about 15 min are required *in vitro* before maximal effect is seen (Stokes & Kokko, 1977). Since our PGE<sub>2</sub> infusions were not preceded by bolus injections and lasted only 20–40 min, it is possible that an appropriate PGE<sub>2</sub> concentration in the collecting duct was not attained until towards the end of the infusion. The dissociation of the decrease in medullary ion concentration from the diuretic response to PGE<sub>2</sub> would be difficult to distinguish without continuous admittance recording. It provides another argument for location of the PG effect on the medullary ionic hypertonicity in the thick ascending limb segment.

In agreement with previous studies (Conrad & Dunn, 1992), an inhibition of PG synthesis led to an increase in urine osmolality, both after Ind and Me. PG can suppress urine concentration by antagonizing ADH action in the collecting duct and by interfering with the generation of the cortico-papillary solute gradient. The relative contribution of either mechanism to the increase in urine concentration observed in this study after PG blockade cannot be assessed. In addition to the effect on NaCl transport in the loop, fluctuations of intrarenal PG activity could alter the medullary blood flow (MBF) and thereby affect elimination of NaCl and other solutes from the medullary interstitium. A review of the literature shows that PG action on the renal medullary circulation varies: a reduction of MBF after cyclo-oxygenase blockade was reported from some of the studies and was absent in others (Conrad & Dunn, 1992; Mene & Dunn, 1992). When the MBF did decrease after the addition of PG inhibitors, a concurrent fall in total RBF was observed (Kirschenbaum, White, Stein & Ferris, 1974; Solez, Fox, Miller & Heptinstell, 1974; Bartha & Hably, 1982). In a recent work Ind was found to depress

medullary circulation in female but not in male rats (Parekh, Zou, Juengling, Endlich, Sadowski & Steinhausen, 1993). In the present study using only male rats, total RBF did not change after PG blockade, which makes any selective decrease in MBF less probable. No decrease in the flow was associated with an increase in sodium tissue content reported after PG blockade in the rat (Ganguli *et al.* 1977).

A decrease in MBF can be expected to reduce the elimination of all permeant solutes from the interstitium to about the same extent. On the other hand, our analyses of medullary slices show that total electrolyte or sodium concentration was significantly higher after Ind treatment whereas non-electrolyte solutes did not differ from the control. Haylor & Lote (1982) found that an increase of urea concentration after PG blockade was much less than that of sodium.

In conclusion, the role of a possible decrease in MBF in the mechanism of increasing ionic hypertonicity of the medulla after PG blockade does not seem likely. On the other hand, since total RBF was not measured in the group given an infusion of PGE<sub>2</sub> and no analysis of slices was made, a washout of medullary tissue NaCl related to PG-dependent increase in MBF must be taken into consideration.

In summary, the data on simultaneously determined medullary ionic hypertonicity (tissue admittance), renal haemodynamics and excretory function support an inhibition by PGs of ADH-stimulated NaCl transport in the ascending limb of the loop of Henle as a mechanism underlying alterations of the cortico-papillary electrolyte gradient. Indirect evidence speaks against a role of PG-dependent fluctuations in MBF as a determinant of gradient changes; however, simultaneous measurement of this variable is needed to exclude this possibility.

APPELBOOM, J. W., BRODSKY, W. A., TUTTLE, W. S. & DIAMOND, I. (1958). The freezing point depression of mammalian tissues after sudden heating in boiled distilled water. *Journal of General Physiology* **41**, 1153–1169.

BĄDZYŃSKA, B., SADOWSKI, J. & DOBROWOLSKI, L. (1990). Atrial peptide natriuresis in the rat without genuine rise in filtration rate or wash-out of medullary electrolytes. *Journal of Physiology* **427**, 421–434.

BALLERMANN, B. J., LEVENSON, D. J. & BRENNER, B. M. (1986). Renin, angiotensin, kinins, prostaglandins, and leukotrienes. In *The Kidney*, vol. 1, ed. BRENNER, B. M. & RECTOR, R. C. JR, pp. 124–144. W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto.

BARTHA, F. & HABLY, C. (1982). Effect of indomethacin in intrarenal circulation and sodium and water excretion in anesthetized rats with or without acute volume expansion. *Acta Physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **59**, 217–226.

CONRAD, K. P. & DUNN, M. J. (1992). Renal prostaglandins and other eicosanoids. In *Renal Physiology*, ed. WINDHAGER, E. E., pp. 1707–1757. Oxford University Press, New York.



# Mechanism of vasopressin natriuresis in the dog: role of vasopressin receptors and prostaglandins

ELZBIETA KOMPANOWSKA-JEZIERSKA, CLAUS EMMELUTH, LISBETH GROVE, POUL CHRISTENSEN, JANUSZ SADOWSKI, AND PETER BIE

*Department of Medical Physiology, The Panum Institute, University of Copenhagen, 2200 Copenhagen, Denmark; and Laboratory of Renal and Body Fluid Physiology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 02-106 Warsaw, Poland*

**Kompanowska-Jeziarska, Elzbieta, Claus Emmeluth, Lisbeth Grove, Poul Christensen, Janusz Sadowski, and Peter Bie.** Mechanism of vasopressin natriuresis in the dog: role of vasopressin receptors and prostaglandins. *Am. J. Physiol.* 274 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 43): R1619–R1625, 1998.—Renal effects of physiological amounts of vasopressin were studied in conscious dogs during servocontrolled overhydration (2% body wt). During infusion of vasopressin ( $50 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg body wt}^{-1}$ ), plasma vasopressin concentration increased to  $2.30 \pm 0.20 \text{ pg/ml}$  compared with  $0.12 \pm 0.03 \text{ pg/ml}$  during control (water diuresis). With vasopressin infusion, urine flow was significantly lower ( $0.30 \pm 0.10 \text{ ml/min}$ ) and sodium excretion ( $U_{\text{Na}}V$ ) was significantly higher ( $58.0 \pm 15.8 \text{ } \mu\text{mol/min}$ ) than without vasopressin ( $4.6 \pm 0.4 \text{ ml/min}$  and  $14.4 \pm 4.1 \text{ } \mu\text{mol/min}$ , respectively). Deamino-[Cys<sup>1</sup>,D-Arg<sup>8</sup>]vasopressin, a  $V_2$  receptor agonist ( $4 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), mimicked the antidiuretic response ( $0.20 \pm 0.03 \text{ ml/min}$ ) without changing  $U_{\text{Na}}V$  ( $9.7 \pm 4.4 \text{ } \mu\text{mol/min}$ ). Indomethacin given during arginine vasopressin (AVP) infusion suppressed prostaglandin  $E_2$  excretion, intensified the antidiuresis ( $0.10 \pm 0.02 \text{ ml/min}$ ), and abolished the natriuresis ( $13.4 \pm 3.7 \text{ } \mu\text{mol/min}$ ). During AVP infusion,  $U_{\text{Na}}V$  was highly correlated ( $r = 0.85$ ) with prostaglandin  $E_2$  excretion. Blood pressure, glomerular filtration rate, plasma atrial natriuretic peptide concentration, and the rate of proximal tubule reabsorption (derived from lithium clearance) were similar in all series. The data indicate that, in the dog, physiological amounts of vasopressin can induce natriuresis, probably through activation of non- $V_2$  receptors and the intrarenal synthesis of prostaglandins.

sodium excretion; indomethacin; deamino-[Cys<sup>1</sup>,D-Arg<sup>8</sup>]vasopressin; urinary concentration; lithium clearance

EVIDENCE HAS ACCUMULATED over the years that antidiuretic hormone [arginine vasopressin (AVP)], in addition to its principal action promoting water reabsorption in the collecting system of the nephron, can induce natriuresis in the dog (5, 8, 12, 16, 20, 30) and rat (2, 3, 18, 22, 23).

The mechanism of AVP natriuresis is unclear. Early studies suggested that the natriuretic effect is mediated by some humoral natriuretic substance (17, 21), presumably prostaglandins (PGs) (17). A decade ago, Bie and co-workers (5) showed that natriuresis occurred during infusions of AVP that raised the AVP plasma level to within the physiological range and that the response to deamino-[Cys<sup>1</sup>,D-Arg<sup>8</sup>]vasopressin (dDAVP), a specific agonist of vasopressin  $V_2$  receptor, did not include a natriuretic effect. Because PGs are natriuretic and AVP stimulates their intrarenal synthesis via  $V_1$  receptors (reviewed in Refs. 11 and 25), the

principal renal PG,  $\text{PGE}_2$ , has emerged as a possible mediator of AVP natriuresis.

The present study of the effect of physiological amounts of vasopressin in conscious dogs was designed to explore simultaneously a broad spectrum of factors that could contribute to natriuresis. Experiments were conducted under conditions of sustained servocontrolled hydration, and this protocol eliminated the possibility of natriuresis secondary to a progressing volume expansion or dissipation of medullary hypertonicity. The dose of vasopressin was fixed at a low level so as not to influence mean arterial blood pressure (BP) or glomerular filtration rate (GFR). Administration of dDAVP was used as a means to stimulate vasopressin  $V_2$  receptors without  $V_1$  receptor activation. Measurement of  $\text{PGE}_2$  excretion in different experimental series was included to expose the role of PG synthesis in the response to AVP.

## MATERIAL AND METHODS

The study was designed to examine the action of approximately equipotent antidiuretic doses of AVP and the specific agonist of  $V_2$  receptors, dDAVP, under conditions of near complete suppression of endogenous secretion of AVP by water loading and constant body fluid volume. Vasopressin infusion was performed with or without blockade of PG synthesis with indomethacin (Indo). To avoid any major changes in the corticomedullary solute gradient, the infusion of antidiuretic peptides was started just before water loading.

The experiments were performed on seven conscious female beagle dogs weighing 9.5–13 kg and maintained on a fixed diet of commercial dog food (Febo Professional, Euskirchen, Germany) that provided a daily intake of sodium of  $\sim 6 \text{ mmol/kg body wt}$ ; free access to tap water was allowed.

**Experimental procedures.** In all animals, both common carotid arteries had been placed in skin loops while animals were under general anesthesia, with the use of sterile surgical technique. The dogs were trained to accept catheterization and to rest quietly for several hours supported in the upright position by a canvas sling. Each dog was used in each of four experimental protocols (see below) at intervals of  $>1 \text{ wk}$ .

On the morning before each experiment, sterile catheters (Intracath, Deseret, UT) were placed in the external jugular and the saphenous veins and used for drug infusions and venous blood sampling, respectively. A short catheter placed in an exteriorized carotid artery allowed for measurement of arterial pressure using a Statham P50 transducer and for sampling of arterial blood. Heart rate was determined from the electrocardiogram. A modified indwelling Foley catheter was inserted into the urinary bladder.

Immediately after instrumentation, a constant infusion of antidiuretic peptide (AVP or dDAVP) or vehicle was initiated and continued throughout the experiment. To measure the GFR, a bolus of inulin or creatinine was injected (8 or  $\sim 14$



the same dogs were maintained at a mean of 2.3 pg/ml by exogenous hormone infusion (AVP series), persistent antidiuresis was observed, with appreciable free water reabsorption and  $U_{osm}$  exceeding 900 mosmol/kg (Fig. 1). Remarkably, mean osmolar clearance ( $C_{osm}$ ) was the same as in the water diuresis series (Fig. 1), indicating that the AVP-mediated antidiuresis was solely dependent on an increase in water reabsorption ("pure" antidiuresis). It will be shown below that  $C_{osm}$  was preserved owing to an increase in sodium excretion ( $U_{Na}V$ ).  $U_{osm}$  was highest when PG synthesis was inhibited in animals infused with AVP (AVP + Indo), evidently due to a large concentration in the urine of nonelectrolytes (urea). As expected, plasma AVP was very low in animals given dDAVP, whereas in the AVP + Indo series, it was similar to the series in which AVP was given alone.

Figure 2 collects data for  $U_{Na}V$  and variables that usually determine its magnitude, such as arterial BP and GFR. To suitably relate natriuresis to the excretion of total solutes ( $U_{osm}V$ ), data for excretion of  $Na^+$  ( $U_{Na}V$ ) together with its attendant monovalent anion ( $U_{2Na}V$ ) are given rather than  $U_{Na}V$ . In hydrated dogs given AVP alone,  $U_{2Na}V$  was several times higher than in the three other groups. In this series, sodium salts constituted >40% of the excreted solutes ( $U_{osm}V$ ); the increment in  $U_{2Na}V$  can be construed as a factor preventing a decrease in  $U_{osm}V$  or  $C_{osm}$ . Indeed, such a decrease did occur in the dDAVP and AVP + Indo series in which  $U_{Na}V$  was similar to that observed during water diuresis (Figs. 1 and 2). In the AVP series,  $Na^+$  salts were the main ionic component of the urine, in contrast to the dDAVP series in which the contribution of sodium and potassium was similar (see Fig. 1, *inset*). A comparison of urine composition and flow between these two antidiuretic series shows that  $U_{Na}V$  was 5.1-fold higher with AVP than with dDAVP infusion, due to a 2.7-fold higher sodium concentration ( $U_{Na}$ ) and only a 1.9-fold higher urine flow ( $V$ ). In all four experimental series, BP and GFR, potential determinants of  $U_{Na}V$ , were similar (Fig. 2). The similarity of proximal reabsorption (estimated from  $Li^+$  clearance) suggested no differences in the fluid outflow from the proximal tubule (data not shown).

PG excretion was remarkably high during water diuresis (Fig. 3), but because large variations in  $V$  invalidate the rate of excretion of PGs as an index of their intrarenal synthesis (16, 20, 32), the value cannot be compared with those measured in the three other series. An extremely low PG excretion in animals given Indo confirms the assumption that effective inhibition of PG synthesis was obtained by Indo. Mean PG excretion was highest in the AVP series in which major natriuresis was observed. It became gradually lower

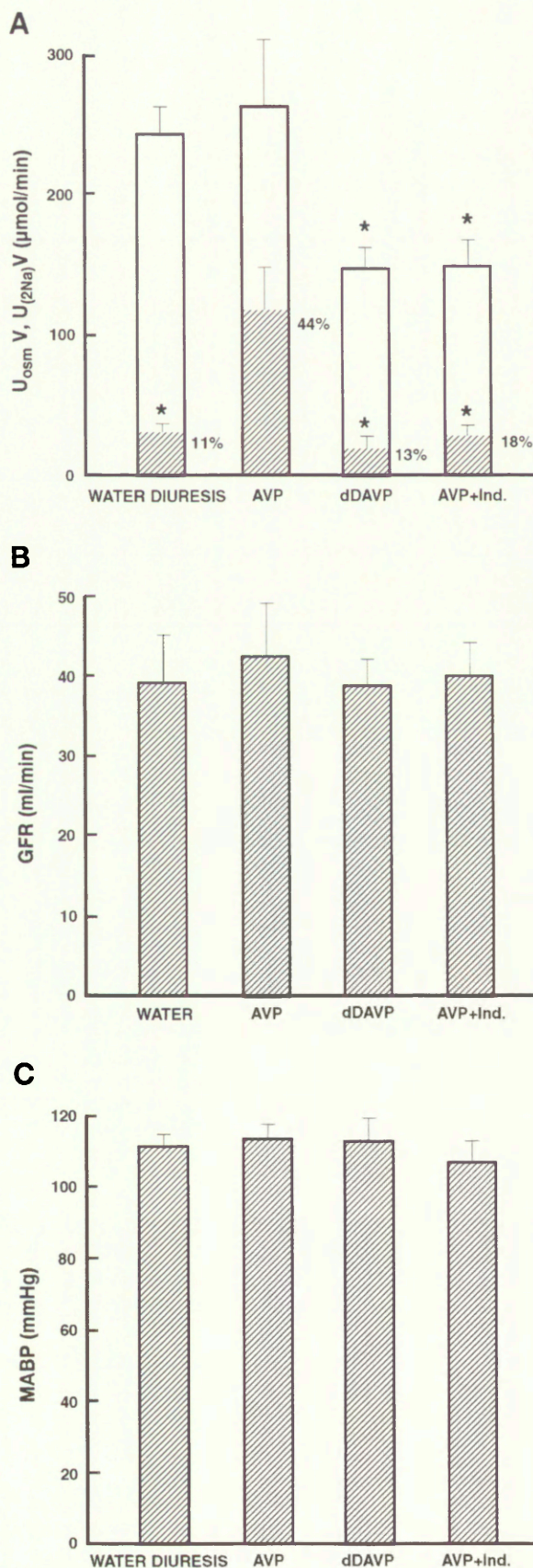


Fig. 2. Solute excretion (A), glomerular filtration rate (GFR, B), and blood pressure (MABP, C) during steady states after water loading without and with concomitant infusion of vasopressin or dDAVP (see MATERIAL AND METHODS). A: total solute excretion ( $U_{osm}V$ , whole bar length) and  $Na^+$  + anion excretion ( $U_{2Na}V$ , hatched portion of bar) in 4 experimental series. \*Significantly different from AVP series ( $P < 0.05$ ).



lation of only  $V_2$  receptors failed to induce natriuresis, a finding highlighted by the fact that the intratubular hydraulic conditions in this series were presumably very similar to those of the AVP series. It appears therefore that stimulation of non- $V_2$  receptors is a prerequisite for, although not necessarily the only cause of, AVP natriuresis.

Activation of vasopressin receptors could lead to natriuresis via a number of mechanisms. Because the dose of AVP applied was subpressor and mean arterial BP was similar in all experimental series, a pressure natriuresis can safely be excluded. AVP has occasionally been reported to increase GFR (13), possibly by constriction of the efferent arteriole of the glomerulus, and in one study the natriuresis observed after prolonged infusions of AVP was associated with increasing GFR (30). However, in the present experiments the modest dose of AVP did not measurably change GFR.

It has been found that AVP may stimulate the release of the atrial natriuretic factor (ANP), probably via  $V_1$  receptors (24). However, under our experimental conditions no such stimulation was observed. Indeed, plasma ANP tended to be lower in the AVP series than, for instance, in the dDAVP series. This seems to exclude the possibility that ANP could act as a mediator of AVP natriuresis.

Vasopressin infusion has been reported to inhibit the renin-angiotensin-aldosterone system (30). However, this effect was apparently due to body fluid expansion because it was not observed when the fluid volume was servocontrolled (12). Therefore, it appears unlikely that a vasopressin-mediated inhibition of the release of renin played a significant role in our experiments.

AVP is also a known stimulator of intrarenal biosynthesis of PG via  $V_1$  receptors; a similar role of  $V_2$  receptors is controversial (reviewed in detail in Ref. 11). The renal excretion of  $PGE_2$ , the major renal PG, is commonly regarded as a reliable index of the intrarenal PG synthesis under most experimental conditions. One notable exception is that when diuresis varies considerably, PG excretion increases with increasing  $V$  (16, 20, 32). It is very probable that relatively high PG excretion in our water diuresis series was related to the high  $V$ , which was 15–45 times higher than that seen in the three antidiuretic series.

When only antidiuretic conditions are compared, it is apparent that  $PGE_2$  excretion was highest in the AVP series, compatible with stimulation of PG synthesis via vasopressin  $V_1$  receptors. Within this series, PG excretion was highly correlated with  $U_{Na}V$ , more than with  $V$ . Lower PG excretion in the dDAVP series presumably reflected some baseline intrarenal synthesis.  $U_{Na}V$  was similarly low with the basal PG activity (dDAVP series) and during major inhibition of PG synthesis with Indo (AVP + Indo), suggesting no tonic PG-dependent natriuresis at a normal activity level.

Previous data documenting the relationship between  $U_{Na}V$  and PG were thoroughly discussed in recent reviews (11, 25), and the discussion may be used as a basis for a possible explanation of the AVP natriuresis

observed in the present study. In hydrated dogs receiving AVP infusion, augmented synthesis of PG, especially of  $PGE_2$ , the major renal species, could increase  $U_{Na}V$  by a number of mechanisms. An obvious one would be a direct inhibition of sodium reabsorption in the cortical and medullary collecting duct, as reported from studies with isolated microperfused tubule segments. An inhibition by PG of AVP-dependent NaCl reabsorption in the medullary ascending limb of the loop of Henle, an action well documented in some species (albeit not in the dog), may have contributed to overall inhibition of NaCl reabsorption both directly and by reducing interstitial hypertonicity of the renal medulla. Partial dissipation of medullary hypertonicity after activation of PG biosynthesis could occur by other, perhaps more important, mechanisms. Earlier studies have indicated that most PGs (including  $PGE_2$ ) and arachidonic acid increase glomerular juxtamedullary blood flow more than superficial cortical flow. Thus flow through the vasa recta could increase considerably and lead to a "washout" of medullary solutes. Still another mechanism for reduction of medullary hypertonicity would involve a documented reduction by PGs of collecting duct cell permeability to urea and limitation of urea back diffusion in this segment. A reduction of the corticomedullary osmolar gradient would impair tubular reabsorption of NaCl. Decreased tonicity of medullary tissue would reduce reabsorption of water from descending limbs of the loops of Henle, leading to increased delivery of fluid with a lower sodium concentration to more distal tubule sites.

Our data cannot distinguish among the various mechanisms potentially responsible for natriuresis. However, the observation in the AVP series that the increase in  $U_{Na}V$  was to a large extent due to an increase in  $U_{Na}$  and to a less extent to an increase in urine volume speaks in favor of an important role of direct inhibition of tubular NaCl transport. Data of the literature suggest distal nephron segments as sites of transport inhibition, in accordance with our measurements suggesting the constancy of proximal reabsorption.

A possible PG mediation of AVP natriuresis in the dog was first suggested by Fejes-Toth and co-workers (17). Lote and co-workers (23) studied the role of PG in the rat and concluded that  $PGE_2$  was not involved in the natriuresis. However, their data indicated that with an AVP infusion rate of  $50 \text{ pmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg body wt}^{-1}$ , Indo significantly attenuated the observed increase in  $U_{Na}V$ . Important species differences may be expected: studies of microdissected cortical collecting ducts indicated that  $PGE_2$  inhibited cAMP accumulation induced by AVP in the rabbit but not in the rat kidney (7). Others have reported very slight (3) or nonexistent (27) AVP natriuresis in the rat, and sodium retention was reported from some studies in humans (1, 26).

In summary, the present results indicate that in hydrated dogs physiological amounts of AVP induce natriuresis, at least within the first hours of exposure to the hormone. The natriuresis was specifically related to the peptide action and not to the consequence of



27. **Plange-Rhule, J., and J. C. Atherton.** Natriuretic effect of arginine vasopressin (AVP) in chronically instrumented conscious rats: fact or artefact? (Abstract). *J. Physiol. (Lond.)* 452: 82P, 1992.
28. **Sakurai, H., A. Kanai, K. Momura, H. Demura, and K. Shizume.** A simple and highly sensitive radioimmunoassay for 8-arginine vasopressin in human plasma using reversed-phase C<sub>18</sub> silica column. *J. Tokyo Women's Med. Coll.* 56: 394-403, 1986.
29. **Schütten, H. J., A. C. Johannessen, C. Torp-Pedersen, K. Sander-Jensen, P. Bie, and J. Warberg.** Central venous pressure—a physiological stimulus for secretion of atrial natriuretic peptide in humans? *Acta Physiol. Scand.* 131: 265-272, 1987.
30. **Smith, M. J., Jr., A. W. Cowley, Jr., A. C. Guyton, and D. Manning, Jr.** Acute and chronic effects of vasopressin on blood pressure, electrolytes, and fluid volumes. *Am. J. Physiol.* 237 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 6): F232-F240, 1979.
31. **Winer, B. J.** *Statistical Principles in Experimental Design.* New York: McGraw-Hill, 1971.
32. **Wright, L. F., S. G. Rosenblatt, and M. D. Lifschitz.** High urine flow rate increases prostaglandin E excretion in the conscious dog. *Prostaglandins* 22: 21-34, 1981.





## Exaggerated volume expansion natriuresis in rats preloaded with hypertonic saline: a paradoxical enhancement by inhibition of prostaglandin synthesis

E. KOMPANOWSKA-JEZIERSKA, A. WALKOWSKA and J. SADOWSKI

*Laboratory of Renal and Body Fluid Physiology, Medical Research Centre of the Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland*

### ABSTRACT

In preliminary experiments rats preinfused with hypertonic saline showed exaggerated natriuresis after an additional small volume expansion (SVE). This was systematically studied in anaesthetized Wistar rats prepared for clearance studies of the left kidney and measurements of medullary blood flow (MBF, laser-Doppler technique) and tissue electrical admittance ( $Y$ ), an index of interstitial ion concentration. The rats were preinfused i.v. with 3 mL of 5% NaCl during 90 min. A subsequent injection of isotonic saline, 0.5% of body weight, increased sodium excretion ( $U_{Na}V$ ) from  $2.1 \pm 0.5$  to  $4.5 \pm 1.1 \mu\text{mol min}^{-1}$  and urine flow ( $V$ ) from  $12.0 \pm 2.3$  to  $24.3 \pm 5.6 \mu\text{L min}^{-1}$  ( $P < 0.02$ ). The same volume of whole blood increased  $U_{Na}V$  from  $5.0 \pm 1.4$  to  $8.7 \pm 1.7 \mu\text{mol min}^{-1}$  and  $V$  from  $22.3 \pm 5.1$  to  $37.4 \pm 5.9 \mu\text{L min}^{-1}$  ( $P < 0.01$ ). The glomerular filtration rate, MBF and  $Y$  did not change. In rats preinfused with 0.9% saline no natriuresis was observed after SVE. To examine if prostaglandins (PG) were involved in SVE natriuresis, indomethacin (Indo),  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  or sodium meclophenamate (Mecllo),  $7.5 \text{ mg kg}^{-1}$ , were added to the injected 0.9% saline. Paradoxically, both PG synthesis inhibitors enhanced natriuresis to SVE. After Indo  $U_{Na}V$  increased from  $2.0 \pm 0.6$  to  $7.6 \pm 1.3 \mu\text{mol min}^{-1}$ , significantly more than after SVE alone ( $P < 0.001$ ). At higher baseline  $U_{Na}V$ , the increase with Mecllo from  $4.5 \pm 1.2$  to  $13.5 \pm 1.8 \mu\text{mol min}^{-1}$  was significantly higher than after whole blood infusion ( $P < 0.001$ ). MBF decreased and  $Y$  increased after both inhibitors. Further studies are required to explain the enhancement of natriuresis after blockade of PG synthesis.

**Keywords** extracellular fluid, fluid volume expansion, natriuresis, prostaglandin inhibition, renal medullary blood flow.

Received 10 March 1999, accepted 31 August 1999

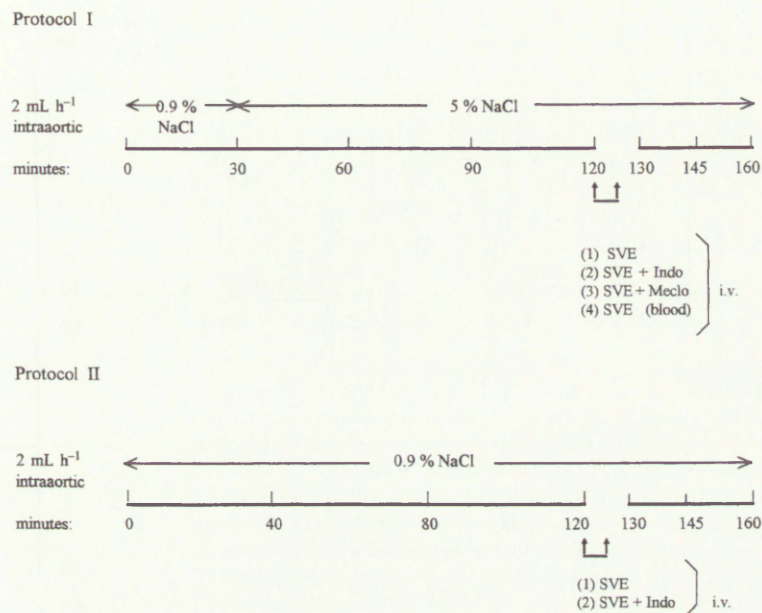
Multiple mechanisms, physical, humoral and neural, have been invoked to explain the natriuresis secondary to experimental body fluid volume expansion, but the relative contribution of individual factors has proved difficult to delineate (reviewed by Miller *et al.* 1996). One of the reasons is that even in acute experiments fluid loading results in natriuresis which develops over a considerable time interval, and the major factors involved in different phases are different and difficult to single out.

We have found in preliminary experiments that in rats preloaded with hypertonic saline an i.v. injection of a small fluid volume (0.5% body weight) results in an immediate major increase in sodium and water excretion. This rapid response could be utilized as a model

situation to test the role of different agents presumed to enhance or inhibit the natriuresis.

Urinary prostaglandin (PG) excretion was reported to increase during volume expansion with saline and an inhibition of PG synthesis was usually shown to blunt the natriuresis (reviewed by Knox & Granger 1992). We present here a systematic study of the exaggerated natriuretic response to a small volume expansion (SVE) in animals pretreated with hypertonic saline and explore the role of renal PG in this response. As PG could promote natriuresis by a number of mechanisms, including increasing medullary blood flow (MBF) and decreasing medullary interstitial hypertonicity, clearance studies were supplemented with measurements of inner MBF and medullary interstitial electrolyte concentration





**Figure 1** Diagrammatic presentation of the regimens used for infusions (arrows) and urine collections (bold lines with minute marks) in four groups of rats studied according to Protocol I and two groups on Protocol II. SVE – small volume expansion: isotonic saline, 0.5% body weight, given i.v. during 5 min; Indo – indomethacin; Meclo – sodium meclophenamate.

within Protocol I. Subsequently two clearance periods were made while isotonic saline infusion into the aorta was continued.

### Statistics

Statistical significance of changes within one group over time was first evaluated by repeat measurement ANOVA followed by *t*-test for dependent variables. Differences between groups were analysed by one-way ANOVA and then modified *t*-statistics for independent variables, with Bonferroni's correction for multiple comparisons.

## RESULTS

Suprarenal aortic infusion of hypertonic saline in animals in which any increase in RPP was prevented by gradual constriction of the aortic snare invariably increased urine flow ( $V$ ) and sodium excretion ( $U_{\text{Na}}V$ ) without changing renal haemodynamics (Table 1). At the end of experiments systemic plasma Na concentration was 3–4 mM above preinfusion control level. The magnitude of the increase in renal excretion was remarkably variable (see SEM values before and after 5% saline), probably due, among other factors, to unavoidably variable positioning of the tip of the aortic catheter. The total ion concentration in the medullary interstitium measured as tissue admittance ( $Y$ ) increased modestly but significantly.

With the background of suprarenal aortic infusion of isotonic saline (Protocol II) no significant changes in renal excretion and GFR were seen after a standard isotonic saline infusion (SVE) (Fig. 2, Table 2). By contrast, in rats preloaded with 5% saline (Protocol I),

**Table 1** The function of the experimental kidney in the control period (0.9% saline infusion) and after about 90 min of hypertonic saline infusion ( $2 \text{ mL h}^{-1}$ )

	0.9% NaCl	5% NaCl
$V$ , $\mu\text{L min}^{-1}$	$6.4 \pm 0.8$	$19.2 \pm 2.9^*$
$U_{\text{Na}}V$ , $\mu\text{mol min}^{-1}$	$0.6 \pm 0.1$	$2.9 \pm 0.6^*$
GFR, $\mu\text{L min}^{-1}$	$929 \pm 53$	$952 \pm 52$
CBF, PU	$502 \pm 15$	$498 \pm 15$
MBF, PU	$197 \pm 16$	$184 \pm 16$
$Y$ , $\mu\text{S}$	$931 \pm 24$	$1010 \pm 24^*$
$U_{\text{osm}}$ , mosm/kg	$890 \pm 73$	$706 \pm 35^*$

Mean  $\pm$  SEM,  $n = 25$ .  $V$  – urine flow;  $U_{\text{Na}}V$  – sodium excretion; GFR – glomerular filtration rate; CBF – cortical blood flow; MBF – medullary blood flow;  $Y$  – medullary tissue admittance,  $\mu\text{S}$ ;  $U_{\text{osm}}$  – urine osmolality. \* significantly different from 0.9% control at  $P < 0.01$  or less.

SVE with isotonic saline or whole blood increased  $U_{\text{Na}}V$  twice or more, by at least  $2.4 \mu\text{mol min}^{-1}$ , and remained elevated for 30 min. The data from four experiments with intra-aortic infusion of 5% saline for more than 90 min as well as extrapolation from three 30-min periods indicate that without SVE a modest increase of  $U_{\text{Na}}V$  of about  $0.6 \mu\text{mol min}^{-1}$  could be predicted within a 30-min period. GFR, cortical and medullary blood flow (CBF, MBF), and medullary tissue  $Y$  did not change significantly after SVE.

When Indo was added to isotonic saline injected to rats preloaded with hypertonic saline (SVE + Indo),  $U_{\text{Na}}V$  and  $V$  increased almost 4-fold and significantly more than after SVE alone, without any change in GFR (Fig. 2, Table 2). Accidentally, in the group of hypertonic saline loaded animals given meclophenamate in saline (SVE + Meclo) and in the hypertonic saline-



## DISCUSSION

This study has made use of an observation that in animals acutely preloaded with hypertonic saline an additional minor volume expansion with isotonic saline triggered a rapid and lasting natriuresis without changing GFR or/and CBF and MBF. The saline volume infused was small (0.5% body weight). However, given i.v. within 5 min it apparently affected circulatory volume receptors and/or activated other mechanisms responsible for volume expansion natriuresis. The excretion and clearance measurements were resumed 10 min after the start of SVE, to avoid possible transient effects of rapid infusion. The natriuresis was pronounced and stable during two 15-min clearance periods. It is unlikely for the natriuresis to have been mediated by a dilution of plasma constituents or a change in rheological properties of circulating blood; indeed, the response to an infusion of the same volume of whole blood was quite similar. Nor was the natriuresis clearly related to the baseline level of  $U_{\text{Na}}V$  (Fig. 2). Further studies are required to establish the critical parameters of the model used in this study, e.g. the amount of salt administered, the concentration of saline infused or maintenance of constant renal perfusion pressure. Preliminary observations suggest that the suprarenal aortic route of 5% saline administration is not critical and comparable responses to SVE can be evoked after intravenous infusion. Body fluid changes induced in the model are obviously quite complex, including plasma hypernatraemia and hyperosmolality leading to a shift of water from intra- to extracellular compartment, which would in turn attenuate hypernatraemia and enhance extracellular volume expansion (EVE).

Necessarily, the secondary hormonal alterations induced by salt loading are even more complex but are not the subject of this study. We conceive the model as a tool with which to study many factors invoked to explain the natriuresis of extracellular volume expansion. Although the bulk of evidence indicates that intrarenal prostaglandins could promote EVE natriuresis (reviewed by Knox & Granger 1992), some data do not agree with this view. For instance, in one early study an inhibition of PG synthesis caused natriuresis in saline-loaded human subjects (Mountokalakis *et al.* 1978). High Na intake has, indeed, been reported to stimulate intrarenal metabolism of arachidonic acid, but the enzymes induced were those of the cytochrome P450 pathway and not PG cyclooxygenase (Capdevila *et al.* 1992).

The major finding of the present study is that in rats preloaded with hypertonic saline PG blockade enhanced the natriuresis of small volume expansion, with no or little increase in GFR and no change in CBF

which approximates total renal blood flow. This was surprising as PGs are known as direct NaCl transport inhibitors (e.g. in the ascending limb of Henle's loop and collecting duct) and can also inhibit the transport indirectly, by increasing MBF, wash-out of medullary solutes, and a decrease in medullary interstitial hypertonicity. This results in less water abstraction out of the descending limb of Henle's loop, increased delivery of a more dilute fluid to the ascending limb and less effective Na reabsorption in this segment (reviewed by Navar *et al.* 1996). In this study PG blockade depressed MBF and increased the ionic component of medullary hypertonicity measured as tissue  $Y$  (Fig. 2), in agreement with our previous findings (Dobrowolski *et al.* 1995, Sadowski *et al.* 1997). Apparently, this potential antinatriuretic action was overruled by a paradoxical inhibition of tubular salt transport.

In summary, systematic studies confirmed our preliminary observations that in salt-loaded rats, moderately hypernatraemic and volume expanded, an additional volume expansion equivalent to only 0.5% body weight triggered a rapid major natriuresis. This was similar with isotonic saline and whole blood, and occurred at widely different baseline  $U_{\text{Na}}V$  values. No natriuresis was observed when a standard small saline volume was administered to euvoletic and normonatraemic rats receiving 0.9% saline infusion, indicating that the status created by hypertonic saline infusion was prerequisite for the exaggerated natriuresis. Surprisingly, the blockade of renal prostaglandins which are presumed to mediate in part the natriuresis of isotonic saline loading enhanced the natriuretic response to a small volume expansion, although a confirmed decrease in MBF and an increase in medullary ionic hypertonicity should favour increased sodium reabsorption. Further studies are required to explore the mechanism of this paradoxical response.

## REFERENCES

- Capdevila, J.H., Wei, S.H., Yan, J. *et al.* 1992. Cytochrome P-450 arachidonic acid epoxygenase. *J Biol Chem* **30**, 21720–21726.
- Dobrowolski, L., Kompanowska-Jeziarska, E. & Sadowski, J. 1995. Modulation of renal medullary hypertonicity by prostaglandins: data from tissue admittance studies in the rat. *J Physiol (Lond)* **458**, 827–834.
- Knox, F.G. & Granger, J.P. 1992. Control of sodium excretion: an integrative approach. In: E.E. Windhager (ed.) *Renal Physiology*, pp. 927–967. Oxford University Press, New York, Oxford.
- Miller, J.A., Tobe, S.W. & Skorecki, K.L. 1996. Control of extracellular fluid volume and the pathophysiology of edema formation. In: B.M. Brenner (ed.) *The Kidney*, pp. 817–840. W.B. Saunders, Philadelphia.



## Rapid Communication

# Prostaglandin E<sub>2</sub> concentrations in rat renal cortical and medullary interstitium: effect of volume expansion and renal perfusion pressure

E. KOMPANOWSKA-JEZIERSKA,<sup>2</sup> T. J. BERNDT<sup>1</sup> and F. G. KNOX<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiology and Biophysics, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

<sup>2</sup> Laboratory of Renal and Body Fluid Physiology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

The modulatory role of prostaglandins (PGs) in the control of renal haemodynamics and excretion is well established, however the mechanisms involved and the role of factors which influence generation of renal PG, metabolites of both cyclooxygenase isoforms, COX-1 and COX-2, are not clear (Knox & Granger 1992, Imig 2000). Most of the relevant information has come from studies exploring the effects of inhibition of PG synthesis and/or involving measurement of PGE<sub>2</sub> excretion in urine. Alterations of renal PG content and excretion were reported from studies in which body fluid volume and sodium status were chronically manipulated by changing sodium content of the diet and from experiments involving acute volume expansion (Seyberth *et al.* 1988). Another factor shown to influence renal PG synthesis was the renal perfusion pressure (RPP) (Gonzalez-Campoy *et al.* 1991). This is important as it has been established that the presence of PG is necessary for full natriuretic response to elevation of RPP, a key event in long-term control of arterial pressure (Garcia *et al.* 1998). In the present work we used microdialysis to determine PGE<sub>2</sub> concentration in the renal cortical and medullary interstitium and simultaneously measured its excretion in the urine during progressive volume expansion with saline, at constant RPP or combined with a reduction of RPP.

Male Sprague–Dawley rats weighing  $322 \pm 9.7$  g were anaesthetized with intraperitoneal injection of  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  Inactin (BYK-Gulden, Konstanz, Germany), and cared for in accordance with the Strasbourg Convention for the protection of vertebrate animals (1985). During experiments, body temperature was maintained at 37 °C. Polyethylene (PE)-50 catheters

were placed in the carotid artery for arterial blood pressure measurement and blood sampling, and in the femoral artery for RPP measurement. Another catheter was placed in the jugular vein for intravenous infusion of a solution containing 1% Inulin (New England Nuclear, Boston, MA, USA) and 6 mM LiCl in isotonic saline, at a rate equivalent to 2% of body wt h<sup>-1</sup>. A PE 90 catheter was placed in the bladder for urine collection. The left kidney was exposed by subcostal incision. Two pieces of PE-10 tubing were first pulled across the cortex and medulla and then used to position two linear microdialysis membranes: 0.5 mm in diameter and 5 mm in length (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, USA), for separate measurement of interstitial cortical and medullary PGE<sub>2</sub> concentration (Pflueger *et al.* 1999). The unavoidable local tissue damage was not serious enough to be reflected by alterations of whole kidney function. The membranes were perfused with phosphate buffer saline (PBS) at a rate of  $3 \mu\text{L min}^{-1}$ . A clamp was placed on the aorta, cranial to the renal arteries, for control of renal perfusion pressure. Following a 60-min stabilization period, two 75-min urine clearance and dialysate samples were taken. Two protocols were used.

*Group I* ( $n = 7$ ). The first 75-min urine and dialysate collection was made at RPP of  $121 \pm 4.2$  mmHg. This was followed by a 30-min interval while the infusion was continued, and a second 75-min collection period at  $119 \pm 3.9$  mmHg.

*Group II* ( $n = 7$ ). The protocol was as in group I except that first collection period was made at RPP of  $130 \pm 2.7$  mmHg, then the pressure was reduced, and 30 min later, the second collection period was taken at  $105 \pm 2.7$  mmHg.

The glomerular filtration rate (GFR) was calculated from the clearance of inulin (determined by the anthrone method). The proximal tubule reabsorption

**Keywords** PGE<sub>2</sub>, renal medulla, renal cortex.

Received 2 April 2001, accepted 3 May 2001

Correspondence: E. Kompanowska-Jeziarska, Laboratory of Renal and Body Fluid Physiology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Pawinskiego 5, PL 02-106 Warsaw, Poland.



## REFERENCES

- Garcia, N.H., Ramsay, C.R. & Knox, F.G. 1998. Understanding the role of paracellular transport in the proximal tubule. *News Physiol Sci* **13**, 38–43.
- Gonzalez-Campoy, J.M., Long, C., Roberts, D., Berndt, T.J., Romero, J.C. & Knox, F.G. 1991. Renal interstitial hydrostatic pressure and PGE<sub>2</sub> in pressure natriuresis. *Am J Physiol* **260**, F643–F649.
- Imig, J.D. 2000. Eicosanoid regulation of the renal vasculature. *Am J Physiol* **279**, F965–F981.
- Knox, F.G. & Granger, J.P. 1992. Control of sodium excretion: an integrative approach. In: E.E. Windhager (ed.) *Renal Physiology*, pp. 927–967. Oxford University Press, Oxford.
- Pflueger, A.C., Gross, J.M. & Knox, F.G. 1999. Adenosine-induced renal vasoconstriction in diabetes mellitus rats: role of prostaglandins. *Am J Physiol* **277**, R1410–R1417.
- Roman, R.J. & Lianos, E. 1990. Influence of prostaglandins on papillary blood flow and pressure-natriuretic response. *Hypertension Dallas* **15**, 29–35.
- Seyberth, H.W., Tullassay, T., Kuhl, G.P., Soeding, K., Rascher, W. & Shweert, H. 1988. Excretion of primary prostanoids and their metabolites during acute volume expansion. *Prostaglandins* **35**, 221–232.
- Siragy, H.M., Mohsen, I., Jaffa, A.A., Mayfield, R. & Margolius, H.S. 1994. Rat renal bradykinin, prostaglandin E<sub>2</sub>, and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate. Effects of altered sodium intake. *Hypertension* **23**, 1068–1070.



## Role of prostaglandin cyclooxygenase and cytochrome P450 pathways in the mechanism of natriuresis which follows hypertonic saline infusion in the rat

E. Kompanowska-Jezierska, A. Walkowska and J. Sadowski

Laboratory of Renal and Body Fluid Physiology, M. Mossakowski Medical Research Centre of the Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

Received 22 April 2002,  
accepted 18 September 2002

Correspondence:

Dr E. Kompanowska-Jezierska,  
Laboratory of Renal Physiology,  
Medical Research Centre, Polish  
Academy of Sciences, Pawińskiego  
5, 02-106 Warsaw, Poland.

### Abstract

**Aim:** The prostaglandin cyclooxygenase (COX) and P450 cytochrome (CYP450) pathways of arachidonic acid metabolism are functionally inter-related and both engaged in control of sodium excretion; the study focused on their contribution to the natriuresis which follows hypertonic saline infusion in the rat.

**Methods:** In anaesthetized rats, clearance studies were conducted, supplemented with laser-Doppler measurements of the cortical and medullary blood flow (CBF, MBF), and measurement of medullary tissue admittance (Y), an index of interstitial ion concentration.

**Results:** Indomethacin (Indo), 5 mg kg<sup>-1</sup> i.v. paradoxically enhanced the natriuresis secondary to intra-aortic suprarenal 5% saline load, further increasing sodium excretion by 385 ± 73% (*P* < 0.01). After acute clotrimazole, 10 mg kg<sup>-1</sup> i.v. an inhibitor of CYP450 epoxygenase, the increase in natriuresis was smaller and did not differ from that observed after the drug's ethanol solvent. In rats pre-treated with clotrimazole for 3 days, hypertonic saline loading increased sodium excretion (U<sub>Na</sub>V) to 0.94 ± 0.22 μmol min<sup>-1</sup>, compared with a significantly greater (*P* < 0.05) increase to 2.76 ± 0.48 μmol min<sup>-1</sup> measured in untreated controls. Indo increased U<sub>Na</sub>V twofold, similarly in the clotrimazole and in the control group; in the absence or presence of clotrimazole treatment, COX blockade significantly decreased MBF and increased Y.

**Conclusion:** The data indicate that blockade of the CYP450 epoxygenase significantly impairs excretion of sodium in rats acutely loaded with hypertonic NaCl solution. The paradoxical post-Indo natriuresis is preserved in clotrimazole treated rats, which speaks against the role of CYP450 pathway in the response.

**Keywords** clotrimazole, hypertonic saline, indomethacin, intrarenal circulation, sodium excretion.

In a recent study, we showed that in rats acutely loaded with salt, inhibition of prostaglandin (PG) cyclooxygenase (COX) resulted in paradoxical natriuresis, in contrast to antidiuresis and antinatriuresis usually observed at standard conditions (Kompanowska-Jezierska *et al.* 1999). It should be considered that the ultimate effect of

COX blockade may not simply depend on elimination of direct vascular and/or tubular effects of PGs. It is known that the three main pathways of arachidonic acid metabolism: those of COX, cytochrome P450 (CYP450) epoxygenase and hydroxylase, and lipoxigenase, show interaction. CYP450 metabolites may be further



to all ions and to  $\text{Na}^+$  concentration in the extracellular compartment.

### Experimental procedures

Directly after insertion of the Y/MBF measuring set, the infusion of albumin in Ringer solution was replaced by an infusion which delivered  $6 \mu\text{Ci}$  of [methoxy- $^3\text{H}$ ] inulin in 1.2 mL of isotonic saline solution per hour, preceded by a priming dose of  $6 \mu\text{Ci}$ . Simultaneously, a suprarenal aortic infusion of isotonic saline at  $2 \text{ mL h}^{-1}$  was started. After two 30-min control periods this infusion was replaced by an infusion of 5% saline.

**Protocol I.** After an 1.5-h of suprarenal aortic infusion of 5% saline at  $2 \text{ mL h}^{-1}$  (three urine collection periods), indomethacin (Sigma) or clotrimazole (1-[*o*-chlorotriyl]-imidazole, Sigma) or their respective solvents were infused i.v. during 5 min and one or two post-infusion clearance periods were made. Eight rats were used in each group. Indomethacin,  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  body weight, was dissolved in 1.5 mL alkalized isotonic saline. Clotrimazole, an inhibitor of cytochrome P450 epoxygenase, was given in the dose of  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  body weight, dissolved in 1.5 mL of 25% ethanol. In this group, after post-clotrimazole urine collection indomethacin was given in the usual way, and one or two additional clearance periods were made. In two additional groups of eight rats each, effects of 1.5 mL of alkalized saline (the vehicle for indomethacin) or of 25% ethanol (the vehicle for clotrimazole) were examined. In all groups 5% saline infusion was continued during the injections and in post-injection periods.

**Protocol II.** Three groups, eight rats in each, were studied. In two groups rats were pre-treated either with clotrimazole,  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  body weight per day injected i.p. as a suspension in linseed oil, on 3 days preceding the proper experiment, or pre-treated with the oil solvent alone. The dosage was earlier found to suppress P450 epoxygenase activity in kidney microsomes (Makita et al. 1994). The third group served as an additional untreated control. In each group rats received indomethacin after 1.5 h of intra-aortic 5% saline infusion.

After experiments the rats were killed with an overdose of the anaesthetic. The position of the Y electrode tip (deep in the inner medulla) and of the tip of the laser-Doppler probe (close to the border with the outer medulla) was verified at the kidney's cross-section.

### Analytical procedures

Urine volumes were determined gravimetrically. Plasma and urine tritiated inulin activities were measured in an LKB 1211 liquid scintillation counter (Sweden) and the

glomerular filtration rate (GFR) was determined as the clearance of  $^3\text{H}$  inulin ( $C_{\text{in}}$ ). Osmolalities were measured using a vapour pressure osmometer (Wescor 5500, Logan, Utah, USA) and sodium concentration by an ion selective electrode analyser (Analyser Industries, Dreischor, The Netherlands).

### Statistics

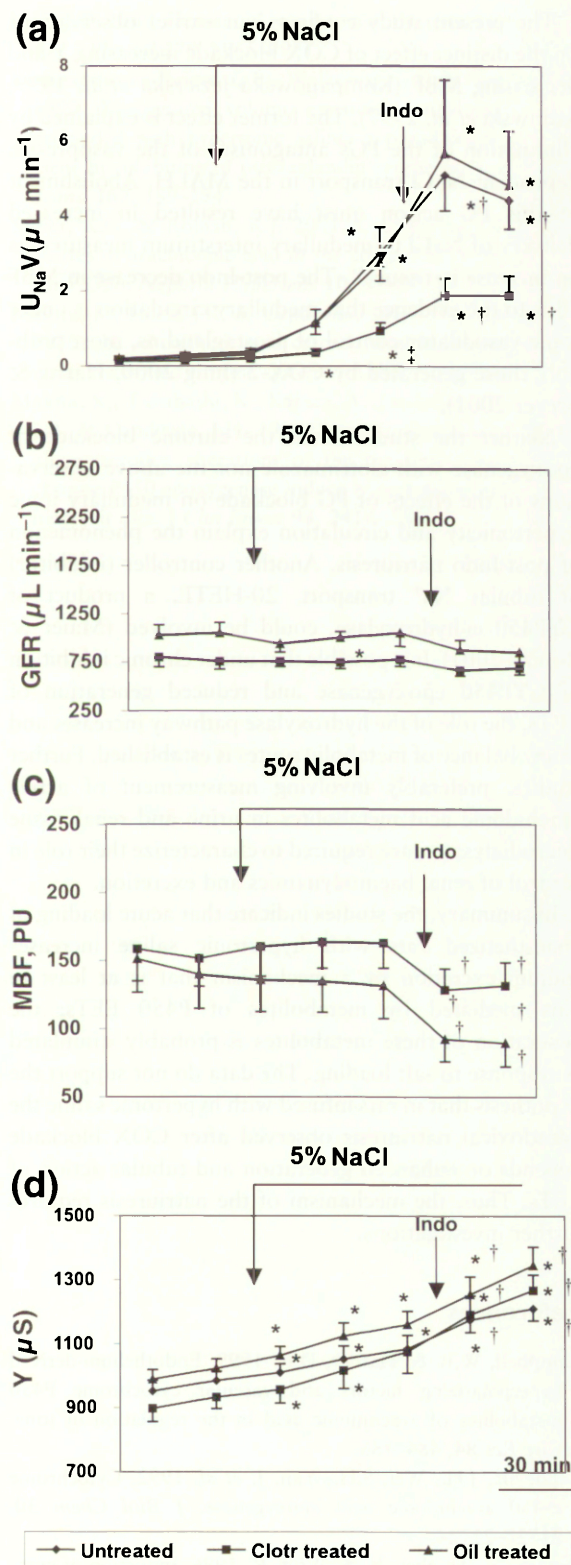
The significance of changes within one group over time was first evaluated by repeat measurement analysis of variance (ANOVA), followed by Student's test for dependent variables. Differences in mean values between groups were first analysed by one-way ANOVA followed by a modified Student's *t*-test for independent variables, using Bonferroni's correction for multiple comparisons. The standard error of mean (SEM) was used as the measure of data dispersion.

### Results

The RPP was maintained constant at 110–120 mmHg in all experimental groups. After 1 h of isotonic saline infusion at  $2 \text{ mL h}^{-1}$  the infusate was replaced by 5% saline given at the same rate. Such infusion increased plasma  $\text{Na}^+$  concentration 10–13 mM. Mean  $U_{\text{Na}}V$  increased in individual groups from the isotonic saline baseline of  $0.35\text{--}0.61 \mu\text{mol min}^{-1}$  (range of means) to  $1.97\text{--}2.12 \mu\text{mol}$  after 1.5 h of hypertonic saline. The respective changes in  $V$  were from  $3.6\text{--}6.0$  to  $12.0\text{--}14.7 \mu\text{L min}^{-1}$ . All these increments were significant at the 0.05 level or less. CBF, MBF and GFR did not change. The medullary interstitial ion concentration (mean tissue  $Y$ ) increased from 851–1010 to 969–1050  $\mu\text{S}$  (significant at  $P < 0.05$ ).

Per cent changes in renal function in response to indomethacin and clotrimazole in rats pre-loaded with 5% saline are shown in Figure 1. After Indo,  $U_{\text{Na}}V$  increased almost fivefold, compared with a twofold change seen after the vehicle. Clotrimazole induced a threefold increase in  $U_{\text{Na}}V$ , compared with more than a twofold increase after ethanol vehicle. Remarkably, the difference in the response between the drug and the vehicle was significant for Indo but not for clotrimazole. Between-group comparison showed that the increase in  $U_{\text{Na}}V$  after Indo was significantly greater than that after clotrimazole. The pattern of changes in  $V$  was similar as in  $U_{\text{Na}}V$ , except that the increases after the drugs were smaller and the between-group difference between the responses to Indo and to clotrimazole was not significant. Clotrimazole did not substantially affect medullary tissue admittance, in contrast to a major increase after Indo. This change was significantly greater than that after Indo vehicle, clotrimazole or clotrimazole vehicle. There was a major decrease in MBF after Indo,





**Figure 2** Sodium excretion ( $U_{Na}V$ ) (a), glomerular filtration rate (GFR) (b), medullary blood flow (MBF, perfusion units) (c) and medullary tissue admittance ( $Y$ ,  $\mu\text{Siemens}$ ) (d) as affected by 5% saline infusion and subsequent administration of indomethacin (Indo,  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.v.). Three groups were studied: untreated, clotrimazole treated, and oil (clotrimazole vehicle) treated rats (Protocol II). 5% saline was infused at  $2 \text{ mL h}^{-1}$ . The data are mean  $\pm$  SEM. \*Significantly different from isotonic saline control at  $P < 0.05$ ; †different from the pre-Indo value at  $P < 0.05$ ; ‡different from the mean increase from control in oil-treated rats.

further after blockade of COX with indomethacin or meclophenamate (Kompanowska-Jezierska *et al.* 1999). The present study was aimed to examine the role of another route of arachidonic acid metabolism, the CYP450 pathway, in control of natriuresis secondary to hypertonic saline infusion. We also attempted to find out if the natriuretic effect of COX blockade performed on the background of hypertonic saline infusion could be because of interaction of COX and CYP450 pathways.

What were the consequences of hypertonic saline infusion for intrarenal metabolism of arachidonic acid which could form a basis for the unusual renal response to PG blockade? This metabolism is known to be enhanced by high salt intake, however, it appears that the activation does not involve PG COX and the renal medullary activity of natriuretic  $\text{PGE}_2$  may actually decrease when salt balance is positive (Rathaus *et al.* 1987). On the other hand, the metabolism along the P450 pathway is greatly enhanced (Capdevila *et al.* 1992), of particular importance is stimulation of P450 epoxygenase whose activity increased to 400% of control. Recently, chronic saline loading was shown to greatly increase renal cortical and medullary epoxygenase activity whereas the activity of P450  $\omega$ -hydroxylase was reduced, at least in the cortex (Oyekan *et al.* 1999). Thus, a major activation of the former enzyme can also be expected in the rats acutely loaded with hypertonic saline. The epoxygenase products, EETs, are known as inhibitors of proximal and distal tubular  $\text{Na}^+$  transport (Makita *et al.* 1996) and it is not unlikely that the natriuresis associated with hypertonic saline loading is mediated in part by these metabolites.

We wanted to find out if high EETs synthesis resulting probably from  $\text{NaCl}$  loading would be further enhanced by subsequent inhibition of COX, leading to the post-Indo natriuresis observed in this study (Fig. 1). COX blockade may increase the synthesis of the metabolites of the CYP450 pathway by eliminating its PG modulatory inhibitor or, alternatively, because of a diversion of some of the COX substrate to the CYP450 pathway (McGiff 1991). Indeed, inhibition of COX was reported to induce bacterial P450 cytochrome (English *et al.* 1996).

well known responses to two experimental interventions. First, in so pre-loaded rats a very small volume expansion triggered a disproportionate natriuresis and diuresis. Second, the natriuresis paradoxically increased



- Imig, J.D. 2000. Eicosanoid regulation of the renal vasculature. *Am J Physiol* 279, F965–F981.
- Kompanowska-Jezierska, E., Walkowska, A. & Sadowski, J. 1999. Exaggerated volume expansion natriuresis in rats preloaded with hypertonic saline: a paradoxical enhancement by inhibition of prostaglandin synthesis. *Acta Physiol Scand* 167, 189–194.
- Maier, K.G. & Roman, R.J. 2001. Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the control of renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10, 81–87.
- Makita, K., Falck, J.R. & Capdevila, J.H. 1996. Cytochrome P450, the arachidonic acid cascade, and hypertension: new vistas for an old enzyme system. *FASEB* 10, 1456–1463.
- Makita, K., Takahashi, K., Karara, A., Jacobson, H.R., Falck, J.R. & Capdevila, J.H. 1994. Experimental and/or genetically controlled alterations of the renal microsomal cytochrome P450 epoxygenase induce hypertension in rats fed a high salt diet. *J Clin Invest* 94, 2414–2420.
- McGiff, J.C. 1991. Cytochrome P-450 metabolism of arachidonic acid. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 31, 339–369.
- Oyekan, A.O., Youseff, T., Fulton, D., Quilley, J. & McGiff, J.C. 1999. Renal cytochrome P450  $\omega$ -hydroxylase and epoxygenase activity are differentially modified by nitric oxide and sodium chloride. *J Clin Invest* 104, 1131–1137.
- Rathaus, M., Podjarny, E., Shapira, J., Kariv, N. & Bernheim, J. 1987. Effects of sodium loading on the renal synthesis of prostanoids in the rat. *Clin Sci* 73, 653–657.
- Sadowski, J., Kompanowska-Jezierska, E., Dobrowolski, L., Walkowska, A. & Badzyska, B. 1997. Simultaneous recording of tissue ion content and blood flow in rat renal medulla: evidence on interdependence. *Am J Physiol* 273, F658–F662.
- Sadowski, J. & Portalska, E. 1983. Dynamic evaluation of renal electrolyte gradient by *in situ* tissue impedance studies. *Kidney Int* 24, 800–803.