

Effect of ACTH (0.25 and 0.50 IU/0.2 ml 0.9% saline; i.p.) on testes of the immature rat. In each case 5 animals were used, mean $\pm$ SE

	Weight of testes (mg)	Seminiferous tubular diameter (nm) (10)	Leydig cell count (20)	Leydig cell nuclear diameter (nm) (10)	Gametogenic count/6.405 Sertoli cells Spg	R-Sp-Cyt	Pachytene	Sertoli cells
Control (A)	227.25 $\pm$ 0.35	184.20 $\pm$ 4.82	7.23 $\pm$ 1.02	4.09 $\pm$ 0.22	10.84 $\pm$ 0.42	25.75 $\pm$ 3.37	29.62 $\pm$ 0.55	6.40 $\pm$ 0.78
ACTH (0.25 IU) (B)	220.05 $\pm$ 0.24	182.40 $\pm$ 3.63	7.05 $\pm$ 1.02	6.77 $\pm$ 0.24*	10.29 $\pm$ 1.33	9.99 $\pm$ 0.16*	13.79 $\pm$ 1.70*	4.50 $\pm$ 0.31*
	NS	NS	NS		NS			
ACTH (0.50 IU) (C)	137.60 $\pm$ 2.09*	110.40 $\pm$ 2.99*	3.35 $\pm$ 0.80*	1.95 $\pm$ 0.22*	3.66 $\pm$ 0.71*	7.84 $\pm$ 0.17*	11.97 $\pm$ 0.23*	3.00 $\pm$ 1.25*

Histological observation are in parenthesis; NS, not significant: * $p < 0.001$.

cytes can be noted (figure 3). Leydig cells are atrophic and granulated. In group B (figure 2) the diameter of the seminiferous tubules is not changed and cellular degeneration is less conspicuous than group C.

The present study indicates an effect of ACTH on the cytomorphology of testes of immature rat. It is well documented that adrenal and testes have a very close relation, due to the same embryological origin⁷. During immature stage, the presence of FSH stimulates the early stages of development of the germ cell (spermatogonia and spermatocytes) and Sertoli cell differentiation⁸. Rudimentary Leydig cells in the immature rats are not capable of synthesizing androgen, as the testosterone concentration in the blood and the testes is not adequate⁹. Our results clearly indicate that cellular regression of testes completely depends on dosages of ACTH, because higher doses of ACTH (0.50 IU) cause significant decrease in testicular weight, seminiferous tubular diameter, Leydig cell nuclear count and Leydig cell nuclear diameter. Moreover gametogenic cellular inhibitions are very significant in the gametogenic count. Inhibition of testicular steroidogenesis by ACTH administration has also been reported. It is well known that crowding and aggressive interactions between males can delay puberty and suppress gonadal activity under both natural and experimental conditions, and these phenomena are thought to be mediated through the activation of pituitary gonadal axis¹¹.

In view of our findings, it could be stated that supplementation of ACTH (0.25 and 0.50 IU causes increased production of cortical steroid including testosterone, which may

lead to a suppression of pituitary FSH, and as a result atrophy of the testes and degeneration of the seminiferous tubules become very prominent. It is further observed from the present results that significant regression of the Sertoli cell count may be due to FSH inhibition by ACTH supplementation. Therefore, it seems possible that ACTH has a role in inhibiting gametogenic growth through the pituitary during immature stages.

- 1 This work is supported by CSIR, Project No. JRF 37. We thank Md. K. Doughty for photomicrography.
- 2 Defence Research Development and Establishment, Gwalior-474002 (India).
- 3 A. R. Chowdhury and A. K. Chatterjee, Indian. J. exp. Biol. 16, 88 (1978).
- 4 R. M. Lipton and J. I. Raeside, J. Endocr. 42, 33 (1968).
- 5 V. C. Stevens and J. W. Goldzieher, Pediatrics 41, 421 (1968).
- 6 Y. Clermont and B. Percy, Am. J. Anat. 100, 241 (1957).
- 7 J. J. Christian, J. A. Lyod and D. E. Davis, Recent. Prog. Horm. Res. 21, 501 (1965).
- 8 W. P. Odell and R. S. Swerdloff, J. Steroid Biochem. 6, 853 (1975).
- 9 W. H. Moger and D. T. Armstrong, Can. J. Biochem. 52, 744 (1974).
- 10 I. Z. Beitins, F. Bayard, A. Kowarski and C. J. Migeon, Steroids 21, 553 (1973).
- 11 J. N. Pasley and J. J. Christian, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 139, 921 (1972).
- 12 P. Docrr and K. M. Pirke, J. clin. Endocr. Metab. 43, 622 (1976).

Etude des variations nycthémerales de la filtration glomérulaire chez le rat

Diurnal variations evidence of glomerular filtration in the rat

J. Cambar¹, F. Lemoigne et Ch. Toussaint

Laboratoire de Physiologie, U.E.R. de Pharmacie, 91, rue Leyteire, F-33000 Bordeaux (France); et Laboratoires de Biochimie et Pharmacodynamie, U.E.R. de Pharmacie, 91, rue Leyteire, F-33000 Bordeaux (France), 20 mars 1979

Summary. Parallel variations in plasma and urine variations of endogenous urea and creatinine level in the rat during 4 consecutive 6-h-long periods permit to evidence urea and creatinine clearance diurnal variations with very significant increase in the 2 nightly periods. The signification of this very large nightly glomerular filtration increase is discussed.

Nous avons récemment montré l'existence de variations nycthémerales de l'excrétion urinaire des protéines totales chez le rat, en particulier une nette augmentation nocturne de cette excrétion². De prudentes hypothèses de tendance explicative ont été avancées faisant intervenir l'influence éventuelle de certains facteurs à prépondérance nocturne, tels que le comportement alimentaire rythmé, la vasodilatation postprandiale, les variations circadiennes des fonctions

rénales, récemment revues chez l'homme³, ou encore le taux de certaines hormones. Plus récemment, nous avons décelé, pour la première fois à notre connaissance chez le rat, des variations circadiennes du taux sérique et urinaire de l'urée, de la créatinine et des protéines totales⁴. Sur de telles bases, nous avons analysé le rôle éventuellement exercé par le rein, précisément par le glomérule, sur les variations nycthémerales de la protéinurie physiologi-

Tableau 1. Variations nycthémerales de la clairance de l'urée endogène chez le rat pendant 4 périodes consécutives de 6 h. * $p < 0,1$; ** $p < 0,02$ entre chaque période nocturne et la moyenne des 2 périodes diurnes, 1,82 ml/6 h et 0,503 ml/min

Période	8.00–14.00 h	14.00–20.00 h	20.00–2.00 h	2.00–8.00 h
Concentration plasmatique (mg/ml)	0,372 ($\pm 0,045$)	0,337 ($\pm 0,061$)	0,388 ($\pm 0,038$)	0,331 ($\pm 0,060$)
Concentration urinaire (mg/ml)	36,43 ($\pm 1,27$)	34,12 ($\pm 2,01$)	37,93 ($\pm 1,72$)	36,36 ($\pm 3,59$)
Volume urinaire (ml/6 h)	1,86 ($\pm 0,45$)	1,78 ($\pm 0,16$)	2,43 ($\pm 0,94$)*	2,50 ($\pm 0,47$)*
$C = U \times V/P$ (ml/min)	0,506 ($\pm 0,107$)	0,500 ($\pm 0,059$)	0,661 ($\pm 0,131$)**	0,764 ($\pm 0,225$)**

Tableau 2. Variations nycthémerales de la clairance de la créatinine endogène chez le rat, pendant 4 périodes consécutives de 6 h. * $p < 0,1$; *** $p < 0,001$ entre chaque période nocturne et la moyenne des 2 périodes diurnes, 1,82 ml/6 h et 1,095 ml/min

Période	8.00–14.00 h	14.00–20.00 h	20.00–2.00 h	2.00–8.00 h
Concentration plasmatique (mg/l)	4,50 ($\pm 0,36$)	4,125 ($\pm 0,53$)	3,98 ($\pm 0,35$)	3,95 ($\pm 0,46$)
Concentration urinaire (mg/ml)	0,978 ($\pm 0,095$)	0,90 ($\pm 0,075$)	1,02 ($\pm 0,180$)	0,862 ($\pm 0,173$)
Volume urinaire (ml/6 h)	1,86 ($\pm 0,45$)	1,78 ($\pm 0,16$)	2,43 ($\pm 0,94$)*	2,50 ($\pm 0,47$)*
$C = U \times V/P$ (ml/min)	1,12 ($\pm 0,149$)	1,07 ($\pm 0,044$)	1,73 ($\pm 0,274$)***	1,51 ($\pm 0,210$)***

que. Dans ce but, nous avons recherché les fluctuations parallèles du taux plasmatique et urinaire de l'urée et de la créatinine, afin de pouvoir évaluer leur clairance sur les mêmes animaux en expérience. Car, il est classiquement admis que la valeur de la clairance de la créatinine ou de l'urée endogènes doit nous renseigner sur l'intensité du fonctionnement rénal, et notamment de la filtration glomérulaire⁵ que nous nous proposons d'étudier pendant 4 périodes consécutives du nycthémer.

Matériel et méthodes. 40 rats mâles, de souche Wistar, pesant 250 ± 25 g, sont placés, individuellement, dans des cages à métabolisme quelques jours avant le début de la collecte des urines. Dans l'animalerie du laboratoire, la température est maintenue entre 20 et 23°C, la pression atmosphérique est de 750–770 mm de Hg et l'hygrométrie constante. L'animalerie est à éclairage naturel. Les expériences ont été réalisées en mai–juin 1978. Les animaux reçoivent nourriture et boisson ad libitum.

Les urines sont collectées pendant 4 périodes consécutives de 6 h chacune, soit de 08.00 h à 14.00 h, de 14.00 h à 20.00 h, de 20.00 h à 02.00 h, enfin de 02.00 h à 08.00 h. 1 ml environ de sang veineux est prélevé dès la fin de la collecte des urines (donc à 14.00 h, 20.00 h, 02.00 h et 08.00 h) au niveau du sinus rétroorbitaire de l'œil avec une pipette Pasteur contenant quelques microlitres de sérum physiologique hépariné.

Les échantillons de sang et d'urine sont soumis au dosage automatique de l'urée (méthode à la diacétylmonoxime) et de la créatinine (réaction de Jaffee) par l'appareil SMA 6 Microlyser-Technicon.

Pour chaque animal est calculée la clairance de l'urée et de la créatinine selon la formule classique $C = U \times V/P$, dans laquelle U et P sont respectivement les concentrations urinaires et plasmatiques (de l'urée et de la créatinine) et V le volume urinaire émis par min. Pour chaque clairance, la valeur moyenne et l'écart-type à la moyenne sont calculés. Les résultats sont ensuite traités par la méthode statistique selon le test de Student.

Résultats. Comme le montrent les tableaux 1 et 2, les concentrations plasmatiques de l'urée et de la créatinine varient légèrement pendant le nycthémer. On observe 2 maxima, vers 14.00 h et 02.00 h pour l'urée et vers 14.00 h et 20.00 h pour la créatinine. Au contraire, les concentrations urinaires sont d'une remarquable constance pendant tout le nycthémer. Le volume urinaire émis pendant 6 h augmente significativement ($p < 0,1$) pendant les 2 périodes nocturnes.

Ainsi, la clairance de l'urée est accrue de manière significative ($p < 0,02$) pendant les 2 périodes nocturnes (+31 et +51%) par comparaison avec les 2 périodes diurnes, de valeur très voisine. De même, la clairance de la créatinine augmente de manière très significative ($p < 0,001$), pendant les deux périodes nocturnes (+58 et +38%), si nous les comparons avec les 2 périodes diurnes, de valeur très voisine.

Discussion. L'étude conjointe des taux plasmatiques et urinaires de l'urée et de la créatinine pendant 4 périodes consécutives de 6 h nous permet de mettre en évidence, pour la première fois semble-t-il chez le rat, de significatives variations circadiennes de la clairance de l'urée et de la créatinine et par là même de la filtration glomérulaire, comme des travaux déjà anciens^{6–9} l'avaient déjà montré chez l'homme.

La méthode de détermination de la filtration glomérulaire que nous avons choisie quoique ne permettant qu'une évaluation relativement approximative de la fonction de filtration rénale, présente en physiologie et en pathologie rénales divers avantages: sa facile mise en œuvre, sa pratique chez des animaux éveillés et sa relative innocuité qui permet son utilisation répétée chez le même animal. La collecte des urines au bas des cages à métabolisme spéciales ne pose aucun problème. La méthode de prélèvement sanguin au niveau du sinus rétro-orbitaire de l'œil nous paraît satisfaisante permettant l'obtention d'un volume sanguin suffisant, que l'on peut recueillir plusieurs fois par semaine chez le même animal, et n'entraîne ni traumatisme ni risque d'infection pour l'animal. Toutefois, elle ne peut être pratiquée, à notre avis, qu'à la fin de la période de collecte des urines (et non au milieu) vues les conditions particulières du prélèvement et des conséquences sur l'hémodynamique systémique et rénale.

Les importantes variations nycthémerales de la diurèse paraissent être en partie déterminées par celles de la filtration glomérulaire. On peut, en effet, concevoir que sous l'influence de facteurs hémodynamiques, tels que la vasodilatation postprandiale ou l'augmentation du taux circulant de certaines hormones vasoactives¹⁰, le flux volumique transglomérulaire nocturne devienne plus intense. La relative constance de la concentration urinaire de l'urée et de la créatinine est liée à leur concentration dans l'ultrafiltrat glomérulaire, lesquelles, pour des substances ultrafiltrables, sont voisines de celles du plasma circulant, fort constantes également. Puisque la qualité de l'ultrafiltrat est relativement constante, c'est l'augmentation noc-

turne de la quantité filtrée qui accroît le flux transglomérulaire des substances dissoutes et explique, en partie du moins, la nette augmentation de l'excrétion urinaire par unité de temps de l'eau et des solutés. Ces variations circadiennes de la filtration glomérulaire sont à rapprocher de celles de l'excrétion urinaire de l'eau, des électrolytes et des protéines^{2,10,11}. L'injection d'une substance vasodilatatrice, comme la théophylline, qui entraîne une augmenta-

tion de la filtration glomérulaire, s'accompagne également d'un accroissement de l'excrétion de l'eau, des électrolytes et des solutés¹². Toutefois, l'exactitude de ces conceptions ne pourra être définitivement assurée que par des expériences de microponction capsulaire et tubulaire, qui montreront les relations existantes entre les variations circadiennes de la composition de l'ultrafiltrat et celles de l'urine définitive.

- 1 Les demandes de tirés-à-part doivent être faites à J.C., Lab. de Physiologie, U.E.R. de Pharmacie, 91, rue Leyteire, F-33000 Bordeaux.
- 2 J. Cambar, Ch. Toussaint et C. Nguyen Ba, C.r. Soc. Biol. 172, 103 (1978).
- 3 D.P. Mertz, Fortschr. Med. 94, 1546 (1976).
- 4 J. Cambar, F. Lemoigne, Ch. Toussaint et J. Canellas, Journées de l'Association des Physiologistes, Nancy, Décembre 1978.
- 5 N.G. Levinsky et M. Levy, dans: Handbook of Physiology, p. 103. Ed. Am. physiol. Soc. 1973.
- 6 H. Popper et J. Brod, Z. klin. Med. 134, 196 (1938).
- 7 J.H. Sirota, D.S. Baldwin et H. Villareal, J. clin. Invest. 29, 187 (1950).
- 8 T. Addis, E. Barrett, J. Pool, H.J. Ureen et R.W. Lippman, J. clin. Invest. 30, 206 (1951).
- 9 L.G. Wesson, Jr, et D.P. Lauer, J. clin. Invest. 40, 1967 (1961).
- 10 M. Hilfenhaus, Archs Toxic. 36, 305 (1976).
- 11 C. Cohn, L. Webb et D. Joseph, Life Sci. 9, 803 (1970).
- 12 J. Cambar, Thèse, Univ. Bordeaux II, 1976.

Acute stress reduces the sensitivity of the vasculature to sympathetic control¹

R. Rapoport and J.A. Bevan

Department of Pharmacology, UCLA School of Medicine, Center for Health Sciences, Los Angeles (California 90024, USA), 16 February 1979

Summary. Vascular smooth muscle from rabbits subjected to acute severe stress exhibits decreased sensitivity to sympathetic regulation. Stimulation of the sympathetic innervation of isolated vascular segments resulted in a similar subsensitivity as did exposure to norepinephrine (NE) but not histamine. Periodic contraction of these segments caused an increase in their maximum ability to contract independent of the constrictor procedure used. These results suggest that the increase in sympathetically mediated NE release that occurs in stress and some other pathological conditions may result in a blunting of neural control and possibly resistance to certain therapeutic agents.

One of the immediate physiological responses to stress is an increased activity of the sympathetic nervous system². Increased levels of sympathetic tone revealed by elevated levels of circulating norepinephrine have been shown to occur in animals after short-term immobilization, handling, exercise and cold exposure³. Increased efferent sympathetic activity also occurs in acute heart failure⁴, asthma⁵, and shock⁶. We present evidence in this paper that acute stress results in subsensitivity of the vasculature to sympathetic control, in part at any rate, due to an increase in sympathetic neural discharge. This may be a phenomenon of some medical import, related to the decreased reactivity and resistance to certain therapeutic sympathetic agents observed in heart failure⁷, asthma⁸ and shock⁹.

The level of sympathetic efferent discharge immediately prior to death varies with the mode of sacrifice. We hypothesized that the consequences of such differences may be reflected in the sensitivity to sympathetic activation of blood vessels subsequently removed and studied *in vitro*. To test this idea, blood vessels were removed from rabbits sacrificed by exsanguination, when there is a large increase¹⁰, or by injection of pentobarbital, when there is a decrease in sympathetic tone¹¹.

In order to investigate whether the level of sympathetic activity, per se, could be responsible for alteration in sensitivity of the vascular smooth muscle - the influence of sympathetic nerve stimulation *in vitro* on the subsequent response of ear arteries to NE was examined. The possibility that NE was responsible for any of the observed sensitivity change was investigated by determining the influence of NE exposure *in vitro* on subsequent NE responsiveness.

Materials and methods. Rabbits were sacrificed either by stunning followed by rapid exsanguination or by i.p. injection of anesthetic or lethal doses of pentobarbital (approximately 50 and 150 mg/kg, respectively). 4 mm ear artery ring segments were removed rapidly and mounted in tissue baths at 1715 dynes resting tension, which is optimal for both groups of arteries. The method has been previously described¹². From cumulative concentration-response curves determined in the presence of desmethylinipramine (DMI 10^{-7} M), the NE EC_{50} s were calculated. In order to investigate the influence of nerve stimulation on vascular sensitivity, nerve terminals in the wall of isolated ear artery segments from exsanguinated animals were selectively field stimulated for 8 periods of 2 min each over a period of 2.5 h (stimulus pulse duration 0.3 msec, frequency 16 Hz, supramaximal voltage). The size and duration of the contractile responses to transmural nerve stimulation (TNS) were matched in paired segments by contractions elicited by periodic additions of histamine (approximately 2×10^{-6} M). Additional control segments were allowed to remain unchallenged throughout the 2.5 h pretreatment period. In order to investigate the effect of prior NE exposure on subsequent NE sensitivity, segments were exposed to NE (10^{-6} M) for 8 periods of 5 min each over a period of 2.5 h. As described above, in paired segments the NE responses were matched with histamine (approximately 5×10^{-6} M). In a separate series of experiments, the NE sensitivities of segments pretreated with NE were compared to those of unchallenged controls.

All vessels were washed repeatedly. Responses to NE in the presence of DMI (10^{-7} M), and desoxycorticosterone