

Diss. ETH Nr. 10972

**Renal Physiology and Aluminum Biokinetics:
Studies in Laboratory Rats and Human Subjects**

INAUGURAL DISSERTATION

submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY

ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by

SOLOMON FRANCIS AMEVOR

Dipl. Chem., University of Zurich

born 18 January 1961

citizen of Illnau-Effretikon ZH

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. C. Schlatter, Examiner

Prof. Dr. H. Krueger, Co-examiner

Zurich 1995

III. SUMMARY

The mechanisms of renal aluminum (Al) handling and excretion are poorly understood. Due to difficulties in defining glomerular ultrafilterability of Al there are few studies on the tubular processes involved. The major problems in Al trace analysis of biological materials are analyte contamination, due to natural ubiquity of Al, and lack of a tracer isotope with a half-life amenable to traditional tracer studies. The primary aim of this research project was to elucidate the factors affecting the handling and excretion of Al, by the healthy mammalian kidney, through studies in human subjects and laboratory rats. Further objectives included elucidation of mechanisms and sites of renal Al transfer, and investigation of the biokinetics of physiological levels of Al. To overcome the above analytical problems, stable ^{27}Al studies (atomic absorption spectrometry, AAS) were complemented with ^{26}Al data (accelerator mass spectrometry, AMS). AMS counts the atoms rather than their decay. We hoped to gain insights into how the Al body burden is affected by dietary factors under physiological conditions. Such mechanistic insights would contribute to basic understanding of Al toxicity.

Experimental work during this project was divided into three parts. The first part involved studies in six healthy human subjects using ^{27}Al . Renal Al excretion was studied in these subjects under various conditions, including water diuresis with or without oral citrate. One subject was given oral Al hydroxide together with citrate, and renal Al excretion and plasma Al kinetics were investigated. The results showed a water diuresis-associated increase in renal Al excretion. This increase in Al excretion was reduced when citrate was administered in water diuresis. Plasma Al kinetics were sensitive to Al loading and oral citrate administration. Following oral citrate administration, plasma Al levels surged, but quickly returned to normal levels. This suggests that Al was mobilized from tissue deposits and redistributed by citrate.

Two studies, involving s.c. administration ^{26}Al with osmotic pumps, were performed in rats. In the first study, the effects of subchronic oral citrate exposure on renal Al excretion and tissue distribution were investigated in adult male Sprague-Dawley (SD) rats. All nine rats (three groups, $n = 3$) received ^{26}Al ($0.3 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ body wt} \cdot \text{day}^{-1}$, 28 days), standard laboratory feed *ad libitum* and were placed once weekly in metabolism cages for 24 h. Controls (CTL) and the citric acid group (CAG) had free access to water. Treatment groups received equivalent doses of citrate as Na citrate (NaCD , $420 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

body wt · day⁻¹) in drinking water or citric acid (300 mg · kg⁻¹ body wt · day⁻¹) by gavage. Plasma, urine, kidney and liver were assayed for ²⁶Al by AMS. Urinary and plasma citrate and urinary creatinine were analyzed. Renal ²⁶Al was significantly elevated in CAG compared to CTL. Urinary ²⁶Al levels were reduced in both CAG and NaCD, but these differences were not significant. Urinary citrate was significantly elevated in CAG and NaCD relative to CTL. Hepatic and plasma ²⁶Al were not different between groups. A high citrate bolus did not affect hepatic Al but augmented renal Al levels by increasing renal tubular reabsorption of Al. Instead of sequestering Al, citrate—by enhancing Al reabsorption and retention—may increase total body burden.

The second animal study involved the use of diuresis to elucidate the mode and site of renal Al transfer. We investigated the effect of four commercial diuretics, active in different tubular sites, and of water following administration of ²⁶Al (0.73 ng · kg⁻¹ body wt · day⁻¹, 28 days) on renal Al excretion in adult male SD rats with normal renal function. Each of the four groups (n = 6) given commercial diuretics received either acetazolamide, furosemide, hydrochlorothiazide or triamterene. Controls received methyl cellulose vehicle and one group received water by gavage. Five treatment days were separated by 4-day washout periods. The effect of oral citric acid on renal Al excretion in diuresis was investigated. ²⁶Al was analyzed in urine by AMS. Citrate and creatinine were assayed in urine by established methods. Furosemide and water diuresis increased renal Al excretion to varied extents. Furosemide produced a significant increase in renal Al excretion. The results suggest that the thick ascending limb (TAL) of Henle's loop is the primary site of renal Al transfer. There is a strong case for reabsorption of filtered Al but current evidence does not preclude tubular Al secretion. Neither proximal tubules, late distal tubules nor collecting ducts are involved in Al handling. Oral citrate reduced diuretic-induced increases in renal Al excretion.

The goals of this study—elucidation of modulators and modes of renal Al handling and identification of renal sites of Al transfer—have been achieved. These findings open the way for further mechanistic studies in Al toxicokinetics. Since the kidney is important in the physiological response to Al loading and in regulating body Al, understanding the renal physiology of Al may provide new insights into its toxicology. Further work is needed at the level of cellular transport of Al to enable the underpinnings of Al toxicology to be unravelled. We have successfully combined information gained with AAS with studies using AMS in mechanistic studies with physiological levels of Al.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Renale Mechanismen der Handhabung und Ausscheidung des Aluminiums (Al) sind unbekannt. Die Schwierigkeit, die glomeruläre Ultrafilterabilität des Al zu bestimmen, hat Studien auf diesem Gebiet eingeschränkt. Hauptprobleme der Al-Spurenanalytik biologischer Proben sind Kontamination (wegen der natürlichen Ubiquität des Al) und Mangel eines Al-Isotops mit biologisch brauchbarer Zerfallshalbwertszeit (das für traditionelle Tracerstudien geeignet wäre). Hauptziel dieses Projektes war es, Faktoren zu untersuchen, die die renale Handhabung und Ausscheidung des Al über die gesunde Niere in Säugern beeinflussen. Dabei sollten Studien in Menschen und Ratten durchgeführt werden. Weitere Ziele waren Aufklärung von Ort und Art des renalen Al-Austausches, und biokinetische Untersuchungen über Al im physiologischen Bereich. Um die erwähnten analytischen Probleme zu lösen, wurden Studien mit dem stabilem ^{27}Al (Atomabsorptionsspektrometrie, AAS) und mit dem langlebigen ^{26}Al (Beschleunigermassenspektrometrie, AMS) kombiniert. Die Atome selbst, statt ihrer Zerfallsereignisse, werden bei der AMS gezählt. Wir suchten Hinweise über Ernährungseinflüsse auf den *Al-Body-Burden* unter physiologischen Bedingungen. Diese mechanistische Studien würden zum Verständnis über die Al-Toxizität beitragen.

Die Studien dieses Projektes gliedern sich in drei Teile. In einer ersten Studie wurden Experimente mit ^{27}Al in sechs gesunden Probanden durchgeführt. Die renale Al-Exkretion wurde in den Probanden in Wasser-Diurese, mit oder ohne Citrat-Gabe, untersucht. Ein Proband erhielt Al-Hydroxid zusammen mit Citrat zwecks Untersuchung der Plasma-Al-Kinetik. Diese Studie zeigte, dass Wasser-Diurese zur Steigerung der renalen Al-Exkretion führt, und dass die Citrat-Gabe diese Zunahme wiederum unterdrückt. Die Plasma-Al-Kinetik war empfindlich auf die Einnahme von Al-Hydroxid und Citrat. Der Plasma-Al-Spiegel nahm schnell zu und wieder ab, nach Citrat-Gabe, ein Hinweis auf Mobilisierung und Umverteilung gelagertes Al durch Citrat.

Bei Ratten wurden zwei Studien, mit subkutaner ^{26}Al -Applikation mittels osmotischer Pumpen, durchgeführt. Die erste Studie untersuchte den Einfluss der Citrat-Gabe auf die renale Al-Exkretion und Gewebeverteilung in erwachsenen männlichen Sprague-Dawley-Ratten. Alle neun Ratten (drei Gruppen, N = 3) erhielten ^{26}Al ($0.3 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG} \cdot \text{Tag}^{-1}$, 28 Tage), hatten Futter *ad libitum*, und verbrachten wöchentlich 24 Stunden im Metabolismus-Käfig. Kontrolltiere (CTL) und die Citronensäure-Gruppe (CAG) verfügten frei über

Trinkwasser. Behandlungsgruppen erhielten die gleiche Citrat-Dosis, als Na-Citrat (NaCD , $420 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG} \cdot \text{Tag}^{-1}$) im Trinkwasser oder Citronensäure ($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG} \cdot \text{Tag}^{-1}$) mittels Magensonde. ^{26}Al wurde in Plasma, Urin, Niere und Leber mit AMS gemessen. Der renale Al-Gehalt war in CAG signifikant erhöht gegenüber CTL und NaCD. Im Urin war der ^{26}Al -Spiegel der Citrat-Gruppen tiefer, jedoch nicht signifikant. Citrat-Exkretion war höher in Citrat-Gruppen als in CTL. Leber- und Plasma- ^{26}Al waren nicht verschieden zwischen den Gruppen. Die Citrat-Gabe hatte keinen Einfluss auf hepatische Al-Gehalte, erhöhte jedoch, wegen gesteigerter Rückresorption, den renalen Al-Gehalt. Statt Al zu sequestrieren, führt Citrat, in Folge gesteigerter Rückresorption, zur Retention, und insgesamt zur Zunahme des *Al-Body-Burden*.

Der zweite Tierversuch untersuchte Art und Ort des renalen Al-Exkretion. Der Einfluss von vier Diuretika, mit verschiedenen Angriffspunkten im Nephron, und von Wasser nach ^{26}Al -Applikation ($0.73 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ KG} \cdot \text{Tag}^{-1}$, 28 Tage) auf die renale Al-Exkretion wurde in SD-Ratten untersucht. Vier Gruppen ($N = 6$) bekamen je ein kommerzielles Diuretikum: Acetazolamid, Furosemid, Hydrochlorthiazid oder Triamteren. Kontrolltiere erhielten das Vehikel Methylzellulose, während eine Gruppe Wasser als Diuretikum erhielt. Behandlung erfolgte fünfmal am jeweils fünften Tag. ^{26}Al im Urin wurde mittels AMS, Citrat und Kreatinin mit etablierten Methoden analysiert. Furosemid und Wasser-Diurese erhöhten die renale Al-Exkretion unterschiedlich, jedoch war diese Erhöhung nur bei Furosemid signifikant. Die Resultate deuten auf den dicken steigenden Ast der Henleschen Schleife (TAL) als primärer Ort des renalen Al-Austausches. Die Daten sprechen klar für tubuläre Al-Rückresorption, schliessen jedoch Al-Sekretion nicht aus. Weder der proximale Tubulus noch der späte distale Tubulus noch das Sammelrohr sind aktiv an der renalen Al-Handhabung beteiligt. Eine Citrat-Gabe führt zur Reduktion der Diurese-bedingten Steigerung der Al-Exkretion.

Wir haben die Ziele dieses Projektes — Aufklärung von Art und Ort der renalen Al-Exkretion — erreicht. Die Befunde öffnen den Weg für weitere Studien der Al-Toxikokinetik. Da die Niere eine wichtige Rolle bei der physiologischen Antwort auf die Al-Exposition und bei der Regulation des Al-Haushaltes innehat, wird ein besseres Verständnis der renalen Physiologie des Al neue Einsichten in die Al-Toxikologie erbringen. Weitere Studien auf der Ebene des zellulären Al-Transports sind nötig, um die Geheimnisse der Al-Toxikologie zu lüften. Wir haben erfolgreich AAS- mit AMS-gestützten Studien ergänzt und auf mechanistische Untersuchung des Al im physiologischen Bereich angewandt.