A perinatalis időszak víz- és elektrolytforgalmának, valamint az újszülöttek urogenitalis tractusának állatkísérletes és klinikai vizsgálata

> PhD értekezés Dr Nyul Zoltán Pécs, 2007

Tartalomjegyzék

ļ

1 Bevezetés.	5
2 Vizsgálatok	
2.1 Az endogén ouabain-szerű anyag csökkent renális kiválasztása NaCl szupplementá	<u>ilt</u>
koraszülöttekben	7
2.1.1 Háttér	<u>7</u>
2.1.2 Anyag és módszer	8
2.1.2.1 Vizsgálati csoportok	8
2.1.2.2 Módszer	8
2.1.2.2.1 Mintaelőkészítés	8
2.1.2.2.2 Antitest előkészítés	8
2.1.2.2.3 Radioimmunoassay	9
2.1.2.2.4 HPLC	9
2.1.2.3 Analízis	10
2.1.3 Eredmények	10
2.2 A tüdő és az agyszövet víztartalmának H1-NMR relaxációs vizsgálata foetalis és n	<u>eonatalis</u>
nyulakban: a szöveti hyaluronsav jelentősége	13
2.2.1 Háttér	<u>13</u>
2.2.2 Anyag és módszer	<u>14</u>
2.2.2.1 Vizsgálati csoport	14
2.2.2.2 Módszer	14
2.2.2.1 HA meghatározás	14
2.2.2.2 NMR spectroscopia	15
2.2.2.3 Matematikai analízis	15
2.2.2.3 Statisztikai analízis	<u>15</u>
2.2.3 Eredmények	16
2.2.3.1 Az agyszövet víztartalmának H1-NMR relaxációs vizsgálata	<u>16</u>
2.2.3.2 A tüdő víztartalmának H1-NMR relaxációs vizsgálata	<u>20</u>
2.3 Pyeloureteralis obstructióval született gyermekek stenoticus ureterszakaszainak viz	<u>zsgálata:</u>
emelkedett endothelin-1 és csökkent adrenomedullin mRNS expresszió.	23
2.3.1 Háttér	<u>23</u>
2.3.2 Anyag és módszer	24
2.3.2.1 Vizsgálati csoport	24
2.3.2.2 RNS-extractio es reverse transcriptio	
2.3.2.3 Real-time PCR	<u>24</u>
2.3.2.4 Immunhisztokémia	
2.3.3 Eredmények	27
2.3.3.1 Génexpresszió	
2.3.3.2 Immunohistochemia	
2.3.3.2.1 Kontroll szövetminták	27
2.3.3.2.2 Stenoticus ureter szövetminták.	
2.4 Vizelet aquaporin-2 kiválasztás koraszülött és érett újszülöttekben	<u>29</u>
2.4.1 Anyag és módszer	<u>29</u>
2.4.1.1 Vizsgálati csoport	
2.4.1.2 Módszer	<u>30</u>

2.4.1.3 Analízis	
2.4.2 Eredmények	
2.5 Az éretlen vese csökkent koncentrálóképessége és a szöveti hyaluronsav (HA)	
3 Összefoglalás	
4 Irodalom	

Rövidítések jegyzéke

Ť

. .

ADH	antidiureticus hormon
AM	adrenomedullin
AQP	aquaporin
AVP	arginin-vasopressin
EDLF	endogén digoxin-szerű faktor
ET-1	endothelin-1
GAG	glycosaminoglycan
GAPDH	glyceraldehid-3-phosphat dehydrogenase
HA	hyaluronan, hyaluronsav
HPLC	high-performance folyadék kromatográfia
NMR	nuclear magnetic resonance
NOS	nitrogen-monoxid synthase
NPY	neuropeptid-Y
PGP 9.5	protein gen product 9.5
PUS	pyeloureteralis stenosis
RIA	radio-immunoassay

1 Bevezetés

A koraszülések gyakoriságának csökkentésére irányuló eredményes szülészeti törekvések mellett a csecsemőhalálozás javításában fontos szerepe van azoknak az erőfeszítéseknek, melyeket a gyermekgyógyászok az újszülöttek élettani sajátosságainak megismerésére, az újszülöttkori patológiás állapotok kórtanának tisztázására és a kóros állapotok megelőzésére és kezelésére végeznek. Ezen törekvések eredményeképp az utóbbi évtizedekben a koraszülöttek és ezen belül is az igen kis súlyú koraszülöttek neonatologiai ellátásában igen jelentős haladás történt.

A Pécsi Orvostudományi Egyetemen kiemelkedő hagyományai vannak az újszülöttkori sav-bázis egyensúly szabályozása és ehhez kapcsolódóan az elektrolitforgalmi zavarok kutatásának. E vizsgálatok eredményeképp sikerült feltárni az újszülöttkori elektrolitforgalom renális és endokrin szabályozásának legfontosabb elemeit, a sav-bázis egyensúly és az elektrolitháztartás sajátos kapcsolatát és az érés során bekövetkező változásokat.

A vizsgálatok igazolták, hogy alacsony súlyú koraszülöttekben élettani körülmények között is renális sóvesztés következik be, melynek eredményeképp negatív nátrium egyenleg és a plazma nátrium koncentrációjának csökkenése, az úgynevezett "késői hyponatraemia" alakul ki. Az egészséges koraszülöttekben azonos életkorban kialakuló késői hyponatraemia és metabolikus acidosis hátterében az elégtelen renális H+-Na+ csere pathogenetikai szerepét igazolták és elsőként mutatták ki, hogy NaCl szupplementálással az elektrolitforgalom átmeneti, de a koraszülöttek marginális szomatikus stabilitását jelző zavara megelőzhető, illetve korrigálható.

A munkacsoport a későbbiek során a renális víztranszport érési mechanizmusát és a különböző mobilitású szöveti vízfrakciók - a fizikai vízterek - é1ettani és klinikai jelentőségét tanulmányozta. Az Értekezésben összefoglalt vizsgálatainkkal az endogén ouabain-szerű anyag neònatális elektrolitforgalmi jelentőségét, a tüdő és az agyszövet fizikai víztereinek perinatális változásait valamint a renális AQP-2 ürítés és az újszülött vese koncentráló képessége közötti kapcsolatot

5

kívántuk tisztázni. Különös figyelmet fordítottunk annak megismerésére is, hogy a húgyutak normális működésének fenntartásában milyen szerepet játszanak azok az autokrin/parakrin módon ható vasoaktiv anyagok, melyek expressziója az egészséges ureterben kimutatható (endothelin-1, adrenomedullin, nitrogén monoxid, neuropeptid-Y). Vizsgálatainkat modern laboratóriumi módszerek felhasználásával (RIA, HPLC, H1-NMR spectroscopia, real-time PCR, immunohistochemia) szé1eskörű hazai és nemzetközi együttműködésben végeztük.

Eredményeink hozzájárulhatnak a perinatális időszak élettani folyamatainak és kóros történéseinek teljesebb megismeréséhez és alapjául szolgálhatnak a korábbiaknál eredményesebb terápiás eljárások bevezetésének. Az ureterben kimutatható vasoaktiv hormonok quantitatív analízisével a húgyúti fejlődési rendellenességek kialakulásának mechanizmusához és a későbbi oki kezelés megtervezéséhez nyújthatunk hasznos információt.

2 Vizsgálatok

2.1 Az endogén ouabain-szerű anyag csökkent renális kiválasztása NaCl szupplementált koraszülöttekben.

2.1.1 Háttér

Korábbi tanulmányok igazolták az endogén digoxin-szerű faktor (EDLF) létezését [1, 2], mely legnagyobb valószínűséggel a mellékvesekéreg által szekretált ouabainnal vagy annak valamely izomerjével azonosítható. A ouabain a Na+/K+-ATP-ase gátlása révén a vascularis simaizomsejtekben az intracellularis Na+ és Ca++ akkumulációján keresztűl vasoconstrictiot és a vese tubularis Na reabsorptiojának csökkentésével natriuresist eredményez [3, 4, 5]. Számos klinikai megfigyelés és kísérletes adat arra utalt, hogy az EDLF elválasztás elsődleges kiváltó tényezője a nátrium és volumen retenciója [6, 7, 8, 9], ugyanakkor más tanulmányok megkérdőjelezik az extracellularis volumen és az EDLF produkció közötti közvetlen kapcsolatot [10]. A ouabain hatásmechanizmusára vonatkozóan lényeges megfigyelés, hogy a plasmában szignifikáns mennyiségben alig detektálható, ugyanakkor a vizeletben ezt jóval meghaladó mennyiségben űrül és koncentrációja arányos a veseszövetben mért EDLF tartalommal [11].

A plasma EDLF koncentráció fordított arányosságot mutat a gestatiós és postnatalis korral és egyenes arányban állt a fractionált natrium excretióval [12]. Ezen megfigyelésekre alapozva, feltételezve, hogy az endogén ouabain szerepet játszik az extracellularis folyadéktöbblet postnatalis csökkentésében, alacsony és emelt nátrium klorid bevitel mellett koraszülöttek ouabain excretióját vizsgáltuk.

7

2.1.2 Anyag és módszer

2.1.2.1 Vizsgálati csoportok

A NaCl szupplementációban részesülő csoport /Group S, átlagos születési súly: 1578g (1280-1750g), gestatios kor: 30,4 hét (29-33 hét)/ és a kontroll csoport /Group NS, átlagos születési súly: 1537g (1250-1810g), gestatiós kor: 30,8 hét (28-34 hét)/ egyaránt 9-9 újszülöttet foglalt magában. A NaCl szupplementáció protokollja [13] szerint a vizsgált koraszülöttek a 8-21 nap között 3-5 mmol/kg/nap, 22-35 napos korban 1.5- 2.5 mmol/kg/nap NaCl-ot kaptak. A kontroll csoport NaCl szupplementációban nem részesült. Táplálásuk gyűjtött anyatejjel történt, a második hét végére a napi folyadékbevitel 150-180ml/kg-ig emelkedett. Valamennyi koraszülött zavartalan terhességből, per vias naturales, jó állapotban született; perinatalis asphyxia, infectio vagy cardiopulmonalis distress klinikai vagy laboratóriumi jelei nem voltak észlelhetőek és a vizsgálatsorozat egész tartama alatt tünetmentes maradt.

A vizsgálat etikai bizottsági hozzájárulás és minden újszülöttnél tájékoztatást követő szülői beleegyezés birtokában történt.

2.1.2.2 Módszer

A vizsgált koraszülötteknél a 7. életnapon, majd 5 hetes életkorig hetente 24h-s vizeletgyűjtés történt és a gyűjtött mintából meghatározásra került a renális Na, K (lángfotometria), kreatinin (módosított Jaffé-reakció) valamint ouabain (RIA, HPLC) koncentráció. Folyamatosan ellenőriztük a plasma elektrolitok szinteket is.

2.1.2.2.1 Mintaelőkészítés

1 ml vizelet és metanol keverékét 30 percig 0°C-ra hűtöttük majd 3000g-vel 10 percig 4 0°C-on centrifugáltuk. A felülúszóhoz 8 ml ecetsavat adtunk és előkészített C18 oszlopra vittük (Sep-pak, Waters Königstein, Németország). Az oszlop előkészítése 10ml H₂0, 10 ml metanol, 10 ml H₂0 alkalmazásával történt. A frakciókat 5ml 86%-os metanollal és 4%-os ecetsavval nyertük.

2.1.2.2.2 Antitest előkészítés

Butler és Tse-Eng módszere szerint előállított albumin-ouabain conjugatummal New Zealand fehér nyulak - alapimmunizálásból és 6 hónapig havonta booster adásából álló - immunizálása történt [14]. Az antitest specificitását sorozathigítással különböző steroidokkal végzett próba jelezte, mely elhanyagolható (<0.1%) keresztreakciót adott digoxinnal, digitoxinnal, aldosteronnal, hydrocortisonnal és rhamnossal.

2.1.2.2.3 Radioimmunoassay

Az assay elegy 1:80000 higítású antiserumot tartalmazott 100mM natrium phosphat, 50mM NaCl, 10mM ethylendiamintetraammonium (EDTA), 0.01% Na-azid összetételű pufferben, melynek 100 ml-éhez 100ul TritonX, 0.3g szarvasmarha serum albumint és tríciummal jelölt ouabaint (Amersham, Braunschweig, Németország) adtunk. Jelöletlen ouabain hiányában a teljes radioaktivitás 60%-át kötötte az antiserum. 24h-s inkubáció után, kecske és nyúl gammaglobulinnal (Sigma, München, Németország) és nyúl serummal újabb 24h-s inkubáció történt. A kötött és szabad ouabain szétválasztása céljából 4°C-on polyethylenglikollal 30 percig inkubáltuk. 3000g-vel (30 perc) történt szeparációt követően a felülúszót eltávolítva a pelletet 0.1 M NaCl és 0.1M HCl oldatában oldottuk. Scintillatios folyadékhoz (Quicksafe A, Zinser, Frankfurt, Németország) való hozzzáadás után Beckman számlálóval mértük az aktivitást. A vizelet ouabain interassay és intraassay variatios coefficiense 8.4% (n=10) és 5.6% (n=10) volt.

2.1.2.2.4 HPLC

A ouabain-szerű immunreactivitás meghatározása céljából isopropanol/propanol és/vagy acetonitril/trifluorecetsav grádiensű reverz fázisú HPLC-t használtunk. Az isopropanolol/propanolol grádiensen futott minták chromatographiájához C 18-as oszlopokat (Merck, Darmstadt, Németország) használtunk, a preequilibratiót 0.1% heptafluorobutirát oldatával végeztük. A bifázisos gradiens programmal (1.8 ml/perc áramlási sebességgel 10 percig 0-10%-os propranolol és 50 percig 10-30% isopropyl alkohol) történő chromatographia 1 perces frakciói ouabain-szerű immunreaktivitásának mérésére RIA-t alkalmaztunk. Az acetonitril/trifluorecetsav grádiensű chromatographiához Analytical C 18-as oszlopot (Nucleosil, Latex, Heidelberg, Németország) használtunk, melynek preequilibratioja 0.1% trifluoroecetsavval (TFA) történt. A chromatographiát 1 ml/perc áramlási sebességgel 0.1%-os TFA-t tartalmazó 90%-os acetonitril linearis grádiensével végeztük és hasonlóképpen 1 perces fractiókat gyűjtöttünk [15].

2.1.2.3 Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéshez Student tesztet használtunk.

2.1.3 Eredmények

Alacsony sóbevitel esetében negatív Na egyensúly alakult ki a 4. hét végére, melyet a plasma Naszint szignifikáns esése és folyamatosan csökkenő excretio jelzett. Ezzel szemben, a NaCl szupplementációban részesülő koraszülött újszülöttek plasma Na szintje a normál tartományban maradt, ugyanakkor a Na excretio fokozódott.

A szupplementációt megelőzően mindkét vizsgálati csoportban hasonló ouabain excretiót észleltünk. A kontrollcsoportban (Group NS) a vizelet ouabain az 1. héten mért 180±9.7 pg/kg/h-ról szignifikánsan emelkedett a 3. héten regisztrált 260.1±11 pg/kg/h-ig (p<0.01), ezt követően azonban ezen a szinten maradt. A sóbevitel növelése a vizelet ouabain ürítés jelzett, de nem szignifikáns csökkenésével járt az első két héten (146±16.8 pg/kg/h az 1. héten és 92.1±16.6 pg/kg/h a 2. héten); a vizsgálat későbbi szakaszaiban további változásokat nem észleltünk. Szignifikánsan eltérő ouabain ürítés (p<0.001) mutatkozott a 2- 5. között a két vizsgált csoportban (1. ábra).

1. ábra. A vizelet ouabain- (a.) és kreatininre korrigált ouabain ürítés (b.) megnövelt és normál sóbevitelben részesülő koraszülöttekben.

a.,

b.,



** p<0.01

A fenti megfigyelésekhez hasonlónak bizonyultak a kreatininre korrigált ouabain excretio postnatalis változásai is és a 2-5 hét közötti intervallumban hasonlóképpen szignifikánsan magasabb értékeket (p<0.001) találtunk a NaCl szupplementációban nem részesült koraszülöttek esetében. Míg alacsony sóbevitel mellett a ouabain és a Na-excretio között összefüggés nem volt észlelhető, a NaCl szupplementációban részesülő koraszülöttek esetében a két paraméter szoros korrelációt mutatott (r=0.66, p<0.001), felvetve ouabainnak a fokozott sóbevitel eliminációjában játszott szerepét.

. .

2.2 A tüdő és az agyszövet víztartalmának H¹-NMR relaxációs vizsgálata foetalis és neonatalis nyulakban: a szöveti hyaluronsav jelentősége.

2.2.1 Háttér

A foetalis élet során a tüdőalveolusokat folyadék tölt ki, melyet aktiv klorid transzport mechanizmussal folyamatos epithelialis szekréció tart fenn. A gestatio előrehaladtával a szekréció csökken és a nátriumdependens folyadék reabsorptio kerül túlsúlyba, mely folyamat a csúcspontját a születéskor éri el, elősegítve a tüdő funkcionális adaptációját. Az alveolaris epithelium permeabilitását a víz transmebrán transzportjáért felelős fehérjék, az aquaporinok biztosítják, ugyanakkor fontos tényező a tüdő szöveti víztartalmának fizikai állapota, szabad vagy makromolekulákhoz kötött statusa is.

A praenatalis életben az agy folyadéktereiben bekövetkező változások hátterében lévő mechanizmusok kevésbé tisztázottak. A gestatio előrehaladtával csökken az agy teljes víztartalma, amelyet az intracellularis folyadéktérnek az extracellularis tér rovására történő növekedése kísér [16, 17].

A sejtközötti matrixot alkotó és a folyadék motilitást meghatározó glycosaminoglycan (GAG) molekulák fő komponense a hyaluronsav, amely nagyszámú hydrofil kötőhelye a sejtközötti tér vízmozgásának legfontosabb tényezőjének tűnik [18, 19, 20]. Ezt a szerepét erősíti a praenatalis, perinatalis időszakban az a megfigyelés, hogy a foetalis, neonatalis szövetben nagy mennyiségű hyaluronsav detektálható; a megszületés előtt az agy teljes GAG tartalmának 60%-át teszi ki és ezt követően fokozatosan csökken a felnőttre jellemző 30%-os értékre [21, 22].

Az ismertetett tanulmányban állatkísérletes modellben NMR spectroscopiával (H¹-NMR relaxometria) vizsgáltuk különböző szövetek (tüdő és agy) víztartalmának és ezen belül a kötött és szabadon mozgó vízfrakcióinak perinatalis változásait és ezek összefüggéseit a szöveti hyaluronsav tartalommal.

2.2.2 Anyag és módszer

2.2.2.1 Vizsgálati csoport

A vizsgálatot 25 (n=17), 27 (n=14), 29 (n=17) és 31 (n=12) napos gestatiós korú, electiv sectio caesareával született Pannon fehér nyúlfoetusokon végeztük. A kísérlet másik csoportját 18, terminusra (31 nap) született, 4 napos postnatalis korú nyúl képezte.

2.2.2.2 Módszer

Az állatokat letalis dózisú subcutan pentobarbitállal elaltattuk, majd az összes víztartalom meghatározás, NMR relaxatios idő és szöveti hyaluronan (HA)-mérés céljából agymintákat illetve tüdő szövetmintákat nyertünk. A vízterekben lezajló postmortem változások elkerülése céljábol az NMR vizsgálatot közvetlenül az állatok leölését követően végeztük, a HA meghatározásig a mintákat -70°C-ra fagyasztva tartottuk.

2.2.2.2.1 HA meghatározás

A szövetmintákat súlymérés után lefagyasztottuk es fagyasztva-szárítottuk 72h-n át. Az ismételt súlymérés után a víztartalmat nedves/száraz súly hányadosaként határoztuk meg. A száraz szövetmintát 2.5 U/ml puffer oldatban (0.05 M Tris aminomethan, 0.01 M CaC12, pH 7.2) pronase-val (protease p-5147, streptomyces griseus, Sigma, St Luis) kezeltük. Az enzimet 1 U/10mg szövet koncentrációban alkalmaztuk. Az enzimkezelés leállítása 10 perces, 100°C-os vízfürdővel történt, majd a HA tartalmat radiometriás assay kit (HA 50, Pharmacia, Uppsala, Svédország) segítségével határoztuk meg [23].

2.2.2.2.2 NMR spectroscopia

A 200 mg súlyú szövetmintákat 5 mm átmérőjű NMR üvegcsövekbe helyezve 40°C-on 5 percig inkubáltuk. A mágneses rezonancia vizsgálat (MRS) komputerizált Bruker Minispec PC 140 hordozható 0.96 T-s (40MHz) MR spectroscoppal történt. 180° és 90° pulzusok között 8 különböző mérést végezve került meghatározásra a T₁ relaxatios idő. Az ismétlési időt a T₁ 5-szörösének tekintettük. A T₂ relaxatios időt a Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequencia használatával nyertük; 1000, 1 ms idejű echo alkalmazásával. Mindegyik pontot 5 mérés átlaga képezte. Az adatok tárolása és analysise PC-n történt.

2.2.2.2.3 Matematikai analízis

A szöveti vízfrakciók mobilitásuk szerinti mennyiségi meghatározására a T_2 relaxatios görbék multiexponenciális analysisét alkalmaztuk, a nem lineáris legkisebb négyzetek módszerének felhasználásával [24]. A szabad inductioju proton relaxatio exponenciális mintát mutat. Amennyiben a vizsgált szövetminta különböző relaxatios hányadossal rendelkező, egymástól független víztereket tartalmaz, ezen függvény multiexponenciális egyenlettel leírható. A (T_{21} és T_{22} relaxatios görbével jellemzett) kötött és szabad vízkompartmentek meghatározására biexponentialis illesztést használtunk. A T_2 relaxatios görbék két komponensét az alábbi egyenlettel kaptuk.

$$F=kl\times e^{-t/T21}+k2\times e^{-t/T22}$$

2.2.2.3 Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéshez Mann-Whitney tesztet és a legkisebb négyzetek módszerével lineáris regresszió számítást alkalmaztunk.

2.2.3 Eredmények

2.2.3.1 Az agyszövet víztartalmának H¹-NMR relaxációs vizsgálata

A gestatio előrehaladtával a nedves/száraz súly hányadossal jellemzett agyszöveti víztartalomban fokozatos, lassú csökkenést regisztráltunk a kezdeti, 25. napon mért 9.6±0.3-tól a 9.3±0.2 (27. nap, p<0.01, 9.2±0.2 (29. nap, p<0.001), 9.1±0.3 (31. nap, p<0.001) értékekig, melyet a 4. postnatalis napon mért 8.7±0.3-as (p<0.001) kifejezett esés követett. A T1, T2 relaxatiós idők hasonló trendet mutattak; a T₁ 1524±101 ms és 1494±50 ms között változott a foetalis periódusban, majd 1382 \pm 84ms-ra csökkent postnatalisan (p<0.001). A T₂ relaxatiós idő postnatalis esését (200.é±7.1ms, p<0.001) azonban már a 25-29. gestatios naphoz képest (229±10.4 ms - 233±7.1 ms) a 31. napon (220±21.9 ms) megfigyelhető szignifikáns csökkenés vezette be (p<0.05) (1. Táblázat). A T₂ relaxatiós görbe biexponenciális elemzése lehetővé teszi a kötött és szabad vízfrakciókat jellemző gyors (T₂₁) illetve lassú (T₂₂) komponensekre való bontást. Az 1. Táblázatban tüntettük fel a relaxatiós időket és a T₂ görbe biexponenciális illesztéséből levezethető agyszöveti szabad és kötött vízfrakciókat. Látható, hogy a T₂₁ a gestatiós idővel párhuzamosan emelkedett 102.4±40.6 ms-ról (25. nap) 135.5±64.3 ms-ig (31. nap), amit 92.6±28.8 ms-ra (4. nap) történő postnatalis csökkenés követett. A T₂₂ a 25. napon mért 234.2±9.7 ms-os értékről a 29. napig 293.4±130.9 ms-ig emelkedett, majd folyamatos csökkenést mutatott a 224.2±19.2 ms-os (31. nap, p<0.001) és 206.0 \pm 8.4 ms-os (postnatalis 4. nap, p<0.001) értékekig. Ennek eredményeképp, a T₂₁ relaxatios komponenssel reprezentált kötött vízfrakció a 25. napon a teljes agyszöveti víztartalom 4.4±1.8%át tette ki, majd a 29. napon elérve a 19.3±26.2%-os maximális értéket (p<0.01) fokozatosan süllyedt $6.8\pm8.0\%$ -ig (31. nap) illetve $4.6\pm5.3\%$ -ig (postnatalis 4. nap, p<0.05).

1. Táblázat. Az agyszövet víztartalma, hyaluronsav koncentrációja, a T_1 és T_2 relaxatiós idők valamint a T_2 relaxatiós idő gyors (T_{21}) és lassú (T_{22}) komponense koraszülött újszülött nyulakban (mean±SD).

	Nedves/száraz súly arány	Hyaluronsav (μg/g száraz súly)	T ₁ (ms)	T ₂ (ms)
Gestatiós kor				
(nap)				
25	9.6 ± 0.3	2095 ± 273.4	1524 ± 101.0	229 ± 10.4
.27	$9.3 \pm 0.2^{**}$	$1541 \pm 168.8^{***}$	$1494 \pm 50.5^{**}$	233 ± 7.1
29	$9.2 \pm 0.2^{***}$	$1527 \pm 316.0^{***}$	$1512 \pm 72.8^{**}$	231 ± 17.7
31	9.1 \pm 0.3***	$1826 \pm 292.0^*$	1508 ± 96.8	$220 \pm 21.9^{*}$
Postnatalis kor				•
(nap)				
4	$8.7 \pm 0.3^{***}$	$1144 \pm 126.3^{***}$	$1382 \pm 83.9^{***}$	$201 \pm 7.1^{***}$

A 25. napos gestatiós kor értékeihez viszonyított szignifikanciaviszonyok:

* p<0.05

** p<0.01

*** p<0.001

Miközben az agyszövet teljes víztartalma a gestatiós időszakban a 29-31. nap között mindössze 0.8%-kal mérséklődött, az ennek megfelelő T_2 relaxatiós idő csökkenése 4.6%-os volt. A T_{21} -ből származtatott kötött vízfrakció négyszeresére emelkedett a gestatio 29. napjára, amit a 4. postnatalis napra a kezdeti értékre történő gyors esés követett. Ezen eredményekből az agyszöveti víztartalomnak a gestatio előrehaladtával fellépő átrendeződésére következtethetünk.

A koraszülött nyúl agy HA-koncentrációjának gestatióval összefüggő változásait a 2. Táblázatban tüntettük fel. A 25. napon észlelt 2095 \pm 273.4 ug/g magas HA koncentráció jelentősen csökkent a 27. (1541 \pm 168.8 ug/g, p<0.001) és a 29. napra (1527 \pm 316.0 ug/g, p<0.001); ezt követően átmeneti emelkedést regisztráltunk (1826 \pm 292.0 ug/g, p<0.05) a 31. napon. Az érett újszülött nyulak agyszövetének HA-koncentrációja összehasonlítva a koraszülöttekével postnatalisan extrém alacsony értéket (1144 \pm 126.3 ug/g, p<0.001) ért el.

		T ₂₁ (ms)	T ₂₁ (%)		T ₂₂ (ms	T ₂₂ (%)			
Gestatiós l	kor									
(nap)										
	25	102.4 \pm	40.6	$4.4 \pm$	1.8	$234.2 \pm$	10.0		$95.6 \pm$	1.8
	27	127.4 \pm	40.1	$10.8 \pm$	25.4	$256.1\ \pm$	69.3		$89.2 \ \pm$	25.4
	29	$129.7 \pm$	36.0	$19.3 \pm$	26.2**	$293.3 \ \pm$	130.9**		$80.7\ \pm$	26.2
	31	$135.5 \pm$	64.3	$6.8 \pm$	8.0	$224.2 \ \pm$	19.2		$93.2\ \pm$	8.0
Postnatalis	s kor									
(nap)										
(1)	4	$92.6 \pm$	28.8	$4.6 \pm$	5.3*	$206.0\ \pm$	8.4**		$95.4 \ \pm$	5.3*

2. Táblázat. Az agyszövet víztartalma, hyaluronsav koncentrációja, a T_1 és T_2 relaxatiós idők valamint a T_2 relaxatiós idő gyors (T_{21}) és lassú (T_{22}) komponense érett újszülött nyulakban (mean±SD).

A 25. napos gestatiós kor értékeihez viszonyított szignifikanciaviszonyok:

* p<0.05

** p<0.01

*** p<0.001

A teljes agyszöveti víztartalom és a relaxatiós időkre kifejtett hatásának megállapítása céljából elemeztük a közöttük fennálló összefüggést. Pozitív korrelációt találtunk a teljes víztartalom és a T_1 (r=0.37, p<0.01) és a T_2 relaxatiós időkkel (r=0.56, p<0.001), azonban összefüggés nem volt megállapítható a T_2 gyors komponensével jellemzett kötött vízfrakcióval (2. Ábra).

. *

2. ábra Az agyszövet teljes víztartalma és a T_1 , T_2 és T_{21} (T_2 gyors komponense) relaxatiós idők összefüggései.



2.2.3.2 A tüdő víztartalmának H¹-NMR relaxációs vizsgálata

A tüdőszövet nedves/száraz súly hányadossal számított víztartalma a 25. gestatios nap (8.8 ± 0.5) és a 29. nap (8.8 ± 0.4) között lényegében változatlan, a 31. naptól azonban mérsékelt (7.7 ± 0.7 , p<0.001), majd a 4. életnapon kifejezett csökkenés (5.910.3, p<0.001) volt mérhető. Hasonló tendenciák észlelhetők a T₁, T₂ relaxációs idők vonatkozásában, amennyiben átmeneti emelkedést (1300 ± 100 ms T₁ és 191.5±25.8 ms T₂ a 25. praenatalis napon; 1430 ± 80 ms T₁ /p<0.001/ és 248.5±19.2 ms T₂ /p<0.001/ a 27. napon) követően mindkét érték csökkent (3. Táblázat).

A T₂ relaxatiós görbe biexponenciális analízisével elkülönített kötött (T₂₁) és szabad (T₂₂) víztérfrakciók a 27. napig növekedtek, majd a vizsgálati periódus végéig progresszív csökkenést mutattak. A 25-29. napig terjedő gestatios időszakban a teljes tüdőszöveti víztartalom 31-34%-at tette ki a kötött fractio, amely a 31 napon 21.6±8.0%-ra (p<0.001), a postnatalis 4. napon 16.6±9.4%-os hányadra csökkent (p<0.001). A 3. táblázatban tüntettük fel a hyaluronsav éréssel kapcsolatos változásait. A gestatio előrehaladtával a száraz szövetre vonatkoztatott HA-concentratio fokozatos csökkenését regisztráltuk (870.8±205.2 ug/g a 25.napon, 162.6±32.4pg/g a 31 napon /p<0.001/), megszületést követően azonban - a tüdőszöveti víztartalom, különösen a kötött fractio párhuzamosan bekövetkező esése ellenére - a HA kétszeresére (347.3±708 ug/g /p<0.001/) emelkedett. A tüdőszöveti víztartalom pozitív korrelációt mutatott a T₁ (r=0.87, p<0.001) és a T₂ (r=0.93, p<0.001) relaxatios időkkel valamint a T₂ analízisével számított kötött (T₂₁) vízfractióval (r=0.67, p<0.001).

3. Táblázat. A tüdő víztartalma, hyaluronsav koncentrációja, a T_1 és T_2 relaxatiós idők valamint a T_2 relaxatiós idő gyors (T_{21}) és lassú (T_{22}) komponense koraszülött és érett újszülött nyulakban (mean±SD).

	Nedves/száraz súly	Hyaluronsav	T_1	T_2		
	arány	(µg/g száraz súly)	(ms)	(ms)		
Gestatiós kor						
(nap)						
25	8.9 ± 0.5	870.8 ± 205.2	1300 ± 100	191.4 ± 25.8		
27	$10.1 \pm 0.5^{***}$	$573.2 \pm 219.2^{***}$	$1430 \pm 80^{**}$	$248.5 \pm 19.2^{***}$		
29	8.8 ± 0.4	$274.9 \pm 56.2^{***}$	$1400 \pm 50^{**}$	$215.0 \pm 16.8^{**}$		
31	$7.7 \pm 0.7^{***}$	$162.6 \pm 32.4^{***}$	$1290~\pm~130$	$165.2 \pm 15.4^{**}$		
Postnatalis kor						
(nap)						
4	$5.9 \pm 0.3^{***}$	$347.3 \pm 70.8^{***}$	$1030 \pm 80^{***}$	$109.3 \pm 12.2^{***}$		
	L Ta	Ta	T22	T22		
	(ms)	(%)	(ms)	(%)		
Gestatiós kor						
(nap)						
25	97.7 ± 11.7	32.7 ± 7.3	$246.6~\pm~~39.4$	67.3 ± 7.3		
27	$113.6 \pm 9.7^{**}$	34.0 ± 5.5	$325.3 \pm 41.2^{***}$	66.0 ± 5.5		
29	102.6 ± 7.9	31.8 ± 6.1	271.7 ± 27.1	68.2 ± 6.1		
31	$73.5 \pm 13.3^{***}$	$21.6 \pm 8.0^{**}$	$190.3 \pm 24.0^{**}$	$78.5 \pm 7.9^{**}$		
Postnatalis kor						
(nan)						
($50 \pm 13.4^{***}$	$16.6 \pm 9.4^{***}$	$121.2 \pm 20.6^{***}$	$83.4 \pm 9.4^{***}$		

A 25. gestatiós kor értékeihez viszonyított szignifikanciaviszonyok:

* p<0.05

** p<0.01

*** p<0.001

A HA-koncentráció csak a teljes szöveti víztartalommal korrelált (r=0.39, p<0.001), a T₁ (r=0.15, n.s.), T₂ (r=0.22, n.s.) relaxatios időktől és a T₂₁ komponenstől (r=0.24, n.s.) függetlennek bizonyult (3. Ábra).





*

c,

a,

b,

6

d,

2.3 Pyeloureteralis obstructióval született gyermekek stenoticus ureterszakaszainak vizsgálata: emelkedett endothelin-1 és csökkent adrenomedullin mRNS expresszió.

2.3.1 Háttér

A veleszületett pyeloureteralis stenosis (PUS) aetiopathogenesise nem tisztázott, az újabb adatok abnormális peptiderg, nitrerg ureteralis beidegzésre utalnak, ami a legelterjedtebb elképzelés szerint a mechanikus stimulusra adott csökkent relaxatiós képességhez vezet [25]. Mások a hyperplasticus stenoticus szövet sűrű innervációját írták le és a lokálisan szekretált neuropeptid-Y (NPY) szerepét vetik fel [26]. A paracrin úton ható tényezőkre irányíthatják a figyelmet, azok a megfigyelések is, melyek a gastrointestinalis tractus egyéb fejlődési rendellenességeiben, a pylorus stenosis [27, 28] és a Hirschsprung betegségben a nitrogen-monoxid synthase csökkent aktivitását mutatták ki [29, 30].

Ezek az irodalmi adatok vetették fel a kérdést, hogy pyeloureteralis stenosisban, a stenoticus szövetben kimutatható-e a simaizomtónus szabályozásában szerepet játszó egyes peptiderg és nitrerg hormonok génexpressziójának megváltozása. Real-time quantitative PCR módszerrel mértük a NPY, az endothelin-1, a közelmúltban felfedezett, simaizomrelaxáns hatással rendelkező adrenomedullin (AM), valamint a különböző nitrogén-monoxid synthase izoformok, a neuronalis (nNOS), endothelialis (eNOS) és indukálható (iNOS) génjének mRNS expresszióját. Kontrollként glyceraldehid-3-phosphat dehydrogenase (GAPDH), CD31, simaizom-actin (Smactin) és a neuronalis marker protein gén termék 9.5 (PGP) housekeeping gének szolgáltak. A génexpresszió meghatározását immunhisztokémiai vizsgálat egészítette ki.

2.3.2 Anyag és módszer

2.3.2.1 Vizsgálati csoport

Congenitalis pelviureteralis stenosis miatt, Anderson-Hynes szerint műtött 8 gyermek /átlagéletkor: 4,1 év (6 hét-12 év)/ stenoticus ureterszakaszai képezték a vizsgálati mintát. A diagnosis a radiológai, scintigraphiai leletekre alapult. Kontrollszövetként tumor nephrectomián /n:7, átlagéletkor: 73 ev (56-84 év)/ vagy hó1yagtumor resectión átesett felnőtt páciensek uretermintái szolgáltak. A szövetmintákat közvetlenül a kimetszés után folyékony nitrogénban lefagyasztottuk és a feldolgozásig -70°C-on tároltuk.

2.3.2.2 RNS-extractio es reverse transcriptio

RNA-zol kit használatával (WAK Chemie, Medical GmbH, Bad Homburg, GFR) a szövetmintákból total RNS-t izoláltunk, majd spectrophotographiával meghatároztuk a koncentrációjukat. Az így nyert RNS 2pg-ját 40 ul volumenű elegyben 39C°-on 60 percig reverse transcriptiónak vetettük alá.

2.3.2.3 Real-time PCR

A génexpresszió monitorizálására real-time PCR analízist [31] használtunk. A quantitatív génanalízisben új megközelítésnek számító módszer a Taq-polimeráz 5' exonukleáz aktivitásán alapul. Az eljárás során a specifikus oligonukleotid primerpárok által meghatározott génszakaszhoz egy fluorescens festékkel kettősen jelölt komplementer szekvenciát [32] alkalmazunk. Amíg ez az oligonukleotid szakasz (próba) intakt, az 5' végén elhelyezkedő fluorescens (reporter) festék (6- carboxy-fluorescein, FAM) fényemisszióját a 3' végen levő másik festék (quencher, pi. 6-carboxy-tetrametil-rodamid, TAMRA) absorbeálja. A PCR extenziós fázisában a Taq-polimeráz a próbát lehasítja, felszabadítva a reporter festék fényemissziós képességét. Speciális szoftverrel kombinált, automatizált detektor méri és elemzi a növekvő reporter fluorescein emissziót. Az analízis célja meghatározni az un. küszöb ciklus számot (CT), amelynél a jelintenzitás eléri az alapvonal

ingadozásának tízszeres standard szórását. Ezt az értéket egy külső referenciaként használt templat higítási sorából szerkesztett görbére interpoláljuk, így mód nyílik a különböző vizsgálati mintákból nyert adott génszakaszok (target) mennyiségi összehasonlítására. A mérőeszköz gyártója által javasolt reagenseket (Tag Man PCR Reagens kit, Perkin Elmer) és protokollt használtuk. A 25 ul reakció elegy (master mix) 300 nM primert, 200 nM Tag Man hibridizácios probát, valamint 2,5 ul cDNA-t (reverse transcriptios elegy) tartalmazott. A vizsgált cé1szekvenciákhoz (target) a Primer Express (Perkin Elmer) program segítségével választottunk oligonucleotidokat, azonos PCR kondíciókat eredményező paraméterek beállításával. A PCR paraméterei az alábbiak voltak: 50C°- os inkubáció 2 percig, majd 95C°- os 10 percig, amit 15 sec-ig 95C°-os és 1 percig 60C°-os hőmérsékletek váltakozásából álló 40 ciklus követett. Külső referenciaként a target-gén PCR termékének sorozathigítása szolgált.

2.3.2.4 Immunhisztokémia

A szövetmintákat egy éjszakán át 15% picrinsavat és 4% paraformaldehydet tartalmazó phosphat pufferben (pH 7,4) fixáltuk (Zamboni fixáló [33]), majd 0,1 M phosphat pufferben történő mosás és 18% sucroset tartalmazó azonos pufferbe merítés és fagyasztás után 10-14 um-s metszeteket készítettünk (Frigocut 2800 E, Leica, Bensheim, Németország). A metszeteket króm-aluminiummal híd technikát alkalmazva bevont lemezeken rögzítettük és a biotin-streptavidin immunohisztokémiához készítettük elő. Nyúl (anti-adrenomedullin, code 2912, 1:400 higítás, Dr R.E.Lang, Marburg; anti-NOS-I /nNOS/, 1:1000, Dr B.Mayer, Graz, Ausztria; anti NOS-III /eNOS/, Dr B.Mayer) vagy birka (anti-NPY, code E210, 1:1000, Dr W.W.Blessing, Bedford, Ausztrália) polyclonalis antiserum és egér monoclonalis antitestekkel (antiCD31, lot CBL478, DIANOVA, Hamburg; anti-NOS-II /iNOS/, code SA200, lot#K2018, Biomol, Hamburg, Németország; anti-PGP9.5, clone 31A3, lot 961212C, Biotrend, Köln, Németország) szobahőmérsékleten egy éjszakán át inkubáltuk, amit detektálás céljából biotinilált fajspecifikus antiserummal (szamár-anti-nyúl Ig, 1:1200; szamár-anti-birka Ig, 1:400; birka-anti-egér Ig, 1:200; Amersham Buchler, Braunschweig, Németország) történő inkubációs fázis követett. Negatív kontroll céljából az antiserumot nonimmun serummal cseréltük ki, a pozitív kontrollnál az antiserum megfelelő antigénnel történő előzetes preabsorptióját alkalmaztuk. A vé1etlenszerűen kódolt metszeteket BX60 epifluorescens mikroszkóppal (Olympus, Hamburg, Németország) értékeltük.

2.3.3 Eredmények

2.3.3.1 Génexpresszió

CD31-hez (endothel-specifikus housekeeping marker) viszonyítva szignifikánsan emelkedett endothelin-1 (ET-1) és GAPDH-re (általános housekeeping gén) vonatkoztatva csökkent adrenomedullin (AM) expressziót észleltünk a stenoticus ureterszakaszokban. Az nNOS, eNOS, iNOS és NPY mRNS tartalom tekintetében nem különbözott a stenoticus és a kontroll szövetminta (3. Táblázat). Az egyéb peptiderg és nitrerg rendszerekkel összehasonlítva az NPY-expresszió lényegesen alacsonyabbnak adódott.

3. Táblázat. A stenoticus és kontroll ureterminták endothelin-1, adrenomedullin, nNOS, eNOS, iNOS, NPY és Smactin expresszióinak housekeeping génre vonatkoztatott értékei.

	Kontroll			Stenoticus ureter					
	n	átlag		SEM	n	átlag		SEM	p
ET-1/CD31	12	0.49	±	0.065	9	1.106	±	0.151	0.0038**
AM/GAPDH	13	10.9x10 ⁻³	±	2.42x10 ⁻³	9	5.31x10 ⁻³	±	0.77x10 ⁻³	0.046*
nNOS/PGP9.5	13	4.56x10 ⁻³	±	0.49x10 ⁻³	8	5.81x10 ⁻³	±	2.24x10 ⁻³	n.s.
eNOS/CD31	13	0.556	±	0.09	9	0.592	±	0.16	n.s.
iNOS/GAPDH	13	5.61x10 ⁻³	±	0.9x10 ⁻³	6	2.68x10 ⁻³	±	1.39x10 ⁻³	n.s.
NPY/PGP9.5	11	3.423x10 ⁻⁸	±	1.16x10 ⁻⁸	6	4.31x10 ⁻⁸	±	3.36x10 ⁻⁸	n.s.
Smactin/GAPDH	13	0.162	±	0.017	9	0.259	±	0.025	0.0059**

* p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.00

*** p<0.001

2.3.3.2 Immunohistochemia

2.3.3.2.1 Kontroll szövetminták

Az urothelium AM, NOS-I és PGP9.5 ellen mutatott immunoreactivitást. nNOS és AM- reactivitás elsősorban a basalis sejtrétegben mutatkozott, gyengén vagy egyáltalán nem volt észlelhető a szuperficiális sejtekben. Ezzel szemben a PGP9.5 jelölődés pontozott mintázatot adva, a felszínes

sejtrétegekben jelentkezett. Az urotheliumban eNOS, iNOS és NPY immunoreactivitás nem volt kimutatható. PGP9.5-immunoreactiv ganglionok az adventitialis rétegben elszórtan a teljes vizeletelvezető rendszer (pelvis, ureter, hólyag) vizsgált szegmentjeiben fellelhetők voltak. A neuronok többsége nNOS és NPY pozitivitást is mutatott. Az adventitiában rendszeresen ábrázolódó vastag idegrost kötegek következetes PGP9.5 immunoreactivitás mellett számos NPYpozitív idegrostot és kevésbé gyakori nNOS-pozitív axont tartalmaztak. Csak egyes idegrostok jelölődtek eNOS-sal, míg a többi antitestekkel idegelemek nem adtak reaktivitást. Az idegrostok tekintetében egy cranio-caudalis grádiens volt megfigyelhető. Az arteriolák, arteriák és vénák endothel sejtjeiben a sejtmembran és a Golgi-apparatusnak megfelelő paranuclearis képletek eNOS aktivitást mutattak. A CD31 antitest jóval intenzívebb és főképp a kisebb erekben kifejezett immunreaktivitást adott.

2.3.3.2.2 Stenoticus ureter szövetminták

Alapvetően hasonló immunreaktivitási mintázat volt megfigyelhető az obstructiós ureterszakaszokon is, mint a kontrolloknál, eltekintve azon eltéréstől, hogy az urothelium erőteljes eNOS immunoreaktivitást mutatott. A fő különbség a két vizsgálati csoport között a stenoticus ureter innervációs sűrűségének drámai csökkenése. Az érintett szegmensek vagy egyáltalán nem vagy csak kevés NPY- és PGP9.5-pozitív idegvégződést tartalmaztak a simaizom rétegben, nNOS immunreaktiv axonok csaknem teljesen hiányoztak. Az adventitiában ugyan még megfigyelhetők voltak vastag idegrost kötegek, de lényegesen kisebb számban. Ganglion nem ábrázolódott az érintett szakaszokon.

2.4 Vizelet aquaporin-2 kiválasztás koraszülött és érett újszülöttekben

2.4.1 Anyag és módszer

2.4.1.1 Vizsgálati csoport

A vizsgálati csoportokat per vias naturales született 5 egészséges koraszülött (átlagos gestatios kor 30.6 hét /30-32/; átlagos születési súly: 1570g /1480-1670/) és terminusra született 9 egészséges újszülött (átlagos gestatiós kor 39.2 hét /37-40/; átlagos születési súly: 3218g /2760-4270/) képezte. Mindkét csoport úszülöttjeinek testsúlya a gestatiós korra számított 10-es és 90-es percentil közé esett. A gestatiós időtartam meghatározása az UH- vizsgálattal megerősített anyai menstruációs anamnesisen illetve a megszületést követően vizsgált érettségi jeleken (Dubowitz-score) alapult. Minden esetben az 1 perces Apgar érték 7-nél magasabb volt, a cardiorespiratoricus adaptatio zavartalan volt és a perinatalis időszak eseménytelenül zajlott. Az édesanyák normál étrendet kaptak, nem részesültek diureticus terápiában, kórelőzményükben nem szerepelt renalis vagy cardiovascularis megbetegedés.

Az érett újszülöttek vizsgálatára az 1., 3. és 5 életnapon került sor, 62ml/kg, 86ml/kg és 116ml/kg megfelelő napi folyadékbevitel biztosítása céljából 5%-os glucose oldattal kiegészített anyatejes táplálás mellett. A koraszülött újszülöttek a vizsgálatsorozatban a 7. életnapon majd hetente 6 hetes korig vettek reszt. A napi folyadékbevitel (158-195ml/kg) eléréséhez az anyatejes táplálás kiegészítésere szinten 5%-os glucose oldatot kaptak. A vizsgálat során mindkét csoport alanyaitól osmolalitas, kreatinin és AQP-2 meghatározás céljából az utolsó táplálást követően 3-4 h-val reggeli vizeletmintavételre került sor.

2.4.1.2 Módszer

A vizelet osmolalitás Knauer osmometerrel [34], a kreatinin mérése módosított Jaffé módszer [35] szerint történt. A vizelet aquaporin-2 (AQP-2) szint meghatározását magas szenzitivitású radioimmunoassay-val végeztük [36].

2.4.1.3 Analízis

A vizelet AQP-2 excretiót fmol/mg creatininban fejeztük ki. A statisztikai értékeléshez Student tesztet és Mann-Whitney tesztet használtunk.

2.4.2 Eredmények

Az érett újszülöttek vizelet AQP-2 koncentrációja az 1. postnatalis napon volt a legmagasabb (74 \pm 20 nmol/ul), a 3. és az 5. napon 30 \pm 12 nmol/ul illetve 44 \pm 13 nmol/ul szintre esett. Alapvetően hasonló változásokat mutatott a vizelet creatinin excretio is, azonban kifejezettebb csökkenést mértunk (470 \pm 83 mg/l az 1. napon vs. 132 \pm 8 mg/l az 5. napon; p<0.001). Ennek eredményeképpen a kreatinire korrigált AQP-2 kiválasztás a 1., 3. és 5. napon 194 \pm 45 fmol/mgCr, 121 \pm 36 fmol/mgCr és 322 \pm 90 fmol/mgCr értékeknek adódott. Ezzel ellentétes trend volt megfigyelhető a vizelet osmolalitás tekintetében; a postnatalis kor előrehaladtával fokozatos csökkenést észleltünk (1. nap 260 \pm 39 mOsm/l, 3. nap 188 \pm 55 mOsm/l /p<0.05/, 5. nap 69 mOsm/l /p<0.01/) (4. ábra).

Vizelet kreatinin kreatinin (mg/l) -50 postnatalis életkor (nap) Vizelet AQP2 80 60 40 20 0 vizelet AQP2 (nmol/ul) postnatalis életkor (nap) Vizelet AQP2/kreatinin AQP2/kreatinin 400 300 200 100 0 (fmol/mg) postnatalis életkor (nap) Vizelet os molalitás osmolalitás (m0sm/l) postnatalis életkor (nap)

4. ábra. Érett újszülöttek vizelet kreatinin, AQP2 koncentrációja, a kreatininre korrigált AQP2 kiválasztás és vizelet osmolalitása.



Koraszülöttekben a vizelet AQP-2 koncentráció és excretio az első 4 élethét során nem változott szignifikánsan (25±11 nmol/ul - 69±33 nmol/ul illetve 209±84 fmol/mgCr - 438±158 fmol/mgCr). Ezt követően azonban az AQP-2 koncentráció jelentős emelkedését észleltük; az 5. héten 112±22 nmol/ul (p<0.05) majd a 6. héten 168±28 nmol/ul (p<0.01) értékeket mértünk illetve hasonló változást regisztráltunk az AQP-2 excretiojában is (813±233 fmol/mgCr /p<0.05/ az 5. héten és 934±168 a 6. héten /p<0.01/). A vizsgált időszakban a vizelet kreatinin koncentráció és osmolalitás gyakorlatilag állandó maradt, az AQP-2 excretiójában megfigyelt postnatalis változásokhoz hasonló eltéréseket nem észleltünk (5. ábra).

Vizelet kreatinin n.s. vizelet kreatinin (I/6m) postnatalis életkor (hét) Vizelet AQP2 ** **/izelet AQP2** (In/Iomn) postnatalis életkor (hét) Vizelet AQP2/kreatinin AQP2/kreatinin (fmol/mg) postnatalis életkor (hét) Vizelet AQP2/kreatinin AQP2/kreatinin (fmol/mg) postnatalis életkor (hét)

*

5. ábra. Koraszülöttek vizelet kreatinin, AQP2 koncentrációja, a kreatininre korrigált AQP2 kiválasztás és vizelet osmolalitása.

* p<0.05 ** p<0.01 2.5 Az éretlen vese csökkent koncentrálóképessége és a szöveti hyaluronsav (HA)

Irodalmi adatok alapján elsőként vetettük fel annak lehetőségét, hogy a foetalis/neonatalis vese csökkent koncentrálóképességéért részben a vese papilla és belső medulla magas HA tartalma a felelős. A közelmúltban igazolták, hogy folyadékterhelést és a diuresis következményes növekedését a vese papilla HA tartalmának jelentős növekedése kíséri, míg folyadék depletio a papilla HA tartalmának csökkenéséhez vezet. Ennek megfelelően szignifikáns pozitív korrelációt találtak a papilla HA tartalma és diuresis mértéke között, míg a HA tartalom és a vizelet osmolalitása negatív korrelációt mutatott [37]. A megfigyelés arra utal, hogy a vese papilla magas interstitiális HA tartalma akadályozza a renális tubuláris szabadvíz-reabszorptiót és gátolja a magas osmolalitású vizelet létrehozását.

A test hidráltságának változása következtében kialakuló renopapilláris HA tartalom változás mediálásában az antidiuretikus hormonnak (ADH) tulajdonítanak kitüntetett szerepet. Ezt a feltételezést alátámasztja Ginetzinsky megfigyelése, miszerint a HA-t bontó enzim, a HA-ase aktivitása indukált vízdiurésis esetén rendkívül alacsony, ezzel szemben az antidiuresist az enzim aktivitásanak jelentős mértékű fokozódása kíséri. További bizonyíték, hogy ADH adását követően a vizelet HA-ase aktivitása fokozódik annak következtében, hogy a renomedulláris/renopapillaris sejtek ADH hatására növelik a HA-ase szekréciót [38]. A vese medulla/papilla interstitiumában található makromolekulák (HA) és a dipólus tulajdonságú vízmolekulák közötti interakció jelentőségét mutatja a renális koncentrálás mechanizmusában, hogy Iaina és mtsai ADH-kezelt állatokban a vese medulla H¹-NMR spektroszkópiás vizsgálatával a T₂ relaxációs idő megnyúlását és a kötött szöveti vízfrakció szignifikáns csökkenését figyelték meg [39].

Ezen klinikai és kísérletes megfigyelések, valamint az a tény, hogy az éretlen vese, különösen az éretlen renális papilla és belső medulla HA tartalma rendkívül magas, megalapozni látszik azt a feltételezésünket, hogy az eddig is ismert alapmechanizmusok mellett (csökkent cortico-papilláris osmotikus grádiens és az éretlen vese csökkent ADH-reaktivitása) a foetalis/neonatalis vese magas

HA tartalma a renális vízreabszorpció és koncentrálás fontos limitáló tényezője. A felismerés élettani és klinikai jelentőségét az adja meg, hogy a folyadékterek perinatalis átrendeződése során az újszülöttek zavartalan adaptációját elősegítendő a fölös vízkészletek kiürülnek. Ennek a folyamatnak meghatározó eleme lehet a vese magas HA tartalma következtében beszűkült renális koncentráló képesség [40]. Az indirekt adatok alapján feltételezett mechanizmust folyamatban lévő vizsgálatainkkal kívánjuk igazolni. Egyrészt egyidejűleg meghatározzuk a különböző gestatiós és postnatalis korú állatok renális koncentrálóképességét és HA tartalmát, másrészt különböző hidráltsági állapotú állatokból nyert vese papilla/medulla szövetmintákból a HA anyagcsere fontos paramétereit határozzuk meg (HA-ase és HA szintáz isoenzimek mRNS és fehérje szintje, valamint az enzimek aktivitása).

3 Összefoglalás

Az Értekezés első részében különböző sóbevitel mellett a koraszülöttek ouabain (EDLF) excretiójának vizsgálatait ismertettük. Kimutattuk, hogy a NaCl-szupplementált koraszülöttek ouabain ürítése szignifikánsan alacsonyabb a kontrollcsoportéhoz képest. Eredményeink azon irodalmi adatokat erősítik, melyek szerint nincs közvetlen okozati összefüggés a volumenexpansio és az adrenalis ouabain produkció között. Számos korábbi kísérleti megfigyelésre támaszkodva elsőként feltételeztük, hogy koraszülöttekben az EDLF termelése illetve secretiója a reninangiotensin-II rendszer szabályozása alatt áll. A NaCl- szupplementációban részesülő csoportban a ouabain és a NaCl excretio között kimutatott pozitív korreláció az EDLF-nek az excessív sóbevitel eliminációjában játszott szerepére utal.

A perinatalis időszak vízforgalmának megértéséhez elengedhetetlen a víz molekuláris szintű viselkedésének ismerete. Munkacsoportunk az agy és a tüdő víztartalmának, H¹-NMR spectroscopiával elkülöníthető, különböző motilitási tulajdonsággal rendelkező vízfractióinak, valamint az igen jelentős vízkötő tulajdonsággal rendelkező hyaluronsavnak a gestatio és a közvetlen postnatalis élet során bekövetkező érési változásait és összefüggéseit kutatta. Eredményeink alapján az agyszövetet a foetalis időszakban emelkedett HA-koncentráció és víztartalom, ezen belül is a szabad motilitású fractio túlsúlya jellemzi. Ezen paramétereknek a postnatalis életben bekövetkező, de már a gestatio végén megkezdődő csökkenése függetlennek bizonyul a kötött vízfractio változásaitól, ami arra enged következtetni, hogy a foetalis agy víztartalmának átrendeződésében a hyaluronsav nem játszik lényeges szerepet.

A tüdőszövet vizsgálata megerősíti azon korábbi megfigyelést, hogy a tüdőből történő folyadékeltávolítás az effektív postnatalis gázcsere biztosítása érdekében már a születést megelőzően megindul. Eredményeink továbbá adatokkal szolgálnak a tüdő víztartalmának fizikai sajátosságait illetően, kimutatva a kötött vízfractio csökkenését és a szabad motililtású

komponensnek a perinatalis időszakban bekövetkező párhuzamos emelkedését. Az agyszövet vizsgálatakor kapott eredményhez hasonlóan a tüdő vonatkozásában sem találtunk összefüggést a kötött motilitású vízfractio és a HA-tartalom között.

A koraszülött és érett újszülöttek AQP-2 ürítésének vizsgálata megerősíti az előzetes megfigyelést, hogy az AQP-2 az újszülöttek vizeletében alacsony koncentrációban ürül, továbbá excretiója az érés során változik. Koraszülöttekben és érett újszülöttekben az élet első hetében megfigyelhető AQP-2 excretio nem mutat szignifikáns különbséget, mely az AVP által regulált AQP-2 szintézis és intracelluláris transzport érésének postnatalis faktoraira hívja fel a figyelmet. Vizsgálataink a renális AQP-2 és a renális koncentráló kapacitás disszociációját mutatják, felvetve az AVP-AQP-2 tengely és AVP-tól független tényezők egymástól aszinkron érését, változását.

Rámutattunk arra, hogy az éretlen vese magas HA tartalma a renális koncentrálóképesség fontos limitáló tényezője és szerepet játszhat az újszülött excesszív vízkészleteinek kiürítésében és a sikeres postnatalis adaptáció feltételeinek biztosításában.

Számos paracrin/autocrin módon ható vazoaktiv hormon, peptid illetve ezek szintézisét végző enzim mutatható ki az urogenitalis tractusban, melyek szerepe még tisztázatlan. A congenitalis ureter obstructióval operált betegek stenoticus szövetmintáin végzett molekuláris genetikai vizsgálataink rálátást engedhetnek egyes korélettani vonatkozásaikra. Vizsgálataink az endothelin-1 fokozott és az adrenomedullin csökkent génexpresszióját igazolták, mely eltérések, tekintetbe véve physiologiai hatásukat, jól korrelálnak a stenoticus segmensekben megfigyelhető microanatomiai elváltozásokkal.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom prof. Dr Wolfgang Rascher professzornak, az Erlangeni Egyetem Gyermekklinika igazgatójának és prof. Dr Gunnar Sedin professzornak az Uppsalai Egyetem Gyermekklinika igazgatójának a labordiagnosztikai lehetőségek biztosításáért és hasznos tanácsaiért és köszönetem fejezem ki prof Dr Sulyok Endre professzor Úrnak, aki a fenti értekezés alapjául szolgáló vizsgálatok irányítója volt.

4 Irodalom

Közlemények az értekezés tárgykörében

- Sulyok E, Nyul Z. Hyaluronan-related limited concentration by the immature kidney. Med Hypotheses. 2005;65(6):1058-61. Epub 2005 Sep 6. IF: 0.607
- 2. Nyul Z, Vajda Z, Vida G, Sulyok E, Frokiaer J, Nielsen S. Urinary aquaporin-2 excretion in preterm and full-term neonates. Biol Neonate. 2002;82(1):17-21. IF: 0.81
- Knerr I, Nyul Z, Miller J, Rosch W, Dotsch J, Repp R, Weidner W, Rascher W. Increased endothelin-1 and decreased adrenomedullin gene expression in the stenotic tissue of congenital pelvi-ureteric junction obstruction in children. BJU Int. 2001 May;87(7):667-71. IF: 0.84
- Sulyok E, Nyul Z, Bogner P, Berenyi E, Repa I, Vajda Z, Doczi T, Sedin G. Brain water and proton magnetic resonance relaxation in preterm and term rabbit pups: their relation to tissue hyaluronan. Biol Neonate. 2001 Jan;79(1):67-72. IF: 1.072
- Sedin G, Bogner P, Berenyi E, Repa I, Nyul Z, Sulyok E. Lung water and proton magnetic resonance relaxation in preterm and term rabbit pups: their relation to tissue hyaluronan. Pediatr Res. 2000 Oct;48(4):554-9. IF: 2.794
- Worgall S, Rascher W, Gyodi G, Nyul Z, Baranyai Z, Sulyok E. Urinary excretion of endogenous ouabain-like substance is reduced in NaCl supplemented premature infants. Biol Neonate. 1997;72(6):337-44. IF: 0.932

- Nyul Z, Harangi F, Varszegi D, Zombai E. Vesicobullous lesions in a child. Bullous pemphigoid (BP). Arch Dermatol. 1997 Jun;133(6):776-7, 779-80. IF: 2.358
- Dotsch J, Hogen N, Nyul Z, Hanze J, Knerr I, Kirschbaum M, Rascher W. Increase of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 mRNA expression in human placenta during gestation. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2001 Aug;97(2):163-7. IF: 0.884
- Nyul Z, Hadzsiev K, Andrásofszky Zs, Harangi F, Maródi L. DiGeorge-szindróma in vitro fertilizációval született gyermekben. Gyermekgyógyászat. 2005;56(2): 153-157.

Az Értekezésben hivatkozott közlemények

- 1. Schreiber V. The endogenous digitalis-like factor. Physiol Res. 1991;40(2):207-11.
- 2. Goto A, Yamada K, Yagi N, Yoshioka M, Sugimoto T. Physiology and pharmacology of endogenous digitalis-like factors. Pharmacol Rev. 1992 Sep;44(3):377-99.
- 3. Blaustein MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca2+stores and cell responsiveness. Am J Physiol. 1993 Jun;264(6 Pt 1):C1367-87.
- Doris PA. Regulation of Na,K-ATPase by endogenous ouabain-like materials. Proc Soc Exp Biol Med. 1994 Mar;205(3):202-12.
- Nicholls MG, Richards AM, Lewis LK, Yandle TG. Ouabain: a new steroid hormone? Lancet. 1995 Nov 25;346(8987):1381-2.

- Hamlyn JM, Manunta P. Ouabain, digitalis-like factors and hypertension. J Hypertens Suppl. 1992 Dec;10(7):S99-111.
- Seely EW, Williams GH, Graves SW. Markers of sodium and volume homeostasis in pregnancy-induced hypertension. J Clin Endocrinol Metab. 1992 Jan;74(1):150-6.
- Gottlieb SS, Rogowski AC, Weinberg M, Krichten CM, Hamilton BP, Hamlyn JM. Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure. Circulation. 1992 Aug;86(2):420-5.
- 9. Sohn HJ, Stokes GS, Johnston H. An Na, K ATPase inhibitor from ultrafiltrate obtained by hemodialysis of patients with uremia. J Lab Clin Med. 1992 Aug;120(2):264-71.
- Miyagi H, Higuchi M, Nakayama M, Moromizato H, Sakanashi M. Ouabain-like Na+,K(+)-ATPase inhibitory activity of a plasma extract in normal pregnancy and pregnancy induced hypertension. Jpn J Pharmacol. 1991 Dec;57(4):571-81.
- Seccombe DW, Pudek MR, Humphries KH, Matthewson B, Taylor GP, Jacobson BE, Whitfield MP. A study into the nature and organ source of digoxin-like immunoreactive substance(s) in the perinatal period. Biol Neonate. 1989;56(3):136-46.
- 12. Ebara H, Suzuki S, Nagashima K, Shimano S, Kuroume T. Digoxin-like immunoreactive substances in urine and serum from preterm and term infants: relationship to renal excretion of sodium. J Pediatr. 1986 May;108(5 Pt 1):760-2.
- 13. Rascher W, Gyodi Gy, Worgall S, Sulyok E. Effect of sodium chloride supplementation on urinary endothelin-1 excretion in premature infants. J Pediatr 1994;125:793-797.
- Butler UP, Tse-Eng D. Immunoassay of digoxin and of the cardiac glycosides. In: Methods in Enzymology. 1982;84:558-573.

- Worgall S, Hanze J, Wagner R, et al. Characterization of ouabain-like immunoreactivity in human urine. J Hypertens. 1996 May;14(5):623-8.
- Einstein ER, Dalal KB, Csejtey J. Biochemical maturation of the central nervous system. II.
 Protein and proteolytic enzyme changes. Brain Res. 1970;18(1):35-49.
- 17. Lorenzo AV, Jolesz FA, Wallman JK, Ruenzel PW. Proton magnetic resonance studies of triethyltin-induced edema during perinatal brain development in rabbits. J Neurosurg. 1989 Mar;70(3):432-40.
- Comper WD, Laurent TC. Physiological function of connective tissue polysaccharides. Physiol Rev. 1978;58(1):255-315.
- Ganger HJ. Physiological properties of the extracellular matrix. In Hargens AR (ed) Tissue Fluid Pressure and Composition. Williams and Wilkins, Baltimore pp 43-61.
- Lamberg SI, Stoolmiller AC. Glycosaminoglycans. A biochemical and clinical review. J Invest Dermatol. 1974;63(6):433-49.
- 21. Matsui F, Nishizuka M, Yasuda Y, Aono S, Watanabe E, Oohira A. Occurrence of a Nterminal proteolytic fragment of neurocan, not a C-terminal half, in a perineuronal net in the adult rat cerebrum. Brain Res. 1998 Apr 20;790(1-2):45-51.
- 22. Werz W, Fischer G, Schachner M. Glycosaminoglycans of rat cerebellum: II. A developmental study. J Neurochem. 1985;44(3):907-10.
- 23. Laurent UBG, Tengbiad A: Determination of hyaluronate in biological samples by a specific radioassay technique. Anal Biochem. 1980,109:386-3941.
- 24. Mulkern RV, Bleier AR, Adzamilik, Spencer RGS, Sandor T, Jolesz FA: Two-site exchange

revisited: a new method for extracting exchange parameters in biological system. Biophys J 1989; 55:221-232.

- 25. Murakumo M, Nonomura K, Yamashita T, Ushiki T, Abe K, Koyanagi T. Structural changes of collagen components and diminution of nerves in congenital ureteropelvic junction obstruction. J Urol. 1997 May;157(5):1963-8.
- 26. Tainio H, Kylmala T, Heikkinen A. Peptidergic innervation of the normal and obstructed human pyeloureteral junctions. Urol Int. 1992;48(1):31-4.
- 27. Wattchow DA, Cass DT, Furness JB, Costa M, O'Brien PE, Little KE, Pitkin J.
 Abnormalities of peptide-containing nerve fibers in infantile hypertrophic pyloric stenosis.
 Gastroenterology. 1987 Feb;92(2):443-8.
- Vanderwinden JM, Mailleux P, Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ, De Laet MH. Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis. N Engl J Med. 1992 Aug 20;327(8):511-515.
- 29. Vanderwinden JM, De Laet MH, Schiffmann SN, Mailleux P, Lowenstein CJ, Snyder SH, Vanderhaeghen JJ. Nitric oxide synthase distribution in the enteric nervous system of Hirschsprung's disease. Gastroenterology. 1993 Oct;105(4):969-73.
- 30. Bealer JF, Natuzzi ES, Buscher C, Ursell PC, Flake AW, Adzick NS, Harrison MR. Nitric oxide synthase is deficient in the aganglionic colon of patients with Hirschsprung's disease. Pediatrics. 1994;93(4):647-51.
- 31. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. Real time quantitative PCR. Genome Res. 1996;6:986-94.
- 32. Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K. Oligonucleotides with

fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods Appl. 1995;4:357-62.

- Stefanini, M., De Martino, C, Zamboni, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. Nature. 1967;216:173-174.
- 34. Aperia A, Broberger O, Thodenius K, Zetterström R. Developmental study of the renal response to an oral salt load in preterm infants. Acta Pediatr Scand. 1974;63:517-24.
- 35. Heinegard D, Tiderström G. Determination of serum creatinine by a direct colorimetric method. Clin Chim Acta. 1973;43:305-10.
- 36. Yasui M, Marples D, Belusa R, Eklof AC, Celsi G, Nielsen S, Aperia A. Development of urinary concentrating capacity: Role of aquaporin-2. Am J Physiol. 1996;271:F461-F461-8.
- 37. Hansell P, Göransson V, Odlind C, Gerdin B, Hällgren R. Hyaluronan content in the kidney in different status of body hydration. Kidney Int. 2000;58:2061-68.
- 38. Ginetzinsky AG. Role of hyaluronidase in the re-absorption of water in renal tubules: the mechanisms of action of the antidiuretic hormone. Nature. 1958;182:1958-9.
- 39. Iaina A, et al. Renal proton magnetic resonance and bound and free water distribution in the normal, angiotensin II-and ADH- infused rats, before and after Gd DTPA paramagnetic enhancement. Child Nephrol Urol. 1988-1989;9(1-2):6-10.
- 40. Sulyok E, Nyul Z. Hyaluronan-related limited concentration by the immature kidney. Med Hypotheses. 2005;65:1058-61.

. .