

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

PhD értekezés

Dr Nyul Zoltán

Pécs, 2007

Tartalomjegyzék

1 Bevezetés.....	5
2 Vizsgálatok.....	7
2.1 Az endogén ouabain-szerű anyag csökkent renális kiválasztása NaCl szupplementált koraszülöttekben.....	7
2.1.1 Háttér.....	7
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 neonatalis nyulakban: a szöveti hyaluronsav jelentősége.....	13
2.2.1 Háttér.....	13
2.2.2 Anyag és módszer	14
2.2.2.1 Vizsgálati csoport	14
2.2.2.2 Módszer	14
2.2.2.2.1 HA meghatározás	14
2.2.2.2.2 NMR spectroscopia	15
2.2.2.2.3 Matematikai analízis	15
2.2.2.3 Statisztikai analízis	15
2.2.3 Eredmények	16
2.2.3.1 Az agyszövet víztartalmának H1-NMR relaxációs vizsgálata.....	16
2.2.3.2 A tüdő víztartalmának H1-NMR relaxációs vizsgálata	20
2.3 Pyeloureteralis obstrukcióval született gyermekek stenoticus ureterszakaszainak vizsgálata: emelkedett endothelin-1 és csökkent adrenomedullin mRNS expresszió.	23
2.3.1 Háttér.....	23
2.3.2 Anyag és módszer	24
2.3.2.1 Vizsgálati csoport	24
2.3.2.2 RNS-extractio es reverse transcriptio	24
2.3.2.3 Real-time PCR	24
2.3.2.4 Immunhisztokémia	25
2.3.3 Eredmények	27
2.3.3.1 Génexpresszió.....	27
2.3.3.2 Immunohistochemia	27
2.3.3.2.1 Kontroll szövetminták	27
2.3.3.2.2 Stenoticus ureter szövetminták.....	28
2.4 Vizelet aquaporin-2 kiválasztás koraszülött és érett újszülöttekben	29
2.4.1 Anyag és módszer	29
2.4.1.1 Vizsgálati csoport	29
2.4.1.2 Módszer	30

2.4.1.3 Analízis	30
2.4.2 Eredmények	30
2.5 Az éretlen vese csökkent koncentrálókéessége és a szöveti hyaluronsav (HA).....	34
3 Összefoglalás	36
4 Irodalom.....	39

Rövidítések jegyzéke

ADH	antidiureticus hormon
AM	adrenomedullin
AQP	aquaporin
AVP	arginin-vasopressin
EDLF	endogén digoxin-szerű faktor
ET-1	endothelin-1
GAG	glycosaminoglycan
GAPDH	glyceraldehyd-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 neonatológiai 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 - élettani és klinikai jelentőségét tanulmányozta.

Az Értekezésben összefoglalt vizsgálatainkkal az endogén ouabain-szerű anyag neonatális 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

kívántuk tisztázni. Különös figyelmet fordítottunk annak megismerésére is, hogy a húgyutak normális működésének fenntartásában milyen szerepet játszanak azok az autokrin/parakrin módon ható vasoaktív anyagok, melyek expressziója az egészséges ureterben kimutatható (endothelin-1, adrenomedullin, nitrogén monoxid, neuropeptid-Y). Vizsgálatainkat modern laboratóriumi módszerek felhasználásával (RIA, HPLC, ¹H-NMR spectroscopia, real-time PCR, immunohistochemia) széleskörű 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 vasoaktív hormonok kvantitatív 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 keresztül vasoconstrictiot és a vese tubularis Na reabsorptiójának 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 ürül és koncentrációja arányos a veseszövetben mért EDLF tartalommal [11].

A plasma EDLF koncentráció fordított arányosságot mutat a gestatiós és postnatalis korrall 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.

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), gestatio kor: 30,4 hét (29-33 hét)/ és a kontroll csoport /Group NS, átlagos születési súly: 1537g (1250-1810g), gestatio 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 vizsgálat sorozat 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 H₂O, 10 ml metanol, 10 ml H₂O 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 sorozathígítással 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 hígítású 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 gamma-globulinnal (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 hozzáadás 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 immunreaktivitás 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/trifluoecetsav 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 frakciókat gyűjtöttünk [15].

2.1.2.3 Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéshez Student tesztet használtunk.

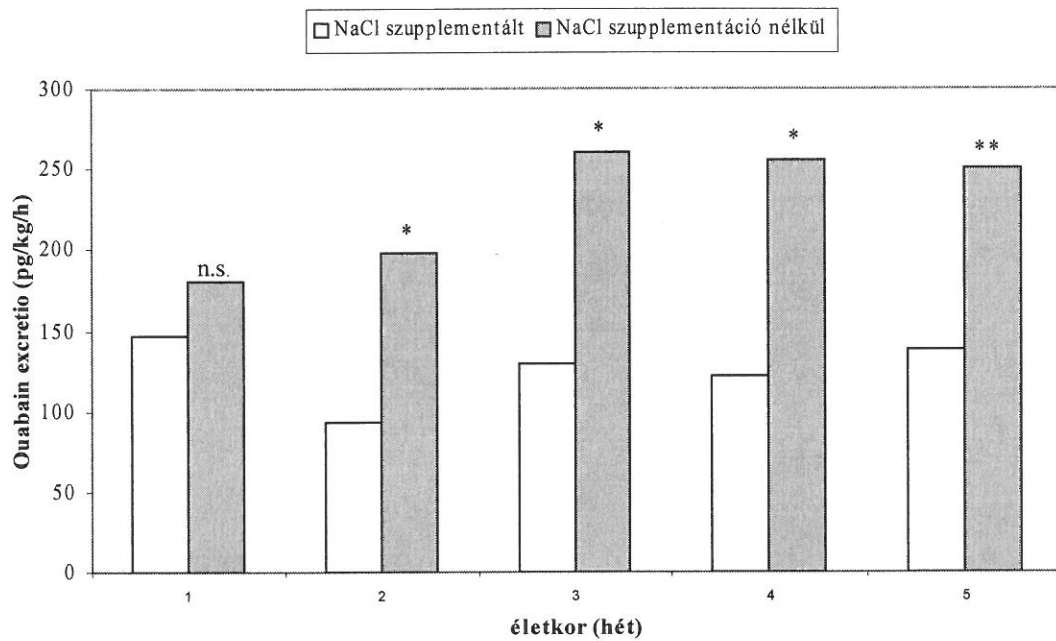
2.1.3 Eredmények

Alacsony sóbevitel esetében negatív Na egyensúly alakult ki a 4. hét végére, melyet a plasma Na-szint 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.

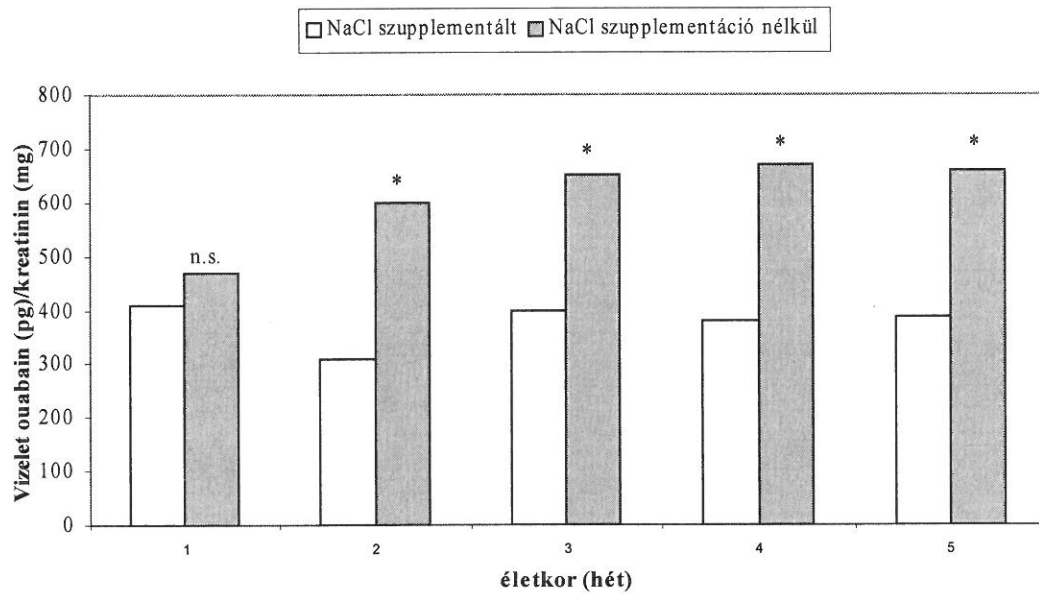
A szupplementációt megelőzően mindkét vizsgálati csoportban hasonló ouabain excretiót észleltünk. A kontrollcsoportban (Group NS) a vizelet ouabain az 1. héten mért 180 ± 9.7 pg/kg/h-ról szignifikánsan emelkedett a 3. héten regisztrált 260.1 ± 11 pg/kg/h-ig ($p < 0.01$), ezt követően azonban ezen a szinten 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.,



* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

A fenti megfigyelésekhez hasonlóan 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 H^1 -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 transmembrán 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 háttérében 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 sejtközzötti matrixot alkotó és a folyadék motilitást meghatározó glycosaminoglycan (GAG) molekulák fő komponense a hyaluronsav, amely nagyszámú hydrofil kötőhelye a sejtközzötti 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 (H^1 -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 letális dózisú subcutan pentobarbitállal elaltattuk, majd az összes víztartalom meghatározás, NMR relaxatio idő és szöveti hyaluronan (HA)-mérés céljából agymintákat illetve tüdő szövetmintákat nyertünk. A vízterekben lezajló postmortem változások elkerülése céljából 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 és 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 CaCl₂, 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 T_1 relaxációs idő. Az ismétlési időt a T_1 5-szörösének tekintettük. A T_2 relaxációs 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 relaxációs 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 relaxációs hányadossal rendelkező, egymástól független vizeket tartalmaz, ezen függvény multiexponenciális egyenlettel leírható. A (T_{21} és T_{22} relaxációs görbével jellemzett) kötött és szabad vízkompartmentek meghatározására biexponentialis illesztést használtunk. A T_2 relaxációs görbék két komponensét az alábbi egyenlettel kaptuk.

$$F = k_1 \times e^{-t/T_{21}} + k_2 \times e^{-t/T_{22}}$$

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 H^1 -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 T_1 , T_2 relaxációs idők hasonló trendet mutattak; a T_1 1524 ± 101 ms és 1494 ± 50 ms között változott a foetalis periódusban, majd 1382 ± 84 ms-ra csökkent postnatalisan ($p < 0.001$). A T_2 relaxációs idő postnatalis esését (200.6 ± 7.1 ms, $p < 0.001$) 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 T_2 relaxációs görbe biexponenciális elemzése lehetővé teszi a kötött és szabad vízfrakciókat jellemző gyors (T_{21}) illetve lassú (T_{22}) komponensekre való bontást. Az 1. Táblázatban tüntettük fel a relaxációs időket és a T_2 görbe biexponenciális illesztéséből levezethető agyszöveti szabad és kötött vízfrakciókat. Látható, hogy a T_{21} a gestatios 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 T_{22} 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 ± 8.4 ms-os (postnatalis 4. nap, $p < 0.001$) értékekig. Ennek eredményeképp, a T_{21} relaxációs komponenssel reprezentált kötött vízfrakció a 25. napon a teljes agyszöveti víztartalom $4.4 \pm 1.8\%$ -át tette ki, majd a 29. napon elérve a $19.3 \pm 26.2\%$ -os maximális értéket ($p < 0.01$) fokozatosan süllyedt $6.8 \pm 8.0\%$ -ig (31. nap) illetve $4.6 \pm 5.3\%$ -ig (postnatalis 4. nap, $p < 0.05$).

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

	Nedves/száraz súly arány	Hyaluronsav (μ g/g száraz súly)	T_1 (ms)	T_2 (ms)
Gestációs kor (nap)				
25	9.6 $\pm$ 0.3	2095 $\pm$ 273.4	1524 $\pm$ 101.0	229 $\pm$ 10.4
27	9.3 $\pm$ 0.2**	1541 $\pm$ 168.8***	1494 $\pm$ 50.5**	233 $\pm$ 7.1
29	9.2 $\pm$ 0.2***	1527 $\pm$ 316.0***	1512 $\pm$ 72.8**	231 $\pm$ 17.7
31	9.1 $\pm$ 0.3***	1826 $\pm$ 292.0*	1508 $\pm$ 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 gestációs kor értékeihez viszonyított szignifikanciaviszonyok:

- * $p < 0.05$
- ** $p < 0.01$
- *** $p < 0.001$

Miközben az agyszövet teljes víztartalma a gestációs időszakban a 29-31. nap között mindössze 0.8%-kal mérséklődött, az ennek megfelelő T_2 relaxációs idő csökkenése 4.6%-os volt. A T_{21} -ből származtatott kötött vízfракció 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 gestációval összefüggő változásait a 2. Táblázatban tüntettük fel. A 25. napon észlelt 2095 $\pm$ 273.4 μ g/g magas HA koncentráció jelentősen csökkent a 27. (1541 $\pm$ 168.8 μ g/g, $p < 0.001$) és a 29. napra (1527 $\pm$ 316.0 μ g/g, $p < 0.001$); ezt követően átmeneti emelkedést regisztráltunk (1826 $\pm$ 292.0 μ g/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 μ g/g, $p < 0.001$) ért el.

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

		T_{21} (ms)	T_{21} (%)	T_{22} (ms)	T_{22} (%)
Gestációs 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 kor (nap)					
	4	92.6 $\pm$ 28.8	4.6 $\pm$ 5.3*	206.0 $\pm$ 8.4**	95.4 $\pm$ 5.3*

A 25. napos gestációs kor értékeihez viszonyított szignifikanciaviszonyok:

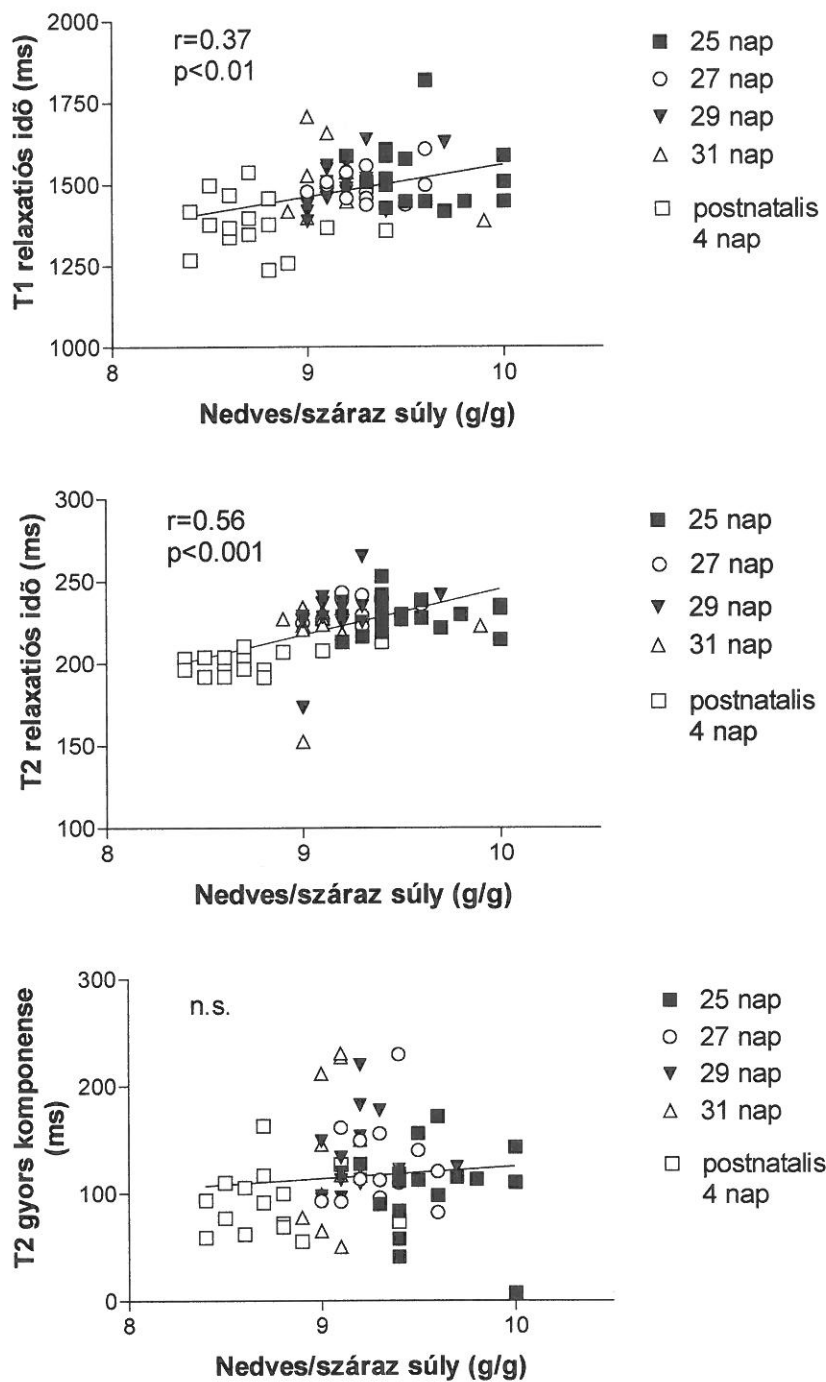
* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

*** $p < 0.001$

A teljes agyszöveti víztartalom és a relaxációs 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 relaxációs idővel ($r=0.56$, $p<0.001$), 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) relaxációs idők összefüggései.



2.2.3.2 A tüdő víztartalmának H^1 -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 (5.9 ± 0.3 , $p < 0.001$) volt mérhető. Hasonló tendenciák észlelhetők a T_1 , T_2 relaxációs idők vonatkozásában, amennyiben átmeneti emelkedést (1300 ± 100 ms T_1 és 191.5 ± 25.8 ms T_2 a 25. praenatalis napon; 1430 ± 80 ms T_1 / $p < 0.001$ / és 248.5 ± 19.2 ms T_2 / $p < 0.001$ / a 27. napon) követően mindkét érték csökkent (3. Táblázat).

A T_2 relaxációs görbe biexponenciális analízisével elkülönített kötött (T_{21}) és szabad (T_{22}) 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%-át tette ki a kötött fractio, amely a 31 napon $21.6 \pm 8.0\%$ -ra ($p < 0.001$), a postnatalis 4. napon $16.6 \pm 9.4\%$ -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 ± 32.4 pg/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 T_1 ($r = 0.87$, $p < 0.001$) és a T_2 ($r = 0.93$, $p < 0.001$) relaxációs időkkel valamint a T_2 analízisével számított kötött (T_{21}) vízfractionnal ($r = 0.67$, $p < 0.001$).

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

	Nedves/száraz súly arány	Hyaluronsav (μ g/g száraz súly)	T_1 (ms)	T_2 (ms)
Gestációs kor (nap)				
25	8.9 $\pm$ 0.5	870.8 $\pm$ 205.2	1300 $\pm$ 100	191.4 $\pm$ 25.8
27	10.1 $\pm$ 0.5***	573.2 $\pm$ 219.2***	1430 $\pm$ 80**	248.5 $\pm$ 19.2***
29	8.8 $\pm$ 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***

	T_{21} (ms)	T_{21} (%)	T_{22} (ms)	T_{22} (%)
Gestációs kor (nap)				
25	97.7 $\pm$ 11.7	32.7 $\pm$ 7.3	246.6 $\pm$ 39.4	67.3 $\pm$ 7.3
27	113.6 $\pm$ 9.7**	34.0 $\pm$ 5.5	325.3 $\pm$ 41.2***	66.0 $\pm$ 5.5
29	102.6 $\pm$ 7.9	31.8 $\pm$ 6.1	271.7 $\pm$ 27.1	68.2 $\pm$ 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 (nap)				
4	50 $\pm$ 13.4***	16.6 $\pm$ 9.4***	121.2 $\pm$ 20.6***	83.4 $\pm$ 9.4***

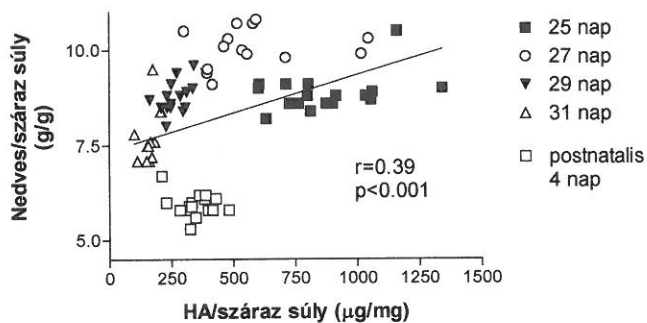
A 25. gestációs kor értékeihez viszonyított szignifikanciaviszonyok:

- * $p < 0.05$
- ** $p < 0.01$
- *** $p < 0.001$

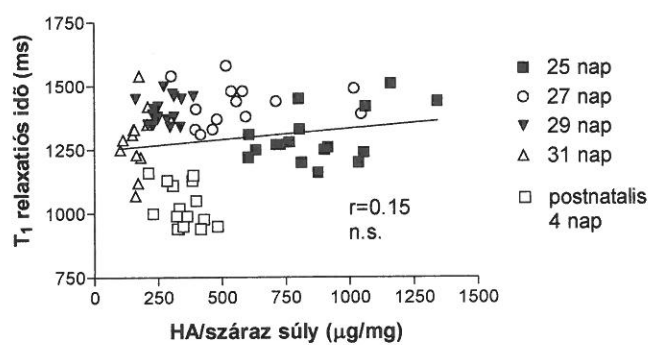
A HA-koncentráció csak a teljes szöveti víztartalommal korrelált ($r=0.39$, $p<0.001$), a T_1 ($r=0.15$, n.s.), T_2 ($r=0.22$, n.s.) relaxációs időktől és a T_{21} komponenstől ($r=0.24$, n.s.) függetlennek bizonyult (3. Ábra).

3. ábra A tüdőszövet hyaluronsav koncentrációja (HA) a teljes szöveti víztartalom (a.), a T_1 (b.), T_2 (c.) és T_{21} (T_2 gyors komponense, d.) relaxációs idők függvényében

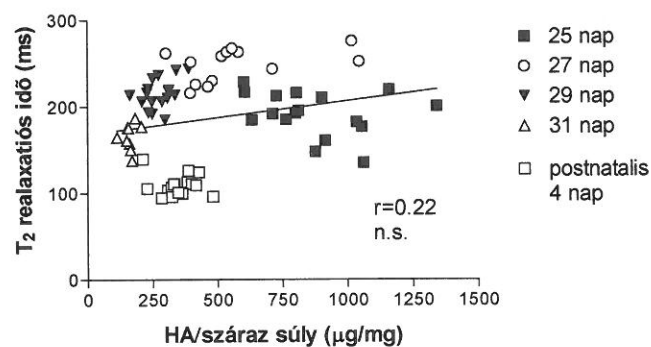
a,



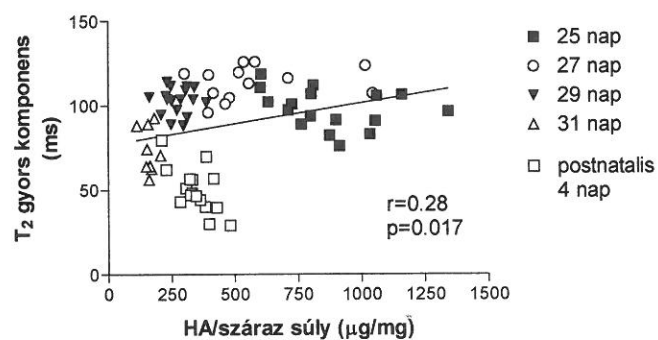
b,



c,



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 relaxációs 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 neuronális (nNOS), endothelialis (eNOS) és indukálható (iNOS) génjének mRNS expresszióját. Kontrollként glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase (GAPDH), CD31, simaizom-actin (Smactin) és a neuronális 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 radiológiai, scintigraphiai leletekre alapult. Kontrollszövetként tumor nephrectomián /n:7, átlagéletkor: 73 év (56-84 év)/ vagy hólyagtumor resectián 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 39°C-on 60 percig reverse transcriptiónak vetettük alá.

2.3.2.3 Real-time PCR

A génexpresszió monitorizálására real-time PCR analízist [31] használtunk. A kvantitatív 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 fluoreszcencia emissziót. Az analízis célja meghatározni az ún. 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 Reagents kit, Perkin Elmer) és protokollt használtuk. A 25 μ l reakció elegy (master mix) 300 nM primert, 200 nM Tag Man hibridizációs probát, valamint 2,5 μ l cDNA-t (reverse transcriptio elegy) tartalmazott. A vizsgált célszekvenciákhoz (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 μ m-s metszeteket készítettünk (Frigocut 2800 E, Leica, Bensheim, Németország). A metszeteket króm-alumíniummal bevont lemezekre rögzítettük és a biotin-streptavidin híd technikát alkalmazva immunhisztokémiához 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 véletlenszerűen 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 különbözött 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.

	n	Kontroll átlag	SEM	n	Stenoticus ureter 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<0.001

2.3.3.2 Immunohistochemia

2.3.3.2.1 Kontroll szövetminták

Az urothelium AM, NOS-I és PGP9.5 ellen mutatott immunoreaktivitást. nNOS és AM- reaktivitás 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 immunoreaktivitás nem volt kimutatható. PGP9.5-immunoreaktiv 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 immunoreaktivitás mellett számos NPY-pozitív 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 sejteiben a sejtmembrán 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 obstrukciós 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 immunreaktív 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 gestatio kor 30.6 hét /30-32/; átlagos születési súly: 1570g /1480-1670/) és terminusra született 9 egészséges újszülött (átlagos gestatio kor 39.2 hét /37-40/; átlagos születési súly: 3218g /2760-4270/) képezte. Mindkét csoport újszülöttjeinek testsúlya a gestatio korra számított 10-es és 90-es percentil közé esett. A gestatio 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 vizsgálati sorozatban a 7. életnapon majd hetente 6 hetes korig vettek részt. A napi folyadékbevitel (158-195ml/kg) eléréséhez az anyatejes táplálás kiegészítésére szintén 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].

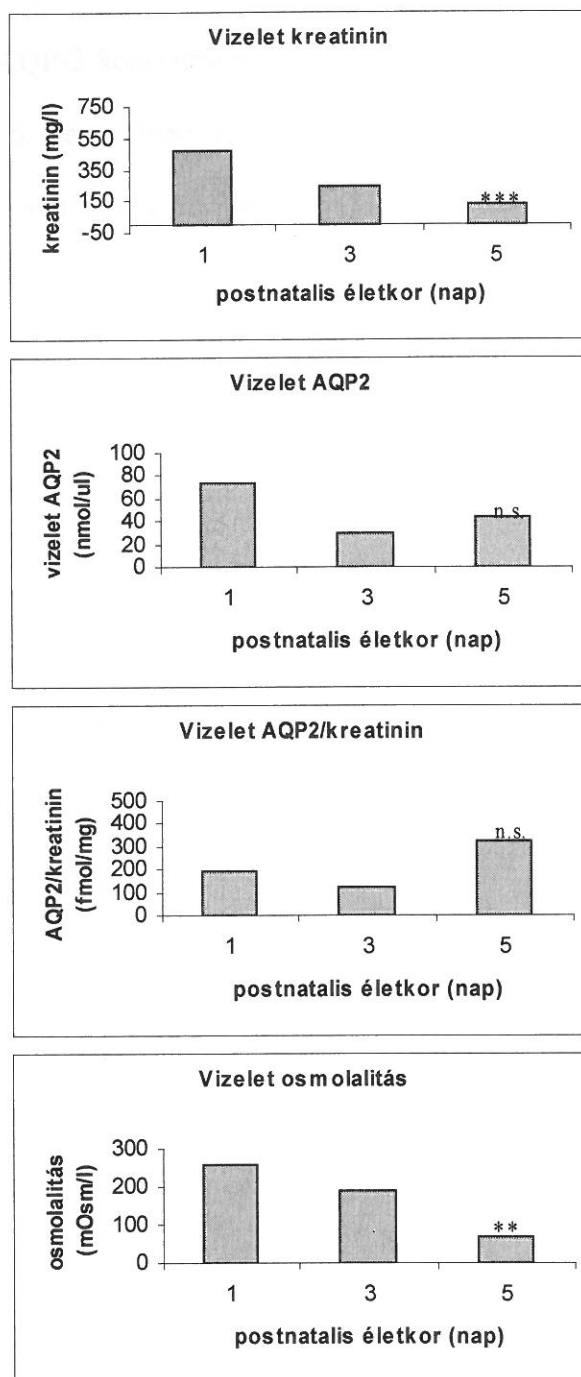
2.4.1.3 Analízis

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

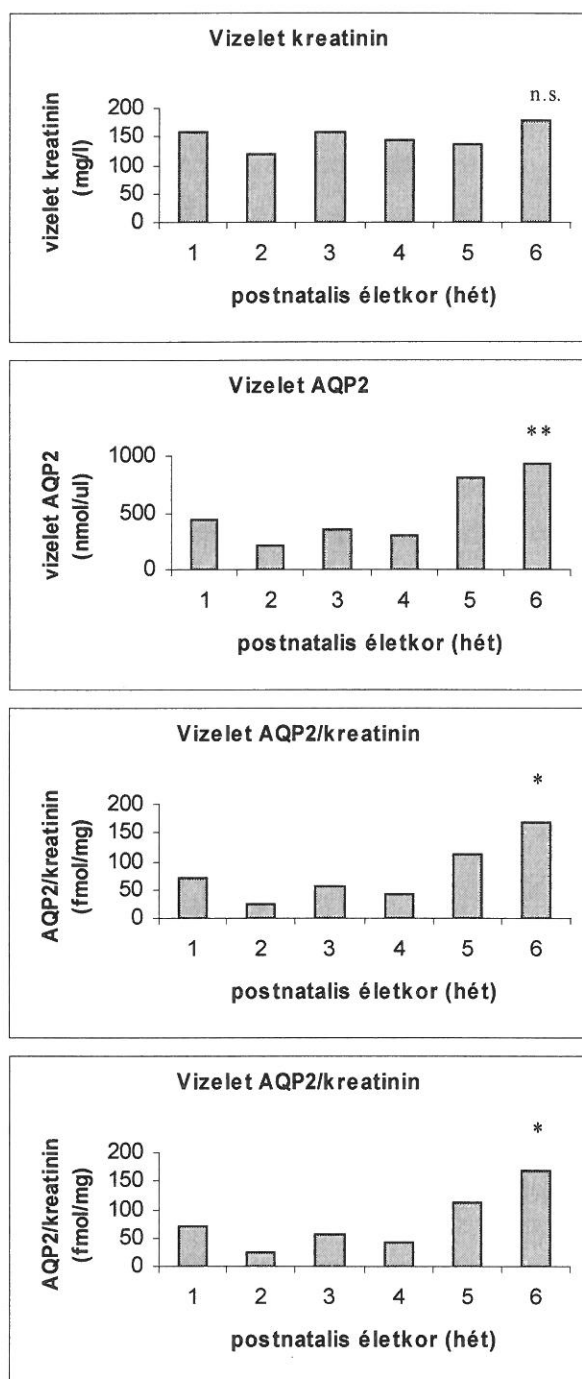
4. ábra. Érett újszülöttek vizelet kreatinin, AQP2 koncentrációja, a kreatininre korrigált AQP2 kiválasztás és vizelet osmolalitása.



** $p < 0.01$
 *** $p < 0.001$

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 excretiójában 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).

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 koncentrálókéessége és a szöveti hyaluronsav (HA)

Irodalmi adatok alapján elsőként vetettük fel annak lehetőségét, hogy a foetalis/neonatalis vese csökkent koncentrálókéességeért 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 hidráltóságának 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 vízdiuresis esetén rendkívül alacsony, ezzel szemben az antidiuresist az enzim aktivitásának 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 koncentrálas mechanizmusában, hogy Iaina és mtsai ADH-kezelt állatokban a vese medulla H^1 -NMR spektroszkópiás vizsgálatával a T_2 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 koncentráció 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 koncentráció képesség [40]. Az indirekt adatok alapján feltételezett mechanizmust folyamatban lévő vizsgálatainkkal kívánjuk igazolni. Egyrészt egyidejűleg meghatározzuk a különböző gestációs és postnatalis korú állatok renális koncentrációképességét és HA tartalmát, másrészt különböző hidráltási 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 renin-angiotensin-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, H^1 -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 motilitású

komponensnek a perinatalis időszakban bekövetkező párhuzamos emelkedését. Az agyszövet vizsgálatakor kapott eredményhez hasonlóan a tüdő vonatkozásában sem találtunk összefüggést a kötött motilitású vízfraction 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 koncentrálókéesség fontos limitáló tényezője és szerepet játszhat az újszülött excesszív vízkészleteinek kiürítésében és a sikeres postnatalis adaptáció feltételeinek biztosításában.

Számos paracrin/autocrin módon ható vazoaktív hormon, peptid illetve ezek szintézisét végző enzim mutatható ki az urogenitalis tractusban, melyek szerepe még tisztázatlan. A congenitalis ureter obstrukcióval 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

1. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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

Egyéb közlemények

1. 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
2. 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
3. Nyul Z, Hadzsiev K, Andrásófszky 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 Ca^{2+} -stores and cell responsiveness. Am J Physiol. 1993 Jun;264(6 Pt 1):C1367-87.
4. Doris PA. Regulation of Na,K-ATPase by endogenous ouabain-like materials. Proc Soc Exp Biol Med. 1994 Mar;205(3):202-12.
5. Nicholls MG, Richards AM, Lewis LK, Yandle TG. Ouabain: a new steroid hormone? Lancet. 1995 Nov 25;346(8987):1381-2.

6. Hamlyn JM, Manunta P. Ouabain, digitalis-like factors and hypertension. *J Hypertens Suppl.* 1992 Dec;10(7):S99-111.
7. 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.
8. 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.
10. 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.
11. 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.
14. Butler UP, Tse-Eng D. Immunoassay of digoxin and of the cardiac glycosides. In: *Methods in Enzymology.* 1982;84:558-573.

15. Worgall S, Hanze J, Wagner R, et al. Characterization of ouabain-like immunoreactivity in human urine. *J Hypertens.* 1996 May;14(5):623-8.
16. 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.
18. Comper WD, Laurent TC. Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol Rev.* 1978;58(1):255-315.
19. Ganger HJ. Physiological properties of the extracellular matrix. In Hargens AR (ed) *Tissue Fluid Pressure and Composition.* Williams and Wilkins, Baltimore pp 43-61.
20. 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 N-terminal 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, Tengblad A: Determination of hyaluronate in biological samples by a specific radioassay technique. *Anal Biochem.* 1980;109:386-394.
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. Wattoo 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.
 28. 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.
33. 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, Odland 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.