

**Húgyhólyag kontraktilitás szabályozása egészséges és kóros körülmények  
között**

Egyetemi doktori értekezés

2006

Dr. Széll Enikő Ágnes

Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum,

Gyermecklinika

Tartalomjegyzék	2. oldal
1. Bevezetés és célkitűzések	3. oldal
1.1. Általános megfontolások	3. oldal
1.1.1. Kapcsolat a humán húgyhólyag és a patkány húgyhólyag működése között	4. oldal
1.1.2. Az vizeletürítési mechanizmus idegi kontrolljának kialakulása	5. oldal
1.1.3. Az alsó vizeletelvezető traktus idegi kapcsolatai	7. oldal
1.1.4. A húgyhólyag simaizomzat élettana	12. oldal
1.1.5. A húgyhólyagban kialakuló spontán kontrakciók	14. oldal
1.1.6. Az „overactive bladder” (fokozott húgyhólyagműködés, OAB) és a húgyhólyag inkontinencia (UI) definíciója	16. oldal
1.1.7. A fokozott húgyhólyagműködés előfordulása csecsemő és gyermekkorban	18. oldal
1.2. Célkitűzések	20. oldal
2. Módszerek	22. oldal
2.1. Kísérleti állatok	22. oldal
2.2. A patkány húgyhólyag izolálása	22. oldal
2.3. Fagyasztás	22. oldal
2.4. Kontraktilitás mérés és kísérleti protokollok	23. oldal
2.5. Alkalmazott farmakonok	24. oldal
2.6. Acetilcolin-felszabadulás mérése	24. oldal
2.7. A spontán kontrakciók analízise	25. oldal
2.8. Statisztikai módszerek	26. oldal
3. Eredmények	27. oldal
3.1. Az adrenerg receptorok vizsgálata	27. oldal
3.1.1. A phenylephrin válasz időfüggése	27. oldal
3.1.2. Az $\alpha_{1A}$ adrenerg receptorok specifikus gátlószereinek hatása a phenylephrin által serkentett idegi kontrakciókra, valamint a bazális tónusra	28. oldal
3.1.3. Az chloroethylclonidin (CEC) hatása a pre- és postjunctionalis phenylephrin-válaszra	29. oldal
3.1.4. Az $\alpha_{1A}$ és $\alpha_{1B/1D}$ receptorok gátlásának hatása a phenylephrin által fokozott acetilkolin-felszabadulásra	30. oldal
3.2. A spontán kontrakciók vizsgálata	31. oldal
3.2.1. Az újszülött patkány húgyhólyag spontán kontrakciók amplitúdó és frekvencia értékeinek vizsgálata	31. oldal
3.2.2. A tetrodotoxin és az atropin hatása a patkány húgyhólyag spontán kontrakciók amplitúdó és frekvencia értékeire	34. oldal
3.2.3. Carbachol hatása a patkány húgyhólyag spontán kontrakciók amplitúdó és frekvencia értékeire	36. oldal
3.2.4. A spontán kontrakciók nemlineáris analízise	38. oldal
3.3. A fagyasztás hatása a húgyhólyag funkciójára	40. oldal
3.3.1. A fagyasztás hatása a teljes húgyhólyag működésére	40. oldal
3.3.2. A különböző ingerfrekvenciák hatása az ép és a fagyasztást elszenvedett húgyhólyagban	41. oldal
3.3.3. A maximális kontrakció és relaxáció az ép és a fagyasztást elszenvedett húgyhólyagban	42. oldal
3.3.4. Az atropin hatása a kontrakcióra az ép és a fagyasztást elszenvedett húgyhólyagban	43. oldal
3.3.5. Az $\alpha$ - $\beta$ -mATP hatása a kontrakcióra az ép és a fagyasztáson átesett húgyhólyagban	43. oldal
4. Megbeszélés	44. oldal
4.1. Az adrenerg receptorok altípusainak feltérképezése a patkány húgyhólyagban	44. oldal
4.2. A húgyhólyagban kialakuló spontán kontrakciók vizsgálata	48. oldal
4.3. A fagyasztás hatása a húgyhólyag funkciójára	53. oldal
5. Összefoglalás-Summary	58. oldal
6. Köszönetnyilvánítás	60. oldal
7. Irodalomjegyzék	61. oldal
8. Közleménylista, önéletrajz	68. oldal

## **1. Bevezetés és célkitűzések**

### **1.1. Általános megfontolások**

A húgyhólyagműködés zavarainak vizsgálata nem tartozik az intenzíven tanulmányozott szakterületek közé a magyar orvostudományban, pedig a különböző életkorokban előbb-utóbb nagyon sokan szembesülnek azzal, hogy a húgyhólyagműködésben bekövetkező zavarok mennyire befolyásolják és megnehezítik az életvitelt. Elég csak a gyermekkorban jelentkező éjszakai ágybavizelésre, a terhesség kapcsán jelentkező vizelettartási problémákra, a férfiakban prosztatata hyperplasia melléktüneteként jelentkező sürgető vizeletürítésre, vagy az alsó húgyutak gyulladásakor megjelenő panaszokra gondolnunk. Mindezek miatt még inkább érthetetlennek tűnik a terület elhanyagolt volta. Napjainkban azonban -leginkább az amerikai és a nyugat-európai területeken- kezd megváltozni a helyzet. Egyre több gyógyszeripari cég, leginkább a prosztatabetegségek, valamint az impotencia kezelése miatt, ösztönözni kezdte a húgyhólyaggal kapcsolatos kutatásokat. A fellendülő experimentális innováció maga után vonta a húgyhólyaggal kapcsolatos élettani és farmakológiai ismeretanyag robbanásszerű növekedését, és többek között olyan érdekes dolgokra világított rá az utóbbi néhány évben, mint a húgyhólyag simaizomzatának régió-függő módosulása, illetve az uroepithelium és a simaizomzat közötti információcsere (Christ és Liebert, 2005, Szigeti és *mtsai*, 2005). Az egyre bővülő tudásunk pedig lehetőséget teremthet a húgyhólyagbetegségek etiológiájának megértésére, illetve az oki terápia kidolgozására is (Boselli és *mtsai*, 2001, Mostwin, 2002, Chess-Williams, 2004).

Munkám során a patkányhúgyhólyagot, mint állatkísérletes modellt használtam különböző élettani, farmakológiai és terápiás hatások tanulmányozására. Vizsgáltam az adrenerg receptorok altípusait és funkcióit a húgyhólyagkontrakciók szabályozásában, a húgyhólyag spontán kontraktilitásának az életkor szerenti és a húgyhólyagterület-függő módosulásait, valamint egy lehetséges terápiás beavatkozás, a cryoinjury (fagyasztás) hatását.

### **1.1.1. Kapcsolat a humán húgyhólyag és a patkány húgyhólyag működése között**

Az általam vizsgálni kívánt húgyhólyagfunkciók és életkorfüggő változások humán húgyhólyagon történő kivitelezésének nehézségei indokolták, hogy ezen folyamatokat állatmodellen vizsgáljam meg. Napjainkban a két leginkább elfogadott állatmodell a húgyhólyagbetegségek tanulmányozására a patkány (Rosenblatt és Lehrman, 1963, Maggi és *mtsai*, 1984) és a macska (de Groat és *mtsai*, 1975) húgyhólyagja. Mivel az életkorfüggő változások sokkal egyszerűbben és olcsóbban tanulmányozhatók patkányokban, ezért ezt a rágcsálót választottam kísérleteim alanyául. Patkány esetén az újszülött állatokban, a postnatalis élet korai szakaszában, a vizeletürítést egy somato-visceralis reflex szabályozza. Ez akkor aktiválódik, amikor az anya megnyalja az újszülött perinealis testtájékát (Rosenblatt és Lehrman, 1963, Maggi és *mtsai*, 1984 és 1986). A postnatalis fejlődés során ez a primitív reflex kicserélődik egy akaratlagosan szabályozott vizeletürítést biztosító supraspinalis mechanizmusra, amelynek az alapját egy húgyhólyag eredetű viscerovisceralis reflex jelenti (de Groat és *mtsai*, 1975 és 1998, Maggi és *mtsai*, 1986). Patkányokban ez a vizeletürítési reflexben bekövetkező módosulás időben ugyanakkor következik be, amikor a neurotranszmisszióban, valamint a húgyhólyag simaizomsejtjeiben is jelentős változások zajlanak (de Groat és *mtsai*, 1998, Szigeti és *mtsai*, 2005). Tudjuk, hogy az egyedfejlődés során mind a serkentő, mind a gátló idegrendszeri mechanizmusok megváltoznak (Oh és *mtsai*, 2000, Longhurst, 2004, Szigeti és *mtsai*, 2005). Míg az egy-kéthetes patkányok húgyhólyagműködését a kolinerg mechanizmusok, addig az idősebb állatok húgyhólyagkontrakcióit leginkább a purinerg folyamatok szabályozzák (Hourani, 1999, Kageyama és *mtsai*, 2000, Yoshida és *mtsai*, 2001), amelyeket ráadásul az adrenerg (Mattiasson és *mtsai*, 1987, de Groat és *mtsai*, 1999) és egyéb hatások (pl. szerotoninerg, Testa és *mtsai*, 2001) is befolyásolhatnak, módosíthatnak.

Fiziológias körülmények között az újszülött patkányokból izolált húgyhólyag képes nagy amplitúdójú, szabályos kontrakciókat létrehozni (Maggi és *mtsai*, 1986), amelyek arra

utalnak, hogy a húgyhólyag pacemaker aktivitással rendelkezik (Shafik és *mtsai*, 2004). Ez azt is jelenti, hogy a húgyhólyag képes a létrehozott elektromos jelet a szerv egészére, rendszerezetten elvezetni. Ez az aktivitás biztosítja, hogy a fejlődésben lévő, központi kontrollal egyelőre még nem rendelkező húgyhólyagban is organizált kontrakciók, és ezáltal a szerv szintjén szabályozott vizeletürítés jöjjön létre (Szigeti és *mtsai*, 2005). Ezzel szemben a kifejlett állatokból kivett húgyhólyag minimális amplitúdójú, szabálytalannak tetsző intrinsic aktivitást mutat (Maggi és *mtsai*, 1986). Ez a spontán aktivitás típus hozzájárul a húgyhólyag tárolóképeségének kifejlődéséhez, és ezáltal az idegi mechanizmusok által szabályozott tökéletes vizeletürítés kialakulásához (de Groat, 2002).

Fontos kiemelni, hogy a patkány húgyhólyag a korai postnatalis élet során az ún. „túlstimulált, overaktív” vagy „fokozott aktivitással bíró, instabil” húgyhólyag (overactive bladder, OAB) képét mutatja (Mills és *mtsai*, 2000, Fry és *mtsai*, 2004). Ez az elváltozás emberben igen gyakran megfigyelhető, fiziológiásan gyermekkorban a húgyhólyag fokozott érzékenysége miatt, esetleg húgyuti-infekció következtében, édesanyákban szülés után, férfiakban prosztatabetegségek kapcsán és harántlézió szövödményeként. Mindezek következtében a patkány húgyhólyag szabályozási folyamatainak feltérképezése, mint állatmodell, alapvető jelentőségű lehet az emberekben kialakuló „túlstimulált” húgyhólyag mechanizmusának megismerésében, és terápiájának továbbfejlesztésében.

### **1.1.2. Az vizeletürítési mechanizmus idegi kontrolljának kialakulása**

Az OAB kialakulásának megértéséhez tudnunk kell az egészséges húgyhólyag működésének és szabályozásának részleteit is. A vizeletürítés idegi kontrolljának a kialakulása bonyolult és mind a mai napig nem teljesen tisztázott (Kruse és de Groat, 1990, Kruse és *mtsai*, 1990, Sugaya és de Groat, 1994, de Groat és *mtsai*, 1998, Sugaya és de Groat, 2002). A kontrollált ürítést megelőző időszakban is kimutathatók izomkontrakciók a húgyhólyagban, hiszen a fejlődő csecsemőben is kialakul egy koordinált húgyhólyag

összehúzódás, általában óránként egyszer. Ezek a kontrakciók azonban nagy valószínűséggel nem a gerincvelő által szabályozott reflex folyamatok, sokkal valószínűbb, hogy már ezek is az agytörzsben (híd, mesencephalon) lévő vizeletürítést szabályozó központ által meghatározottak. A gyermekekben az első és a harmadik életév között kialakul egy gátló kapcsolat az agykéreg és a hídban lévő vizeletürítést szabályozó központ között, aminek következtében a gyermekekben egyre ritkábban következnek be akaratlan vizeletürülések, miközben a húgyhólyag kapacitása is folyamatosan nő. Végül a tanulási folyamat végén kialakul egy teljes mértékben kontrollált vizeletürítési mechanizmus. Kezdetben a csak részlegesen kontrollált húgyhólyagürítést megelőzik az egyre fokozódó spontán izomösszehúzódások, amelyek ha az urethra szfinkter relaxációjával is együtt járnak, akkor változó mennyiségű és frekvenciájú akaratlan vizeletürüléshez vezethetnek az akaratlagos vizeletürítést még csak tanuló gyermekekben. A fokozott húgyhólyag aktivitás iránti érzékenység, valamint a kontrollált vizeletürítés folyamatának megértése, és az akaratlagos gátlás kialakítása különböző az egyes gyermekekben. Ez az alapja annak, hogy a gyermekek különböző életkorban válnak szobatisztává (de Groat, 2002, Longhurst, 2004).

A húgyhólyagürítés szabályozásában a következő lépcsőfok, amikor a központi idegrendszer fejlődésének előrehaladtával kialakul az az állapot, hogy a frontális lebeny kérgi területe képes akaratlagosan akkor is megindítani a vizeletürítést, amikor a húgyhólyag még nem telítődött teljesen vizelettel (de Groat, 2002, Longhurst, 2004).

A funkcionális módosulások hátterében organikus változások állnak, amelyek egyaránt jelentik a sejtek közötti neurotranszmisszióban (de Groat és Yoshimura, 2001, Yoshida és *mtsai*, 2001), valamint a sejten belüli jelátviteli folyamatokban bekövetkező fejlődést is (Baskin és *mtsai*, 1997, Ekman és *mtsai*, 2005, Ekman és *mtsai*, 2006). Bármily meglepő, de az embereknél az előbbieknél ismertetett folyamat nagyon hasonlóan képes végbemenni a patkányokban is (Kruse és de Groat, 1990, Kruse és *mtsai*, 1990, Sugaya és de Groat, 1994, de Groat és *mtsai*, 1998, Sugaya és de Groat, 2002, Longhurst, 2004).

### **1.1.3. Az alsó vizeletvezető traktus idegi kapcsolatai**

A vizelet tárolása és periódikus eltávolítása alapvetően két funkcionális egység, a húgyhólyag és a kivezető csőrendszer működésétől függ (Chancellor és Yoshimura, 2002, Fry és *mtsai*, 2004). A kivezető csőrendszer magában foglalja a húgyhólyag nyaki részét, az urethrát és az urethra szfinkter (belső, külső) izomzatát. Ezek a struktúrák a sacralis paraszimpatikus (n. pelvicus), a thoracolumbalis szimpatikus (n. hypogastricus és a szimpatikus dúclánc) és a sacralis somaticus idegek (n. pudendus) által szabályozottak (Chancellor és Yoshimura, 2002).

A sacralis paraszimpatikus mechanizmus a legjelentősebb vizeletürítést serkentő mechanizmus (Chancellor és Yoshimura, 2002). A kolinerg preganglionalis neuronok sejttestje a gerincvelő sacralis részének intermediolaterális részén található, míg az axonok a nervus pelvicus-on át jutnak el a vegetatív ganglionsejtekhez, majd a húgyhólyag falához. A ganglionokban a neurotranszmisszió nikotin típusú kolinerg receptorokon keresztül valósul meg, amelyet különböző mechanizmusok, többek között a muscarinos kolinerg, az adrenerg, a purinerg és a peptiderg receptorok aktiválódása módosíthat. A postganglionalis neurotranszmisszió a korábban említett preszinaptikus acetilkolin-felszabadulást moduláló folyamatok által, főleg M<sub>1</sub> muscarinos acetilkolin receptorokon keresztül szabályozott, amelyek nagy frekvenciájú, elnyújtott idegstimuláció hatására aktiválódnak (Maggi és *mtsai*, 1985, Somogyi és *mtsai*, 1994 és 1998). Ezeknek a receptoroknak az aktivációja nagymértékben fokozza a felszabaduló acetilkolin mennyiségét. A preszinaptikus muscarinos serkentés függ az intracelluláris szignalizációs folyamatoktól, leginkább a protein kináz C-től, valamint az L-típusú kalcium csatornák aktiválódásától (Somogyi és *mtsai*, 1996, Somogyi és *mtsai*, 1997). Ez a facilitáció típus a humán húgyhólyagban és a patkány húgyhólyagban egyaránt kimutatható. A patkány húgyhólyag kolinerg rostjain az  $\alpha$ -adrenerg serkentő, az M<sub>4</sub> muscarinos és a neuropeptid Y gátló receptorok egyaránt kimutathatóak. Ezáltal a perifériás

kolinerg szinapszisok több olyan mechanizmussal rendelkeznek, amelyek az idegi aktivitás intenzitásának és mintázatának létrejöttében és plaszticitásában igen fontos szerepet játszanak. Ez az alkalmazkodóképesség központi szerepet játszik a húgyhólyag vizeletet tároló, illetve kiürítő mechanizmusában (1.ábra) (Zoubek és *mtsai*, 1993, de Groat, 2002).

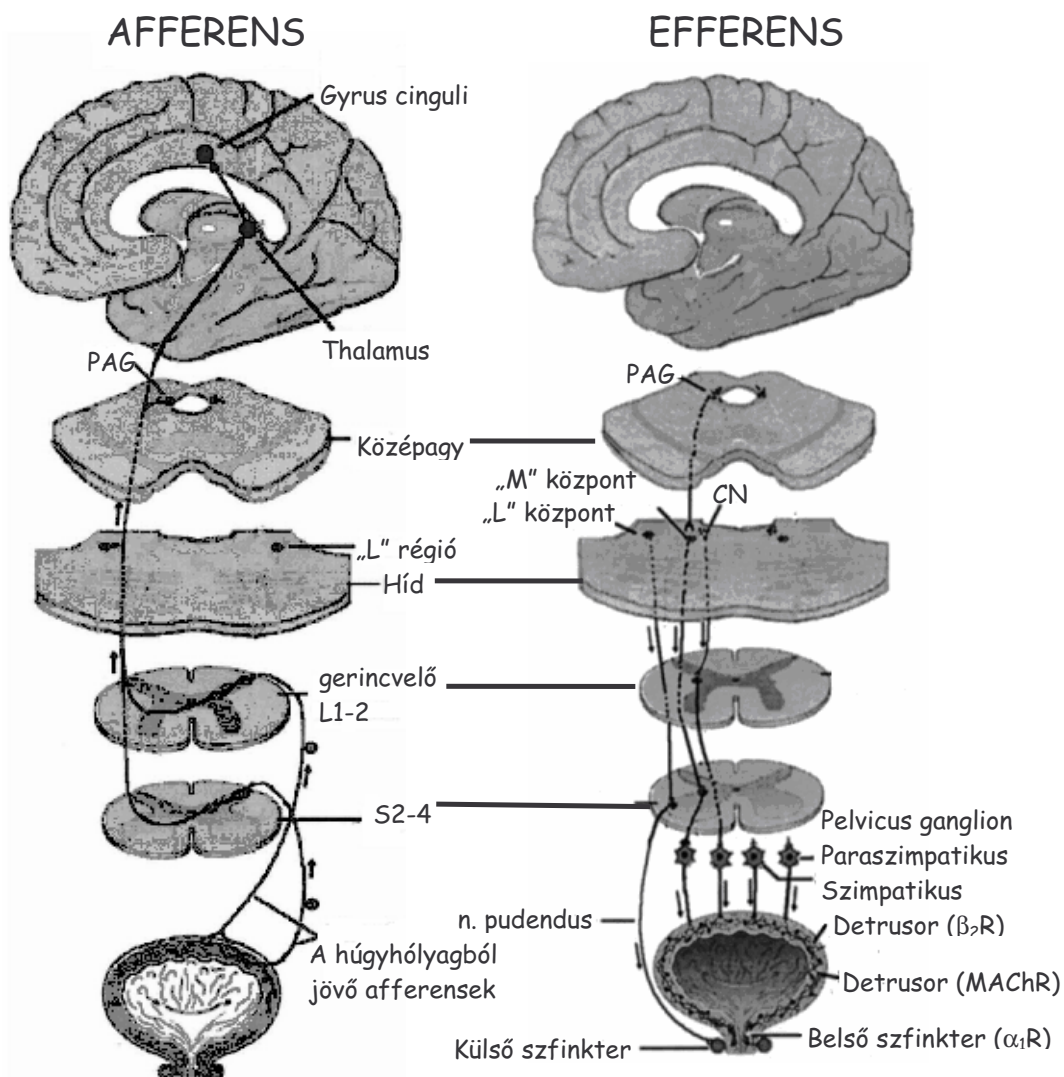
A külső urethra szfinkterhez menő somaticus efferens rostok szintén nikotinos kolinerg transzmisszióval rendelkeznek. A sejttestek a gerincvelő sacralis 3-4. szegmentumának elülső szarvában találhatóak, és a kilépő rostok a pudendalis ideget hozzák létre. A n. pudendus egyéb rostjai és más sacralis somaticus idegrostok a kismedence egyéb izmait is innerválják (1.ábra) (Chancellor és Yoshimura, 2002).

A szimpatikus preganglionalis rostok a Th11 és L2 gerincvelői szegmentumok között lépnek ki a gerincvelőből, és haladnak a szimpatikus dúclánchoz, ahonnan a felső hypogastricus és a pelvicus plexusba jutnak el, legvégül pedig a húgyhólyagot és az urethrát innerválják. A postganglionalis szimpatikus idegek noradrenalin szabadítanak fel, amely képes az urethra, valamint a húgyhólyag alapon található belső szfinkter simaizomsejtek kontrakciójának serkentésére, valamint a húgyhólyag többi részén található simaizomsejtek működésének gátlására (Somogyi és de Groat, 1990). A noradrenalin (NA) a húgyhólyagot beidegző paraszimpatikus ganglion működését egyaránt képes serkenteni ( $\alpha_1$ ) és gátolni ( $\alpha_2$ ) (1.ábra) (Somogyi és de Groat, 1990, Somogyi és *mtsai*, 1995, Yamamoto és *mtsai*, 2001).

A perifériás szövetekben (Hieble és *mtsai*, 1995) csakúgy, mint a patkány húgyhólyag simaizmaiban (Malloy és *mtsai*, 1998), az  $\alpha$  adrenerg receptorok három típusát lehet kimutatni: az  $\alpha_{1A}$ , az  $\alpha_{1B}$  és az  $\alpha_{1D}$  altípusokat. Az  $\alpha_1$ -es típusú adrenerg receptorok egy része a patkány húgyhólyagot innerváló paraszimpatikus kolinerg neuronok prejunctionalis membránjában található meg (Somogyi és *mtsai*, 1995, de Groat és *mtsai*, 1999). A szimpatikus receptorok aktivációja serkenti a paraszimpatikus neuronból az acetilkolin-(ACh) felszabadulást, ezáltal elősegíti a húgyhólyag neurogén kontrakcióit. Azok az  $\alpha_1$ -es adrenerg receptorok, amelyek a postjunctionalis membránban találhatóak, fokozzák a húgyhólyag

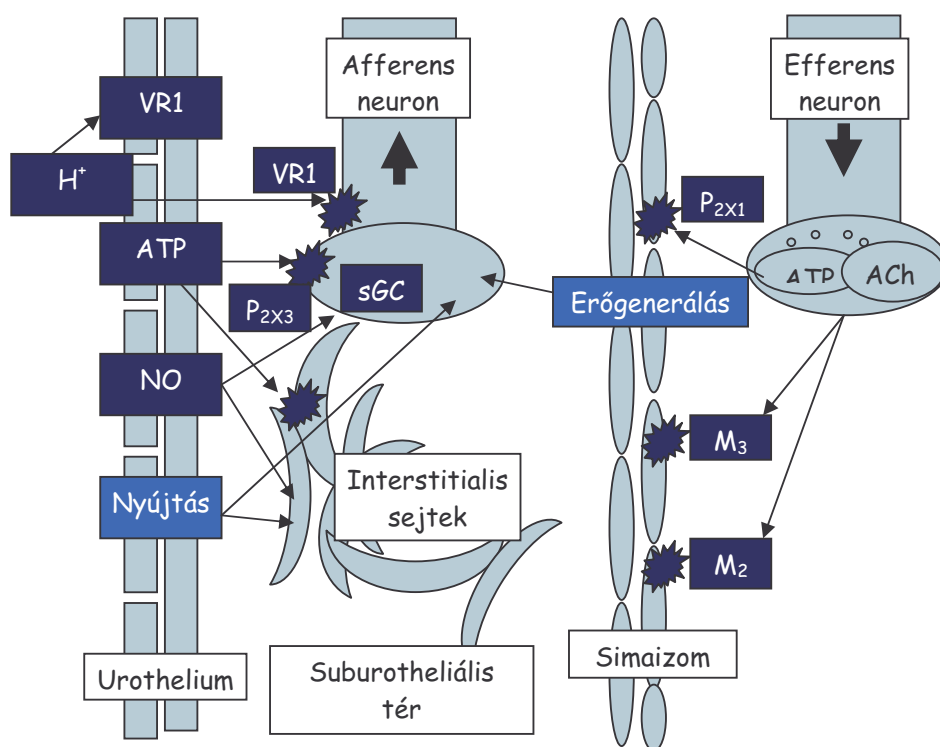
simaizomzatának bazális tónusát (Ordway és mtsai, 1986; Somogyi és mtsai, 1995; Suzuki és mtsai, 1999). A nem szelektív  $\alpha$  adrenerg receptor antagonisták, pl. a terazosin, gátolják az agonista phenylephrin (PE)-indukálta folyamatokat, úgymint a PE-serkentette neurogén húgyhólyag kontrakciókat, az ACh-felszabadulást és a bazális tónust (Somogyi és mtsai, 1995), azt azonban, hogy a PE pre- és postjunctionalis hatásai mely adrenerg receptor altípusán jönnek létre, jelenleg nem tudjuk.

Egyéb neurotranszmitter felszabadító mechanizmusok, beleértve a neuropeptid-Y-t, a vasoactív intestinalis peptidet (VIP) és a nitrogén-monoxidot, ugyancsak képesek mind állatokban, mind emberben az alsó vizeletelvezető traktus működését szabályozni (Andersson és Arner, 2004). A neuropeptid-Y kimutatható mind az adrenerg, mind a kolinerg neuronokban. A neuropeptid-Y-t kísérletes körülmények között adagolva prejunctionalis gátlás jön létre, ezáltal mind a noradrenalin, mind az ACh-felszabadulás gátlódik a postganglionalis idegsejtekben (Zoubek és mtsai, 1993, Tran és mtsai, 1994). A VIP, valamint a nitrogén-monoxid képes relaxálni a simaizomsejteket (Andersson és Arner, 2004). Ez utóbbiról kiderült, hogy a simaizomrelaxációt mind direkt hatásként létre tudja hozni, mind a paraszimpatikus neurotranszmitter felszabadulásának csökkentésével képes előidézni (2.ábra és 1.táblázat) (Andersson és Arner, 2004).



**1. ábra**

*Az alsó vizeletvezető traktus idegi kapcsolata. Az afferens idegimpulzusok a húgyhólyagfalból a pelvicus és a hypogastricus idegeken keresztül jutnak el a központi idegrendszerig (S2-4 gerincvelői szegmentum), majd a gerincvelői felszálló pálya eljut a hídban található kontinencia központba ("L" régió) és a periaqueductalis szürke maghoz (PAG), majd az információ a thalamuson keresztül a gyrus cinguliba kerül. Az efferens pályarendszer a periaqueductalis szürke magból (PAG) indul a pontin vizeletürítést serkentő központba ('M' center), ami serkenti az S2-4 gerincvelői szegmentumból kilépő paraszimpatikus idegek aktivitását. Ezzel egy időben a hídban található kontinencia központból induló impulzusok gátolják a szimpatikus idegek aktivitását a gerincvelői L1-2 szegmentum magasságában, valamint a hídban található cuneiform magból (CN) kiinduló impulzusok gátolják az Onuf mag (S2-4) működését, létrehozva a hólyagsimaizomzat relaxációját.*



**2. ábra**

A hólyag simaizomban található receptorok. A hólyagkontrakció kialakításában mind kolinerg, mind NANC (nem adrenerg, nem kolinerg, pl. ATP mediálta, purinerg) mechanizmusok szerepet játszanak. A simaizomsejtekben található M<sub>2</sub> és M<sub>3</sub> muscarinos, valamint a P<sub>2X1</sub> purinoreceptorok együttesen határozzák meg a kialakuló kontrakciót. A hólyagösszehúzódnás létrehozásában további fontos szerepe van a szenzoros információátvitelnek is.

**1. táblázat: A jelenleg ismert transzmissziós mechanizmusok humán húgyhólyagban**

Transzmitter/Receptor	A hólyagban kifejtett hatás:	A hatás helye:
ACh, muscarinos M <sub>3</sub> , M <sub>2</sub>	Kontrakció	Detrusor
ACh, muscarinos M <sub>2</sub> , M <sub>4</sub>	Gátló, relaxáció	Prejunctionalis
ACh, muscarinos M <sub>1</sub> , M <sub>3</sub>	Serkentő, kontrakció	Prejunctionalis
ACh, nikotinos	Serkentő, kontrakció	Intramurális ganglion
NA, $\beta_3$ , $\beta_2$	Relaxáció	Detrusor
NA, $\alpha_1$	Kontrakció	Trigonum (húgyhólyag bázis)
NA, $\alpha_2$	Gátló, relaxáció	Kolinerg idegvégződés
ATP, P <sub>2X1</sub>	Kontrakció	Detrusor
ATP, P <sub>2X3</sub>	Serkentő, kontrakció	Afferens ideg
Nitrogén-monoxid	Gátló, relaxáció	Afferens ideg
5-HT, 5-HT <sub>2</sub>	Kontrakció	Detrusor
Hisztamin, H <sub>1</sub>	Kontrakció	Detrusor
Prosztanoidok, EP, TP	Kontrakció	Detrusor
Prosztanoidok, EP, TP	Serkentő, kontrakció	Afferens ideg
Leukotriének, LTB <sub>4</sub>	Kontrakció	Detrusor
Angiotenzin, AT <sub>1</sub>	Kontrakció	Detrusor
Bradykinin, B <sub>2</sub>	Kontrakció	Detrusor
Endothelinek, ETA	Kontrakció	Detrusor
Tachykininek, NK <sub>2</sub>	Kontrakció	Detrusor
Vazopresszin, V <sub>1</sub>	Kontrakció	Detrusor
VIP, VPAC <sub>1</sub> /VPC <sub>2</sub> , PTHrP	Relaxáció	Detrusor

#### **1.1.4. A húgyhólyag simaizomzat élettana**

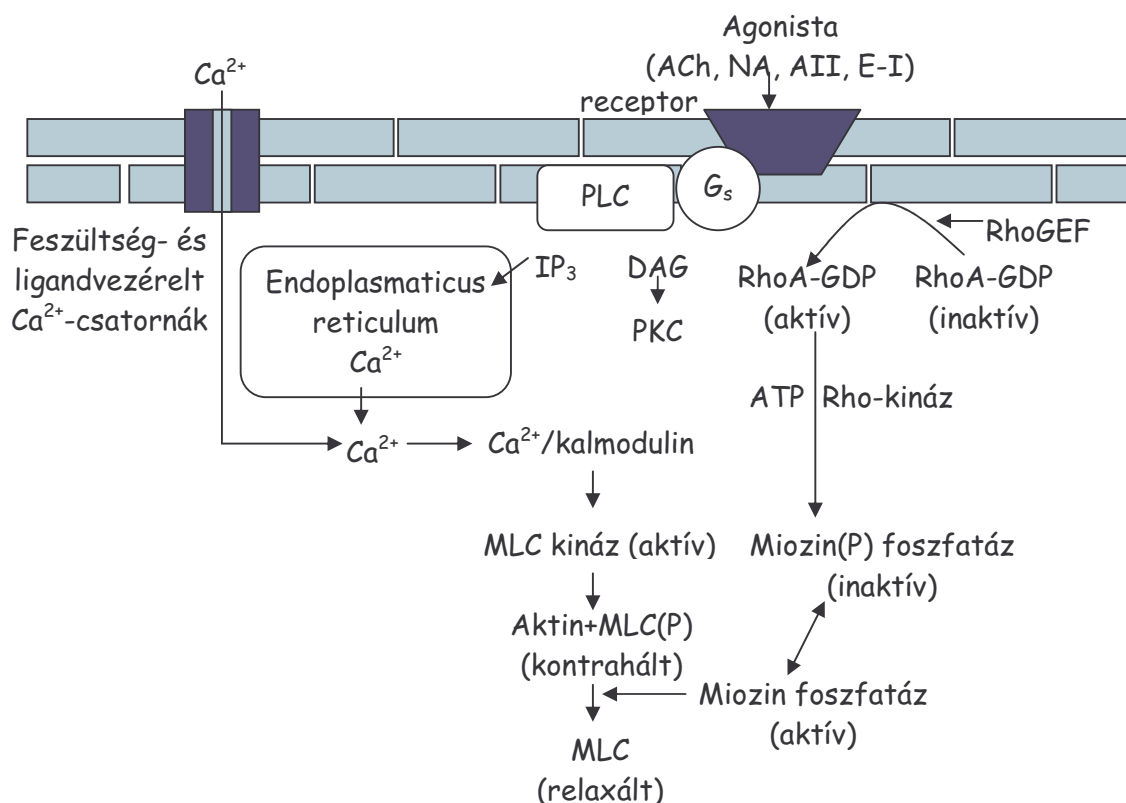
A filogenesis során az izomsejtek közül leghamarabb megjelent simaizomsejtek a szervezetben igen sok helyen megtalálhatók, és nagyon fontos szerepük van a szervezet vegetatív működésében. Ezeknek a simaizomsejteknek a kontrakciója-relaxációja határozza meg az adott üreges szerv -esetünkben a húgyhólyag- belső átmérőjét, ezáltal az adott helyzetben betöltött funkcióját is (vizelet tárolása és kiürítése).

A simaizomsejtek jelentősen eltérnek a szervezetünkben található másik két izomtípustól, a vázizomtól és a szívizomtól. Ez a különbség morfológiailag a harántcsíkolt hiányában mutatható ki. További érdekessége a simaizomzatnak, hogy működésének szabályozásában igen jelentősek a hormon-, illetve az autokrín/paracrín hatások, valamint a lokális kémiai szignálok. A simaizomsejtek képesek mind tónusos, mind fázisos kontrakciók kialakítására, ami által meg tudják változtatni a feszülésüket, illetve a hosszukat is. Ezeknek a kontrakcióknak a hátterében egyrészt a simaizomsejtekben is előforduló, de a másik két izomtípushoz viszonyítva kevésbé rendszerezett aktin és miozin közötti keresztkötések, másrészt a sejten belüli kalcium ionok állnak (Webb, 2003).

Az emlősökben a simaizomsejtek kontrakcióit elsődlegesen a receptor-mediált folyamatok, valamint a kontraktilis fehérjék megnyújtása hozza létre. Az ily módon aktivált folyamatok által előidézett membránpotenciál változás maga után vonhatja az akciós potenciálok tüzelési frekvenciájának módosulását, ami a sejtkontrakcióban változásokat idéz elő. Az izomösszehúzóást előidéző szignál esetén a miozin könnyű lánc kináz foszforilálja a 20 kDa molekulatömegű miozin könnyű láncot, ami ezáltal interakcióba képes lépni az aktinnal. A folyamathoz szükséges energiát az ATP biztosítja, amit a miozin ATP-áz aktivitással rendelkező alegysége elbont. Jól látható, hogy a simaizomösszehúzóás elemi lépése a miozin könnyű lánc foszforilációja, éppen ezért ez a folyamat egy többszörösen szabályozott lépést jelent. Ez a foszforiláció bizonyos simaizomsejtekben, így a húgyhólyag

simaizomzatában is, minden külső behatás nélkül kialakulhat, ezáltal biztosítva a szerv bazális izomtónusát (Webb, 2003).

Különböző agonisták (neurotranszmitterek, hormonok) specifikus receptoraikhoz kötődve létrehozzák a kontrakciót (3. ábra). Ezeket a hatásokat leginkább a foszfolipázC G-fehérjéken keresztül kialakuló serkentése hozza létre. Az aktivált enzim a sejtmembránban található phosphatidylinositol 4,5-biszfoszfátból (PIP<sub>2</sub>) diacylglycerolt (DG) és inositol 1,4,5-triszfoszfátot (IP<sub>3</sub>) alakít ki. Az IP<sub>3</sub> képes hozzákötődni az izomsejtek belső kalciumraktárának (endoplasmaticus reticulum, ER) membránjában található IP<sub>3</sub> receptorhoz, és ezáltal fokozza az ER-ből történő kalcium kiáramlást. A DG a protein kináz C (PKC) enzim specifikus aktivátora, ezáltal képes a sejten belüli foszforilációs folyamatok serkentésére. A PKC egyrészt fokozva a Ca<sup>2+</sup> csatornák foszforiláltságát, aktiválja azokat, ezáltal a Ca<sup>2+</sup> ionok fokozottabb mennyiségben képesek a csatornákon keresztül belépni a citoplazmába. Másrészt a PKC foszforilálja a keresztkötések kialakításában szerepet játszó fehérjéket is, ezáltal fokozva a Ca<sup>2+</sup> iránti érzékenységüket. A sejten belüli térben megemelkedett Ca<sup>2+</sup> mennyiség kalmodulinhoz kötődik, így emelve a miozin könnyű lánc kináz aktivitását. A kináz foszforilálja a miozin könnyű láncot, ezáltal biztosítva az aktin és miozin közötti keresztkötések kialakulásának lehetőségét, és a következményes sejtrövidülést. Bár a sejten belüli kalciumkoncentráció emelkedése átmeneti állapot, a kontraktilis fehérjék kalcium iránti érzékenyítése egy időben elnyújtottabb folyamatot jelent, ami a miozin foszfatáz aktivitásának Rho kinázok által létrehozott gátlásában nyilvánul meg. Ez a folyamat a foszfolipázC aktiválásával egyszerre indul el, és egy kis GTP-kötő fehérje, a RhoA serkentését jelenti. A folyamat precíz leírása még nem ismert. A membránban lévő, aktivált RhoA fokozza a Rho kinázok működését, ami a miozin foszfatázok gátlását idézi elő. Ez a folyamat ezáltal védeni fogja a kontraktilis fehérjék keresztkötési helyeit, így a miozin könnyű lánc kevésbé tud defoszforilálódni, ezáltal elősegítve a kontrakció fenntartását (Fukata és *mtsai*, 2001).



### 3. ábra

A hólygsimaizom kontrakciók kialakításában részt vevő mechanizmusok. Különböző agonisták receptoraikhoz kötődve G-fehérjéken keresztül kialakuló foszfolipázC serkentést hoznak létre. Az aktivált enzim a PIP<sub>2</sub>-ből DG-t és IP<sub>3</sub>-t alakít ki. Az IP<sub>3</sub> fokozza az ER-ből történő kalcium kiáramlást. A DG a PKC-n keresztül képes a sejten belüli foszforilációs folyamatok serkentésére, így fokozva a Ca<sup>2+</sup> belépését a citoplazmába. A PKC mindemellett növeli a kontraktilis fehérjék Ca<sup>2+</sup> iránti érzékenységet. A sejten belüli térben megemelkedett koncentrációjú Ca<sup>2+</sup> kalmodulinhoz kötődik, így fokozva a miozin könnyű lánc kináz aktivitását. A kináz foszforilálja a miozin könnyű láncot, ezáltal biztosítva az aktin és miozin közötti keresztkötések kialakulásának lehetőségét és a következményes sejtrövidülést. A kontraktilis fehérjék kalcium iránti érzékenyítése a miozin foszfatáz aktivitásának Rho kinázok által létrehozott gátlásában nyilvánul meg. Ez a folyamat ezáltal védeni fogja a kontraktilis fehérjék keresztkötési helyeit, így a miozin könnyű lánc kevésbé tud defoszforilálódni.

#### 1.1.5. A húgyhólyagban kialakuló spontán kontrakciók

Korábban ismertetésre került, hogy az újszülött patkányokban, a korai postnatalis életben (2-3. héten) mind a reflexek, mind a neurotranszmisszió, mind a simaizomzat funkciója tekintetében is jelentős változások történnek (Maggi és mtsai, 1986). Ezeket a folyamatokat mind patkányból származó teljes húgyhólyagpreparátumon, mind izomdarabokon sikerült a korábbiakban kimutatni (Maggi és mtsai, 1984 és 1986, Sugaya és

de Groat, 1994 és 2000). Az 1 hetes patkányokból kivett teljes húgyhólyagpreparátum alacsony amplitúdójú spontán kontrakciókat hozott létre. Ezeknek a spontán izomösszehúzódnak az amplitúdója fokozatosan növekedett a 2-3 hetes állatokból kivett húgyhólyagokban. A spontán kontrakciók hiányoztak az 1 hetes állatokból származó húgyhólyagdarabokban, de a 2 hetes állatokból származó húgyhólyagdarabkákon már kimutathatók voltak (Maggi és *mtsai*, 1986).

A vizeletürítést serkentő és gátló folyamatok ugyancsak megváltoznak az egyedfejlődés során. Feltételezések szerint, míg az 1 hetes patkányokban az idegi impulzusok által kiváltott húgyhólyagkontrakciók kizárólag kolinerg mechanizmusok, az idősebb állatokban főleg purinerg mechanizmusok által szabályozottak (Hourani, 1999, Kageyama és *mtsai*, 2000, Yoshida és *mtsai*, 2001).

Az újszülött patkányok húgyhólyagja jelentős különbségeket mutat a különböző hőmérsékletre adott válaszreakciókban is. Az egy-, illetve kéthetes állatokból származó húgyhólyagok által létrehozott spontán izomösszehúzódnak testhőmérsékleten maximálisok voltak, míg a hőmérséklet csökkenésével az amplitúdók is csökkentek (Sugaya és de Groat, 2000). A 3 hetesnél idősebb állatokból származó húgyhólyag azonban pontosan ellentétesen reagált a hőmérséklet megváltozására: testhőmérsékleten alacsony, míg annál alacsonyabb hőmérsékleten egyre növekvő amplitúdójú spontán kontrakciókat hozott létre (Sugaya és de Groat, 2000). A legszembetűnőbb változás a spontán kontrakciók hőmérséklet függésében tehát akkor következik be, amikor a vizeletürítés központi szabályozása is jelentős fejlődésen esik át. Mindezek alapján feltételezhető, hogy az újszülött húgyhólyag, amely nagy amplitúdójú intrinsic választ hoz létre, leginkább a pacemaker központ(ok) aktivitását, és a spontán válasz húgyhólyagon történő szétterjedését mutatja (Sugaya és de Groat, 2000, Kanai és *mtsai*, 2003).

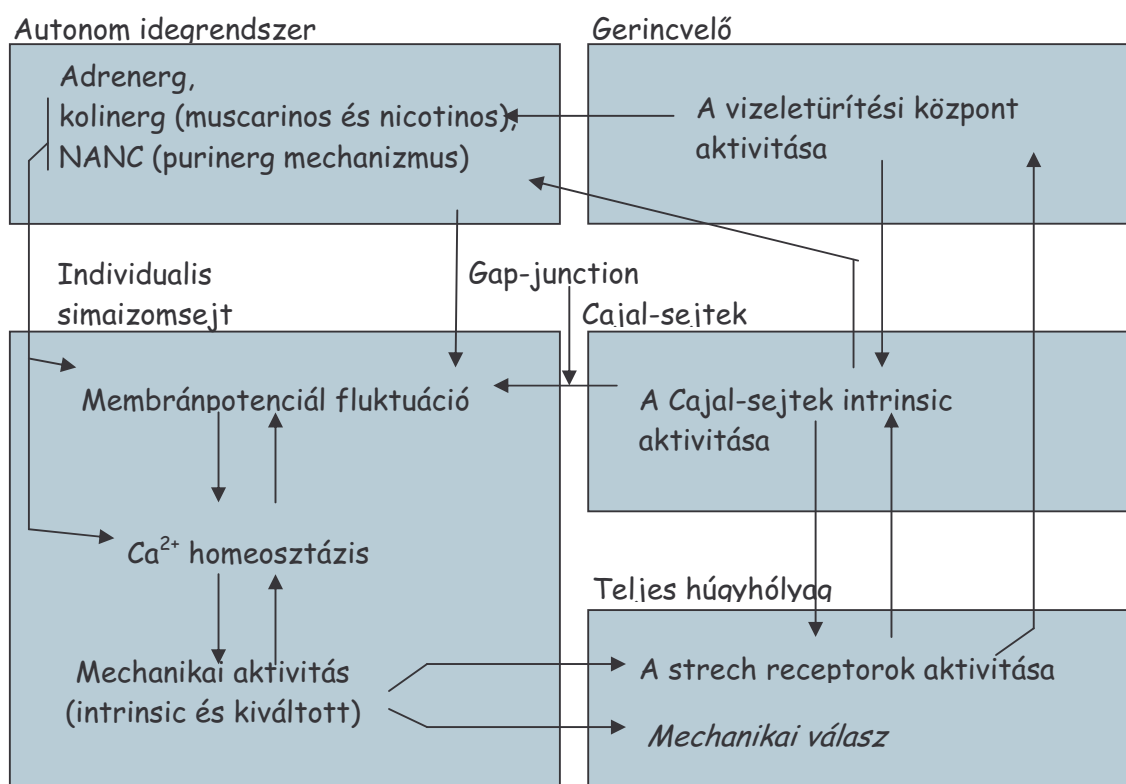
A 4. ábrán foglaltam össze a húgyhólyag spontán kontrakciókat kialakító és befolyásoló tényezőket. Még nem tudunk túl sokat azokról a faktorokról, amelyek

meghatározzák magát a húgyhólyag spontán aktivitását, illetve azok amplitúdóját és frekvenciáját. Ugyancsak hiányosak az információink ezeknek a folyamatoknak az életkor szerinti, valamint húgyhólyagterület-függő módosulásairól. A változások a sejt-sejt kommunikációban, az individuális simaizomsejt intrinsic elektromos és mechanikai paramétereiben, valamint a vegetatív idegrendszeri neurotranszmisszióban nyilvánulnak meg. Jól ismert, hogy a húgyhólyag simaizomsejtekben a membránpotenciál lassú fluktuációja mutatható ki, amely folyamat háttérében leginkább a kalcium-függő kálium csatornák működése áll (Brading, 2005). Ha az izomsejtek elektromos aktivitása megváltozik, akkor az maga után vonja a simaizomsejtek, illetve -a gap-junction kapcsolatok miatt- a teljes húgyhólyag kontraktilitásának megváltozását is. Ezeket az individuális simaizmok szintjén létrejövő változásokat (pl. a sejtekbe a kalcium belépését, ezáltal a kontrakciók megváltozását) különböző neurotranszmitterek és vegetatív idegrendszeri pályarendszerek (pl. ACh a muscarinos és nikotinos receptorokon, az ATP a purinoreceptorokon) képesek befolyásolni. Ugyancsak fontos tényezők ebben a szabályozási folyamatban a gerincvelői vizeletürítési központ, az intrinsic aktivitással bíró Cajal-sejtek, valamint a sejt-sejt interakcióban fontos szerepet játszó gap-junction is (Shafik és *mtsai*, 2004). E folyamatok életkor szerinti és/vagy húgyhólyagterület-függő változásai jelenleg még egyáltalán nem, vagy csak részben ismertek (Szigeti és *mtsai*, 2005)

#### **1.1.6. Az „overactive bladder” (fokozott húgyhólyagműködés) és a húgyhólyag inkontinencia (UI) definíciója**

A korábbiakban említésre került, hogy a patkányt, mint állatmodellt többek között azért alkalmaztuk, hogy információt kapjunk egy, a humán húgyhólyagban is kimutatható kórkép az OAB kialakulásáról, illetve az ilyenkor létrejövő módosulásokról. Az OAB egy viszonylag új terminológia az orvosi nyelvben, amely arra az állapotra utal, amikor a húgyhólyagban a vizelettelődés fázisában akaratlanul kiváltódó, nagy amplitúdójú

húgyhólyagkontrakciók alakulnak ki igen nagy számban. Ezáltal a páciens úgy érzi, hogy sokkal gyakrabban és sürgetőbben szükséges vizeletet ürítenie, mint ahogy az az élettani körülmények között a húgyhólyag teltségi állapotából adódóan indokolt lenne. Az OAB általában, de nem mindig, húgyhólyag inkontinenciához vezet. Nagyon gyakran e két fogalmat (OAB, UI) helytelenül egymás szinonimájának tekintik, pedig az OAB pusztán a húgyhólyag fokozott aktivitását, míg a húgyhólyag inkontinencia a vizelettárolás zavarát jelenti.



#### 4. ábra

*Lehetséges mechanizmusok és interakciók a húgyhólyag spontán működésének kialakításában és szabályozásában.* Nem tudunk túl sokat azokról a folyamatokról, amelyek meghatározzák a spontán hólyagaktivitást, illetve befolyásolni képesek az összehúzódások amplitúdóját és frekvenciáját. Ismert, hogy a hólyag simaizomsejtekben a membránpotenciál lassú fluktuációja mutatható ki, aminek a háttérben leginkább a kalcium-függő kálium csatornák működése áll. Ha az izomsejtek elektromos aktivitása megváltozik, akkor az maga után vonja a simaizomsejtek, illetve a gap-junction kapcsolatok miatt a teljes hólyag kontraktilitásának megváltozását is. Ezeket az individuális simaizmok szintjén létrejövő változásokat (pl. a sejtekbe a kalcium belépését, ezáltal a kontrakciók megváltozását) különböző neurotranszmitterek és vegetatív idegrendszeri pályarendszerek képesek befolyásolni. Ugyancsak fontos tényezők ebben a szabályozási folyamatban a gerencvelői vizeletürítési központ, a Cajal-sejtek, valamint a gap-junctionok-ön keresztül létrejövő sejt-sejt interakció is.

### 1.1.7. A fokozott húgyhólyagműködés előfordulása csecsemő és gyermekkorban

Gyermekkorban, az OAB-ben kialakuló akaratlan izom összehúzódások az urethra funkciók instabilitásával is együtt járnak, ezért gyakran a gyermekkori OAB-t, mint instabil húgyhólyagműködést írják le. A gyermekkorban megjelenő OAB három egymástól különböző patológiai okra vezethető vissza: neurológiai, anatómiai és funkcionális okok (Nijman, 2000, Schulman, 2004).

A *neurológiai eredetű* OAB hátterében a gerincvelő azon zárt, vagy nyitott rendellenességei állnak (myelodysplasiák), amelyek befolyásolják az alsó húgyrendszer működését. Ezek közül a legfontosabbak a myelomeningocele, lipomeningocele, lipoma a gerincvelő caudalis szakaszán, diastatomyelia, spina bifida, sacralis gerincvelő agenesia és egyéb spinalis disraphismusok, elvékonyodott filum terminale, aberráns idegkilépés vagy anterior helyzetű meningocele. Mindezek mellett neurológiai eredetű OAB-t okozhatnak a szerzett központi idegrendszeri betegségek (pl. vitamin B12 hiánya), illetve a gerincvelő különböző eredetű sérülései is.

Az *anatómiai eredetű* OAB hátterében a vizelet húgyhólyagból való elfolyását akadályozó elváltozások állnak (pl. a posterior helyzetű urethrabillentyű szűkülete), amelyek igen gyakran vezetnek a húgyhólyag aktivitás nagymértékű fokozódásához. Néhány urológus (McKenna és Herndon, 2000, Bauer, 2002) úgy gondolja, hogy a vesicourethralis reflux (VUR) kialakulásának hátterében sokkal inkább a detrusor izomzat fokozott aktivitása az elsődleges lépés, mintsem az urethrovesicalis szájadék abnormalitásai.

A gyermekkori OAB hátterében azonban leginkább a húgyhólyagürítés funkcionális zavarai állnak (Bauer, 2002). Az anatómiai elváltozás nélküli *funkcionális eredetű* problémák, mint például vizeletelvezető rendszer visszatérő infekciói, ugyancsak fokozzák a húgyhólyag aktivitását azáltal, hogy a gyulladás a húgyhólyagfalban kialakuló spontán kontrakciók frekvenciáját és erejét megnöveli (Dacher és mtsai, 2204). Az akaratlagos vizeletürítésben bekövetkező viselkedésbeli változások, úgymint a személyes vagy családi stresszhelyzetek,

egyaránt vezethetnek nappali és/vagy éjszakai akaratlan vizeletürítéshez (Heymen, 2004). Akár OAB-t is létrehozhatnak, csakúgy, mint minden olyan folyamat, amely a húgyhólyag nem megfelelő kiürülésével jár együtt (pl. megszakított vizelés, inkomplett vizelés vagy a késleltetett vizelés). Ez utóbbi esetekben a húgyhólyagban visszamaradó vizelet visszatérő húgyúti fertőzésekhez, illetve a detrusor izomzat fokozott aktivitásához vezethet (Nijman, 2000, Bauer, 2002, Dacher és mtsai, 2004, Schulman, 2004). Ha a vizeletürítés valamilyen ok folytán tartósan és nagymértékben gátolva van, akkor VUR és akár hydronephrosis is kialakulhat (Hinman-Allen sy).

## 1.2. Célkitűzések

1. Jól ismert a PE húgyhólyagkontrakciót fokozó hatása. Ez úgy alakulhat ki, hogy a PE serkenti a prejunctionalis neuronális ACh-felszabadulást, vagy fokozza a felszabadított ACh postjunctionalis hatásait a receptoron. Az is ismert, hogy a patkány húgyhólyagban  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  és  $\alpha_{1D}$  adrenerg receptorok egyaránt kimutathatók és farmakológiai módszerekkel azonosíthatók. Az  $\alpha_{1A}$  receptor leginkább 5 methyl-urapidil-ra (5-MU), az  $\alpha_{1D}$  elsősorban BMY (7378)-ra érzékeny, míg a chloroethylclonidin (CEC) egyaránt hatékony az  $\alpha_{1B}$  és a  $\alpha_{1D}$  receptoron (Han és mtsai, 1987; Hieble és mtsai, 1995). Arról azonban nem volt információnk, hogy a PE pre- és postjunctionalis hatásai, többek között az ACh-felszabadulásra kifejtett hatás, mely receptor altípuson alakul ki. Mindezek alapján célunk volt *az adrenerg receptor altípusok lokalizációjának vizsgálata a pre- és a postjunctionalis membránban különböző szubszelektív receptorantagonisták felhasználásával.*

2. A patkányoknál a korai postnatalis korban a spontán húgyhólyagkontrakciók igen érdekes és változatos képet mutatnak. Mint már korábban említettem, a néhány napos állatokban kezdetben még nincs kimutatható spontán aktivitás, majd egy reguláris, alacsony frekvenciájú húgyhólyagkontrakciós hullám mutatható ki. A néhány hetes állatokban már egy sokkal kaotikusabb, rendszertelenebb, kis amplitúdójú és nagyobb frekvenciájú spontán kontrakciók figyelhetők meg. Ezeknek a változásoknak a hátterét valószínűleg a szerv fejlődésében kell keresnünk. Célunk volt ezért, hogy *a spontán húgyhólyagkontrakciók megváltozásának életkor szerinti és húgyhólyagterület-függését feltérképezzük a korai postnatalis korban.*

3. A húgyhólyagműködés vizsgálatához nem létezett olyan reprodukálható kísérletes modell, amely lehetővé tette a csökkent működésű húgyhólyagaktivitás vizsgálatát. Munkacsoportunk egy akut, invazív módszer kidolgozását tűzte ki célul, ami a húgyhólyagfal rövid ideig tartó fagyasztással létrehozott sérülését jelentette

(cryoinjury). Experimentális körülmények között a fagyasztáson átesett húgyhólyag kontrakciói reprodukálható módon megváltoztak, egy funkciójában csökkent húgyhólyagműködést idézve elő. Ez a módszer az experimentális felhasználhatóságon túl terápiás lehetőséget is jelenthet, hiszen az alkalmazandó kezelés detrusor izomzatra kifejtett hatása közvetlenül lemérhetővé vált a módszer segítségével. A fagyasztás ilyen jellegű felhasználása már korábban bevezetésre került, hiszen kimutatták a módszer hatékonyságát a myocardialis infarctuson átesett betegek myoblast transzplantációs terápiájának tesztelésében (Murry és mtsai, 1996, Lewis és mtsai, 1998, Sakai és mtsai, 1999). A fagyasztás alkalmazhatóságát különböző vázizombetegségek esetén is igazolták (Murry és mtsai, 1996, Iritchev és mtsai, 1997). *Kísérleteinkben arra kerestünk választ, vajon a módszer alkalmazható-e a simaizom kontraktilitás kontrollált megváltoztatására.*

## **2. Módszerek**

### **2.1. Kísérleti állatok**

Minden bemutatásra kerülő kísérletben Sprague-Dawley (Hilltop Laboratories, Pittsburgh, PA) patkányokat használtunk. A receptortipizáló kísérletekhez legalább 7 hónapos (350-450 g), a spontán kontrakciós mérésekhez 3-35 napos, míg a fagyasztásos kísérletekhez hozzávetőleg 4-5 hónapos (250-350 g) állatokból izoláltuk a húgyhólyagokat. Az állatok elaltatásában és a szervek kivételében a Guide for the Care and the Use of Laboratory Animals (US Public Health Service, NIH Publication No. 85-23, 1985) ajánlását követtük, és az alkalmazott protokollokat a Pittsburghi Egyetem Állatetikai Tanácsa (IACUC at the University of Pittsburgh) jóváhagyta.

### **2.2. A patkányhúgyhólyag izolálása**

A hasfal megnyitását követően a húgyhólyagokat kiemeltük, és ezekből izomgyűrűket (2-4 db) készítettünk a szerv horizontális átmetszésével. A spontán kontrakciós méréseknél különösen ügyeltünk arra, hogy a húgyhólyag alsó (továbbiakban bázis) és felső (továbbiakban kupola) részéből elkészített izomgyűrű közel azonos nagyságú legyen. Legvégül az izomgyűrűk saggitalis átmetszésével izomcsíkokat állítottunk elő, amiket egy 5 ml térfogatú duplafalú mérőkádban 37°C-on tartott Krebs-oldatba (mM-ban: 113 NaCl; 4,7 KCl; 1,25 CaCl<sub>2</sub>; 1,2 MgSO<sub>4</sub>; 25 NaHCO<sub>3</sub>; 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 11,5 glukóz) helyeztünk, és 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó oxigénnel folyamatosan buborékoltattuk.

### **2.3. Fagyasztás**

A patkányokat tiszta oxigénben oldott 2 %-os halothánnal elaltatva a hasfalat a kismedencénél a középvonalban átmetsztettük. A szövetkárosítás egy -40 °C-ra lehűtött 8 mm

átmérőjű alumínium pálcával történt oly módon, hogy azt az 1 ml fiziológiás sóoldattal feltöltött húgyhólyag szerózus felszínén tartottuk 30 másodpercig.

A beavatkozást követően öt nappal elvégzett kísérletekhez két állatcsoportot használtunk: (1) fagyasztáson átesett, valamint (2) sham operált (kontroll) állatokat.

#### **2.4. Kontraktilitás mérés és kísérleti protokollok**

A Krebs-oldatban lévő izomcsíkok kezdeti feszülését 10 mN-ra állítottuk be. Az ekvilibrációhoz szükséges negyven percnyi várakozás után az izometriás kontrakciók jelét transzducereken keresztül egy számítógépes program segítségével regisztráltuk (Windaq, DATAQ Instruments Inc, Akron, OH, U.S.A). Az elektromos téringerlést Grass 88 stimulátorral (Grass, ASTROMED, RI, U.S.A.) idéztük elő. A stimulátorhoz kapcsolt platinaelektródákat a mérőkád alsó és felső szájadékán keresztül juttattuk a mérőkád üregébe, ahol az elektróda távolságot 4 cm-re állítottuk be. Minden kísérlet kezdetén egy ingerintenzitás-válasz görbét vettünk fel (20 Hz és 0,25 ms pulzusszélesség), majd a maximális választ létrehozó intenzitás 50%-át használtuk a kísérletekben különböző ingerlési frekvencia és ütésszám mellett. A mintavételezési gyakoriság 20-100 Hz volt. A görbék kiértékelését a WindaqEx (DATAQ Instruments Inc, Akron, OH, U.S.A) program segítségével végeztük, és az eredményeket izomtömeg egységre korrigáltuk.

A spontán kontrakciók tanulmányozásakor a kezdeti, viszonyítási alapként vett kontroll kontrakciók regisztrálása után carbachol-t (CCh) alkalmaztunk 30-40 percen keresztül. Ezután a szert kimostuk, és a spontán kontrakciók visszatérése után vagy tetrodotoxint (TTX), vagy atropint alkalmaztunk. Mivel az említett farmakonokat nem használtuk minden esetben amikor a spontán kontrakciók megfigyelhetőek voltak, ezért a két kísérletsorozatban az esetszámok különbözőek (9., 11. és 12. ábra).

## **2.5. Alkalmazott farmakonok**

A PE, az atropin-szulfát, a karbamilkolin (carbachol), a tetrodotoxon, az  $\alpha$ - $\beta$  metil ATP ( $\alpha$ - $\beta$ -mATP), valamint a Krebs-oldat minden összetevője a Sigma Chemical Co-tól (St. Louis, MO, U.S.A.), az 5-metil-urapidil, 2-(2,6-dimetoxi-fenoxietil)aminoetil-1,4benzodioxanHCl (WB-4101) és a CEC az RBI-től (Natick, MA, U.S.A.), a Rec 15/2739 a Recordati Lab-tól, a 3H kolin (80 Ci/mmol) pedig a NEN Life Science Products-tól (Boston MA, U.S.A.) került beszerzésre, és közvetlenül a Krebs-oldatba adagoltuk.

## **2.6. Acetilcolin-felszabadulás mérése**

A szövetdarabokat 1 ml 5  $\mu$ Ci/ml rádióaktivitással bíró 3H-kolin-t tartalmazó 37 °C-os Krebs-oldatba helyeztük, és folyamatosan 5%-os CO<sub>2</sub>-t tartalmazó oxigénnel buborékolattuk. Az inkubáció után az izomdarabokat oxigenizált Krebs-oldattal 60 percen keresztül, 0,3 ml/min sebességgel folyamatosan perfundáltattuk. Ezután a kifolyó folyadékot 3 percen keresztül gyűjtöttük a kontroll érték meghatározásához. Az összes alkalmazott farmakont, a CEC kivételével, 15 perccel az ingerlés megkezdése előtt adtuk a perfúziós oldathoz, és a kísérlet végéig benne is tartottuk. A CEC-et tartalmazó kísérleteknél a szert az ingerlés megkezdése előtt 30 perccel kezdtük el alkalmazni, és 15 perc elteltével kimostuk. Amikor PE-t is alkalmaztunk, akkor azt a CEC kimosása után adtuk az oldathoz. Az elektromos téringerlést (10 Hz, 100 ütés, 100 V, 0,25 ms pulzusszélesség) ugyancsak Grass S-88 stimulátorral végeztük (Somogyi és *mtsai*, 1995). Az izomdarabokat egyszer (WB 4101 kísérletek) vagy kétszer (CEC kísérletek) ingereltük ezekkel a paraméterekkel. Amikor kettős ingerlést alkalmaztunk, akkor a két ingerlés között eltelt idő 50 perc volt. A lecsurgó folyadék rádióaktivitását Optifluor szcintillációs reagens (Packard Industries) és Beckman Spectrometer (Model 5801) segítségével határoztuk meg. A rádióaktivitás teljes mennyiségének meghatározását a kísérlet befejezése után végeztük el. A minták rádióaktivitását a szövet százalékában adtuk meg. Az ingerlés hatására felszabaduló ACh

menyiséget a nem ingerelt szövetben mérhető ACh-felszabadulással korrigáltuk (Somogyi és de Groat, 1992). A farmakonok hatását a farmakon alkalmazása utáni ingerlést követő rádióaktivitás és az adagolást megelőző ingerlés alatt mért rádióaktivitás hányadosaként értelmeztük.

## **2.7. A spontán kontrakciók analízise**

Az izomdarabok spontán kontrakcióit a 1) gyors Fourier-transzformációs (FFT, Basar és Eroglu, 1976) algoritmussal, 2) nemlineáris kereszt-predikciós teszttel (NLCP, Stam és *mtsai*, 1998, Stam és Pritchard, 1999), 3) renormalizált Shannon-entropiával (Strait és Dewey, 1996, Bondarenko, 1997), és 4) az approximált entropia teszttel (ApEn, Pincus, 1991) vizsgáltuk. Az adatok kiértékeléséhez a WindaqEx, a Microsoft Excel, a Microcal Origin, valamint saját készítésű (Bondarenko- és Barta-által készített) programokat alkalmaztuk. A frekvenciaanalízishez a FFT hanning változatát használtuk. Minden analízisnél a görbék frekvenciamegoszlási diagramjait 16384 adatpontból határoztuk meg.

A kontrakciós görbék regularitásának vizsgálatához három nemlineáris matematikai analízist alkalmaztunk: az NLCP-t, a renormalizált Shannon-entrópiát, valamint az ApEn-t, amelyekhez véletlenszerűen kiválasztott, egymást követő 4500 adatpontot használtunk fel. A rendszer komplexitásának megváltozását korrelációs fraktál-dimenzió algoritmus segítségével határoztuk meg. A lineáris, nem-lineáris, valamint az alacsony dimenziójú kaotikus folyamatok közötti differenciáláshoz egy új matematikai modellt, a NLCP tesztet alkalmaztuk (Stam és *mtsai*, 1998, Stam és Pritchard, 1999). Ennél a módszernél a sorozat predikcióját (*pred*), valamint az amplitúdó (*ama*) és a frekvencia (*tir*) aszimmetriákat vettük figyelembe. A vizsgált paraméterek közül az *ama* és a *tir* esetében a nagyobb érték a kevésbé rendezett folyamatra utal, míg a *pred* alkalmazásakor minél rendezettebb egy folyamat annál közelebb van a predikció értéke az egyhez, a hipotetikus maximumhoz. Mivel az NLCP analízist korábban nem használták fel biológiai rendszerek vizsgálatánál, ezért az adatokat egy

tradicionalisabb módszerrel az amplitúdótól független Shannon-entrópiával is megvizsgáltuk, amelyet már kardiológiai és neurológiai adatok kiértékelésénél korábban is alkalmaztak (Strait és Dewey, 1996, Bondarenko, 1997). A folyamat entrópiáját ugyancsak ellenőriztük egy másik analízis, az ApEn segítségével, amely módszer ugyancsak használatos a biológiai rendszerek entrópiájának meghatározásához (Pincus, 1991).

## **2.8. Statisztikai módszerek**

A bemutatásra kerülő adatoknál az átlag és standard hiba értékeiket, valamint az esetszámot tüntettük fel. A kísérletek eredményeinek kiértékelésénél vagy varianciaanalízist vagy Student-féle t-próbát, (Graphpad, San Diego, CA, U.S.A. és Microcal Origin) alkalmaztunk. Minden esetben a  $p < 0,05$  értéket tekintettük szignifikáns eltérésnek.

### 3. Eredmények

#### 3.1. Az adrenerg receptorok vizsgálata

##### 3.1.1. A phenylephrin válasz időfüggése

Mivel a PE kumulatív dózis-hatás görbe vizsgálatához a szer tartós (1-2 óra) adagolása volt szükséges, ezért először az elnyújtott PE adagolás által kiváltott hatások stabil voltát vizsgáltuk meg mind a téringerléssel kiváltott hólyagkontrakciók esetében, mind pedig a bazális izomtónusnál. A 7 percenként kiváltott izomkontrakciókat rövid (10 inger, 20 Hz), vagy hosszú (100 inger, 20 Hz) stimulációval idéztük elő. A kontroll válaszok regisztrálása után 8  $\mu$ M PE-t adtunk az izomhoz, aminek következményeként a kiváltott kontrakciók

amplitúdói 30-50 %-kal

növekedtek, miközben a bazális

tónus 3-6 mN-ra emelkedett. Az

izomdarabokat PE jelenlétében

további 125 percen keresztül

ingereltük. Az idő

előrehaladásával egyre csökkent

az izmok kezdetben

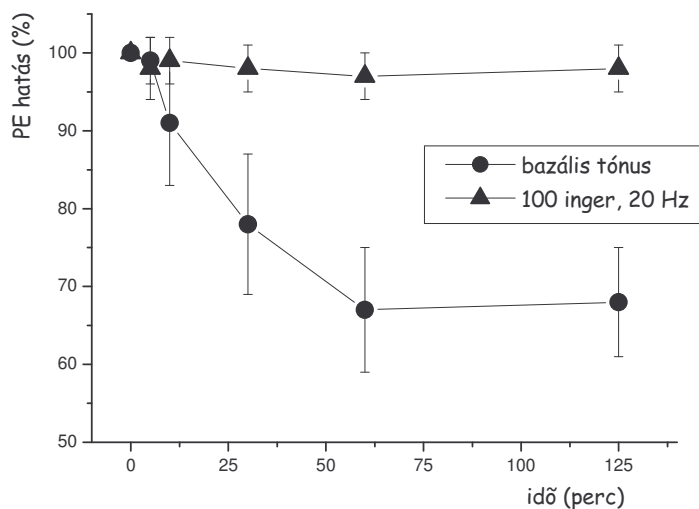
megemelkedett bazális tónusa,

azonban a téringerléssel (100

inger, 20 Hz) kiváltott

kontrakciók változatlanok

maradtak (5. ábra).

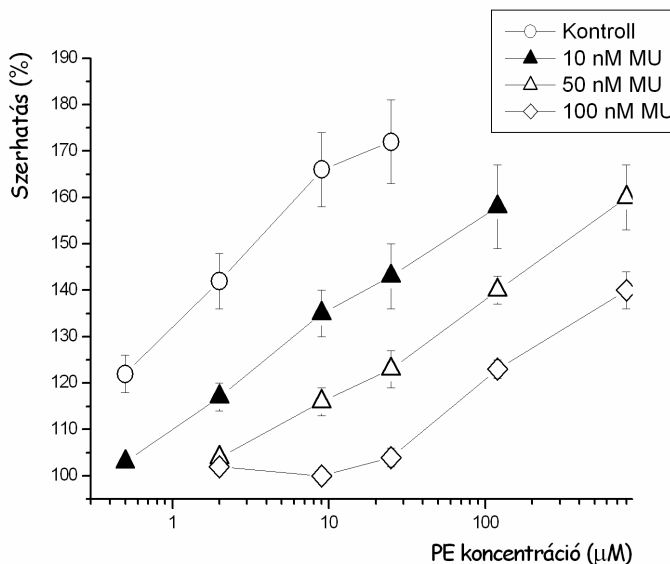


##### 5. ábra

A phenylephrin hatása a bazális izomtónusra, valamint a 100 ingert tartalmazó, 20 Hz-es külső ingerléssel kiváltott válaszra. Az izomdarabokat PE jelenlétében 125 percen keresztül ingereltük. Az idő előrehaladtával egyre csökkent az izmok kezdetben megemelkedett bazális tónusa (●), azonban a téringerléssel (100 ütés, 20 Hz) kiváltott kontrakciók (▲) változatlanok maradtak.

### 3.1.2. Az $\alpha_{1A}$ adrenerg receptorok specifikus gátlószereinek hatása a phenylephrin által serkentett idegi kontrakciókra, valamint a bazális tónusra

Elsőként megvizsgáltuk a PE hatását a téringerléssel kiváltott izomkontrakciókon (20 Hz, 10 ütés, koncentráció tartomány 0,5-32  $\mu$ M), illetve meghatároztuk a PE kumulatív dózis-hatás görbéjét. Ezután a kísérletet megismételtük az  $\alpha_{1A}$  adrenerg receptor szelektív gátlószereinek (5-methyl-urapidil (5-MU); Rec15/2739 és WB-410) jelenlétében is. A PE dózis-hatás görbéje az 5-MU koncentrációjától függően jobbra



#### 6. ábra

A phenylephrin hatása az izomkontrakciókra 10 inger tartalmazó, 20 Hz-es külső ingerlés esetén az  $\alpha_{1A}$  adrenerg receptor gátló 5-MU jelenlétében. A PE hatás kumulatív dózis-hatás görbéje ( $\circ$ ) a téringerléssel kiváltott izomkontrakciókon (20 Hz, 10 inger, PE koncentráció tartomány 0,5-32  $\mu$ M), illetve az  $\alpha_{1A}$  adrenerg receptor szelektív gátlószereinek (5-methyl-urapidil (5-MU) a jelenlétében. A PE dózis-hatás görbéje az 5-MU hatására koncentrációfüggően jobbra tolódott.

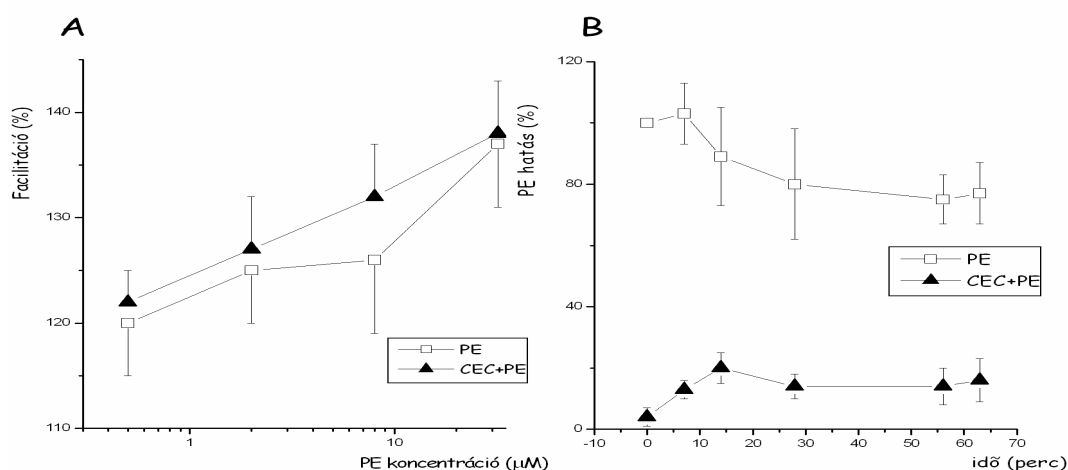
tolódott el (6. ábra). Az alkalmazott antagonisták Arunlakshana and Schild (1959) módszerével meghatározott  $pA_2$  értékeket az 2. táblázatban tüntettük fel. Az általunk is alkalmazott három szer hatása a PE dózis-hatás görbéjére az irodalmi adatok szerint különböző: Rec15/2739 a leghatékonyabb, az 5-MU a legkevésbé hatékony. Az irodalmi adatoktól eltérően, méréseink alapján a PE által kiváltott kontrakciókra kifejtett hatásokban nem találtunk lényeges különbséget (2. táblázat), ami a hatás kompetitív voltára utalhat. A PE által kiváltott bazális tónus emelkedést az 5-MU meggátolta, az  $IC_{50}$  értéke  $48 \pm 12,5$  nM (n=6) volt. A PE mediálta elektromos kontrakciónál az 5-MU hatása még ennél is alacsonyabb értéknél következett be, az  $IC_{50}$  értéke  $10 \pm 1,5$  nM (n=8;  $P < 0,05$ ) volt.

<i>Antagonista</i>	$\alpha_1$ szelektivitás *	$pA_2$	„slope” faktor
Terazosin	Nincs	8,26 **	1,13±0,18 (n.s.)
WB-4101	A>B	9,62	0,88±0,15 (n.s.)
Rec	A>B	9,59	0,96±0,08 (n.s.)
5-MU	A>B	8,77	0,86±0,12 (n.s.)

**2. táblázat.** Különböző  $\alpha_1$  gátlók hatása az elektromos téringerléssel kiváltott (10 inger, 20 Hz) és PE-facilitált kontrakciókra. \*Hieble és mtsai 1995, \*\* Somogyi és mtsai 1995, n.s. = statisztikai módszerekkel nem szignifikáns elváltozás

### 3.1.3. Az chloroethylclonidin hatása a pre- és postjunctionalis phenylephrin-válaszra

A kísérletek következő fázisában a húgyhólyag darabokat 30 percen keresztül különböző koncentrációjú (2,5-50  $\mu$ M) CEC oldatban kezeltük elő, majd kimostuk a szervkádból, mivel a CEC egy irreverzibilis  $\alpha$  adrenerg receptor gátlószer, amelynek a hatása kifejezettebb az  $\alpha_{1B/1D}$  receptorokon, míg az  $\alpha_{1A}$  receptorokon a szernek nincs számottevő hatása. A CEC kezelést követően a PE által kiváltott idegi kontrakciókban nem találtunk csökkenést (7A ábra), míg CEC alkalmazásakor a PE által fokozott bazális tónus emelkedés 90%-al csökkent (7B ábra).



#### 7. ábra.

Az chloroethylclonidine (CEC) hatása a pre- és postjunctionalis PE válaszra. A CEC egy olyan irreverzibilis adrenerg receptor gátlószer, amelynek a hatása kifejezettebb az  $\alpha_{1B/1D}$  receptorokon, míg az  $\alpha_{1A}$  receptorokon a szernek nincs számottevő hatása. A 20  $\mu$ M CEC kezelést követően a különböző koncentrációban alkalmazott PE által kiváltott idegi kontrakciókban nem találtunk eltérést a kontrollhoz viszonyítva (A). Ezzel szemben a CEC hatására a PE által fokozott bazális tónus tartósan (kezdetben 90%-al) csökkent (B).

A CEC 2,5-20  $\mu\text{M}$ -os koncentrációtartományban ugyancsak koncentráció függő módon növelte a téringerléssel kiváltott kontrakciók amplitúdóját ( $47,2\pm 8,4\%$ ;  $n=8$ , 20  $\mu\text{M}$ -os CEC koncentrációnál) és a görbe alatti területet ( $261\pm 33\%$ ;  $n=8$ , 20  $\mu\text{M}$ -os CEC koncentrációnál). A muscarinos ACh-receptor gátló atropin (1  $\mu\text{M}$ ) csökkentette a CEC kezelt preparátumokban a téringerléssel kiváltott kontrakciók amplitúdóját és a görbe alatti területet is. Az atropin hatása sokkal kifejezettebb volt a CEC kezelt preparátumon, mint a kezeletleneken (3. táblázat). A 15 perccel a CEC adagolás előtt alkalmazott 5-MU (10-100 nM) nem befolyásolta a CEC által fokozott kontrakciókat, ami arra utal, hogy a CEC által fokozott kontrakció független a prejunctionalis  $\alpha_{1A}$  receptorok aktivációjától.

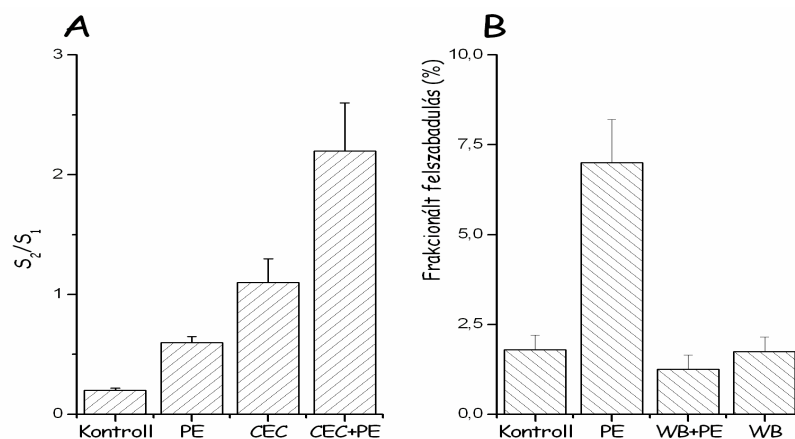
<i>Kezelés</i>	<i>A csúcskontrakció csökkenése (%)</i>	<i>A görbe alatti terület csökkenése (%)</i>
<b>kezeletlen</b>	$23\pm 2,3$ (10)	$46\pm 5,6$ (10)
<b>20 <math>\mu\text{M}</math> CEC</b>	$40\pm 3,1$ (8) **	$76\pm 2,5$ (8) **

**3. táblázat.** 1  $\mu\text{M}$  atropin hatása a kontraktilis válaszra kezeletlen és 20  $\mu\text{M}$  CEC-el előkezelt húgyhólyagon. A 20  $\mu\text{M}$  CEC-t közvetlenül a mérőkádába adagoltuk, majd 30 perc elteltével kimostuk. Az atropin adagolása akkor történt, amikor a CEC már nem volt jelen. Az atropin hatása a kezeletlen állatokhoz viszonyítva szignifikánsan nagyobb volt a CEC előkezelt állatokban. (\*\*  $P<0,01$ )

### **3.1.4. Az $\alpha_{1A}$ és $\alpha_{1B/1D}$ receptorok gátlásának hatása a phenylephrin által fokozott acetilkolin-felszabadulásra**

Korábbi adatokból ismert (Somogyi és mtsai, 1995), hogy az  $\alpha$  adrenerg receptorok serkentése növeli a neuronális ACh felszabadulást. A PE indukált ACh-felszabadulást az  $\alpha_{1B/D}$  gátló CEC (20  $\mu\text{M}$ ) és az  $\alpha_{1A}$  inhibitor WB-4101 (100 nM) jelenlétében is megvizsgáltuk. A CEC esetében az eddigiektől különböző ingerlési mintázatot alkalmaztunk: a szerhatás vizsgálatához az izomdarabokat kétszer ingereltük (S1 és S2), azonban a második ingerlés előtt az oldathoz CEC-t adtunk és 30 percen keresztül benne tartottuk. CEC kimosása után PE-t (2  $\mu\text{M}$ ) adtunk a perfúziós oldathoz. A 8A ábrán jól látható, hogy az ACh-felszabadulás CEC hatására tovább emelkedett ( $P<0,05$ ), ami jó összhangban van a kontraktilis

eredményekkel. Másrészt, egy  $\alpha_{1A}$  adrenerg receptor gátlószer, a WB-4101 (100 nM), ami bár önmagában nem befolyásolta az ACh-felszabadulást, azonban képes volt gátolni a PE által serkentett neuronális ACh-felszabadulást (8B ábra).



#### 8. ábra

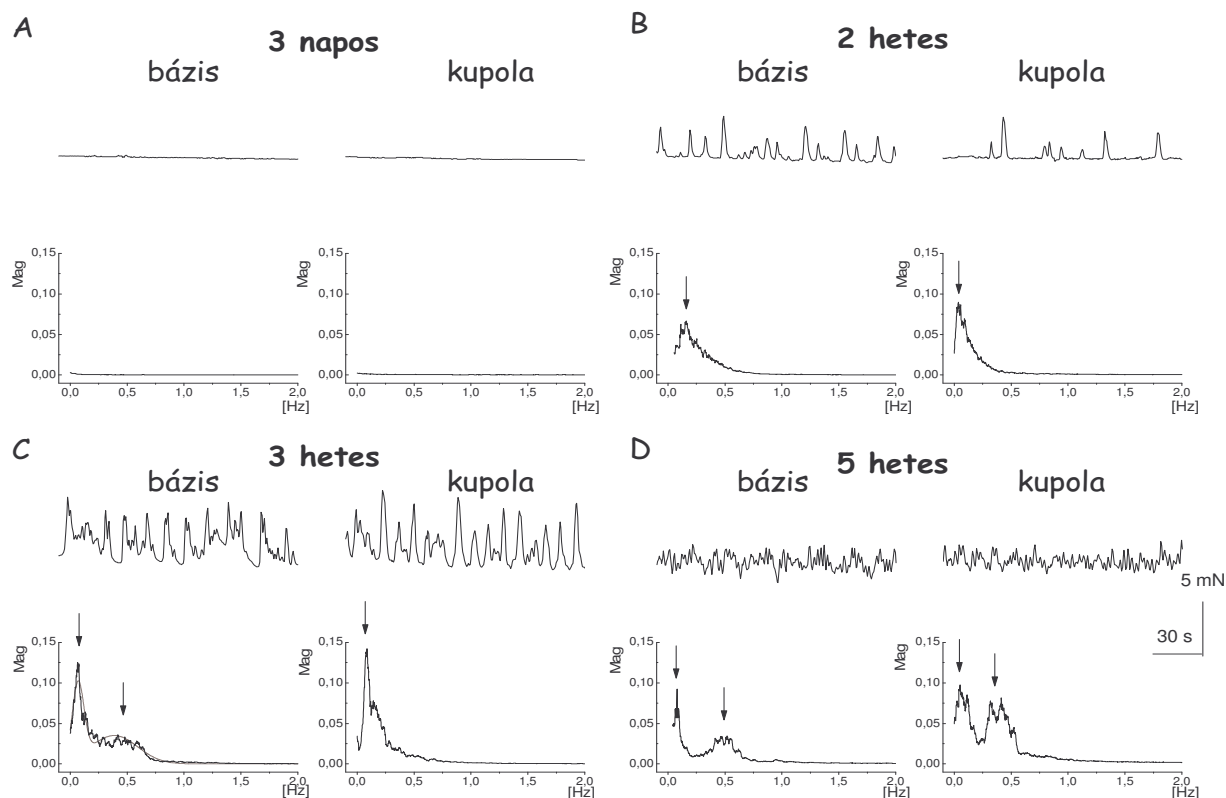
Az  $\alpha_{1A}$  és  $\alpha_{1B/D}$  receptorok gátlásának hatása a PE által fokozott ACh felszabadulásra. A PE indukált ACh felszabadulást az  $\alpha_{1B/D}$  gátló CEC (20  $\mu$ M) és az  $\alpha_{1A}$  inhibitor WB-4101 (100 nM) jelenlétében is megvizsgáltuk. Ebben a kísérletsorozatban a szerhatás vizsgálatához az izomdarabokat kétszer ingereltük (S1 és S2), azonban a második ingerlés előtt az oldathoz CEC-t adtunk. Az ACh felszabadulás CEC hatására tovább emelkedett (A). Az  $\alpha_{1A}$  adrenerg receptor gátlószer, a WB-4101 (100 nM) önmagában nem befolyásolta az ACh felszabadulást, azonban gátolta a PE által serkentett neuronális ACh felszabadulást (B).

### 3.2. A spontán kontrakciók vizsgálata

#### 3.2.1. Az újszülött patkány húgyhólyag spontán kontrakciók amplitúdó és frekvencia értékeinek vizsgálata

Az 1-5 napos állatokból izolált húgyhólyagdarabokban a spontán izomaktivitás nem volt kimutatható (9A ábra). Ezzel szemben a 6-7 napos állatok húgyhólyagdarabjainak felében egy alacsony amplitúdójú, lassú spontán aktivitást lehetett kimutatni (n=4). Ezen húgyhólyagkontrakciók amplitúdója (0,1-2 mN) és frekvenciája teljesen szabálytalan volt.

Sokkal szabályosabb és nagyobb amplitúdójú (0,1-4 mN) spontán húgyhólyagaktivitás mutatható ki a 2 hetes állatokban (n=15) (9B és 10. ábra).



### 9. ábra

Különböző életkorú patkányok húgyhólyagjainak bázisából, illetve kupolájából származó izomdarabok spontán kontrakciós görbéinek Fourier-transzformációs (FFT) analízise. Minden egyes panel felépítése hasonló, felül a kontrakciós görbék, míg alul a nekik megfelelő FFT görbék vannak feltüntetve. A nyilak az FFT görbén meghatározható csúcsokat jelölik. A spontán hólyagaktivitás nem volt detektálható a 3 napos állatban (A), de már igen kifejezett volt a 2 hetes patkányban (B). A 2 hetes állat FFT görbéjén 1 csúcs mutatható ki, ami gyorsabb aktivitást mutat a bázis esetén ( $0,21 \pm 0,03$  Hz) a kupola hasonló paraméteréhez viszonyítva ( $0,08 \pm 0,01$  Hz). A 3-4 hetes állatokból származó hólyagbázis izomdarabok esetén (C) már egy második csúcs is kimutatható az FFT görbéken (hozzávetőleg 0,5 Hz). Ez a második FFT csúcs szintén megtalálható az 5 hetes állatok esetében mind a hólyag bázis, mind a kupola izomdarabokon. Az 5 hetes állatokban a bázisról származó izomdarabok esetén a második FFT csúcs relatív nagysága egyre kifejezettebbé vált az első FFT csúcshoz viszonyítva. A vízszintes vonal 30 s, míg a függőleges vonal 5 mN. Az FFT görbék esetén a Mag (ordinata) az FFT spectrum magnitúdóját jelenti.

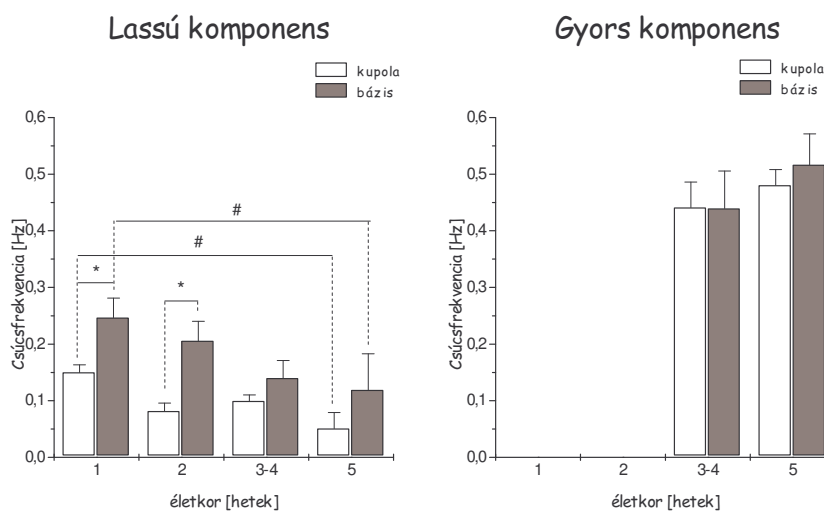
A továbbiakban a kontrakciós görbékből a gyors Fourier transzformáció felhasználásával elkészítettük a görbék FFT spektrumát, ezáltal meghatároztuk a kontrakciós hullámok domináns frekvenciáját, illetve frekvenciáit. A 2 hetes állatokból izolált húgyhólyagdarabok esetén csupán egyetlen domináns frekvenciát sikerült kimutatni, ami

azonban szignifikánsan ( $P < 0,05$ ) gyorsabb volt a húgyhólyag bázison ( $0,21 \pm 0,03$  Hz), mint a kupola területén ( $0,08 \pm 0,01$  Hz, 10. ábra). A 3-4 hetes állatok ( $n=14$ ) húgyhólyagdarabkái nagyon érdekesen viselkedtek. Már a regisztrált görbéken is látható, hogy két egymástól különböző görbe összegződésekként alakultak ki. A kontrakciós görbe egyrészt egy alacsonyabb amplitúdójú ( $< 0,5$  mN) és nagyobb frekvenciájú (*gyors komponens*,  $0,43 \pm 0,07$  és  $0,41 \pm 0,05$  Hz, bázis és kupola,  $P > 0,05$ ), másrészt pedig egy nagyobb amplitúdójú (2-7 mN), de alacsonyabb frekvenciájú (*lassú komponens*,  $0,14 \pm 0,03$  és  $0,1 \pm 0,01$  Hz, bázis és kupola,  $P > 0,05$ ) görbe összegekként jött létre (9C és 10. ábra). A gyors komponens a bázis izomdarabkák 70 %-ánál, illetve a kupola izomdarabok 20 %-ánál volt kimutatható.

Mivel a 3 és a 4 hetes állatok spontán kontrakcióiban nem találtunk különbséget, így a továbbiakban négy állatcsoportot különböztettünk meg: 1 hetes (3-7 napos), 2 hetes (8-15 napos), 3-4 hetes (16-

28 napos), illetve 5 hetes (29-35 napos) patkányokat. Az 5 hetes állatokból ( $n=13$ ) származó húgyhólyagdarabok több mint 70%-ánál szintén kimutatható

volt mind a gyors, mind a lassú komponens, azonban ez utóbbi amplitúdója 1-2 mN-ra csökkent. A

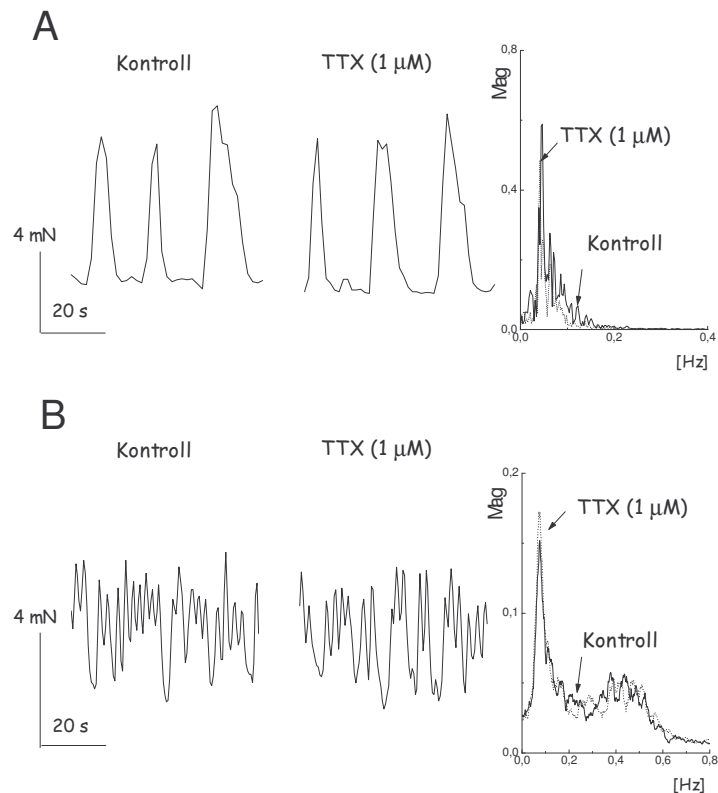


**10. ábra**

Az FFT görbék gyors és lassú csúcsainak életkorfüggése 1-5 hetes újszülött patkányok húgyhólyagjában. A lassú komponens frekvenciája az életkor előrehaladtával folyamatosan csökkent, mind a bázis, mind a kupola esetén. A hólyagbázis esetén a meghatározott FFT lassú komponens frekvenciája nagyobb volt a kupola hasonló paraméteréhez viszonyítva. A gyors FFT komponens nem figyelhető meg az első két postnatalis héten, viszont kimutatható a 3-5 hetes állatokban. A szignifikáns különbségeket a \* és a # jelöli (\* bázis vs. kupola az azonos életkori csoportban, # 1 hetes vs. 5 hetes értékek az azonos hólyagterület esetében).

kontrakciós görbe FFT spektrumán a lassú komponens magnitúdója csökkent, és a gyors komponens vált dominánssá (9D és 10. ábra).

### 3.2.2. A tetrodotoxin és az atropin hatása a patkány húgyhólyag spontán kontrakcióinak amplitúdó és frekvencia értékeire

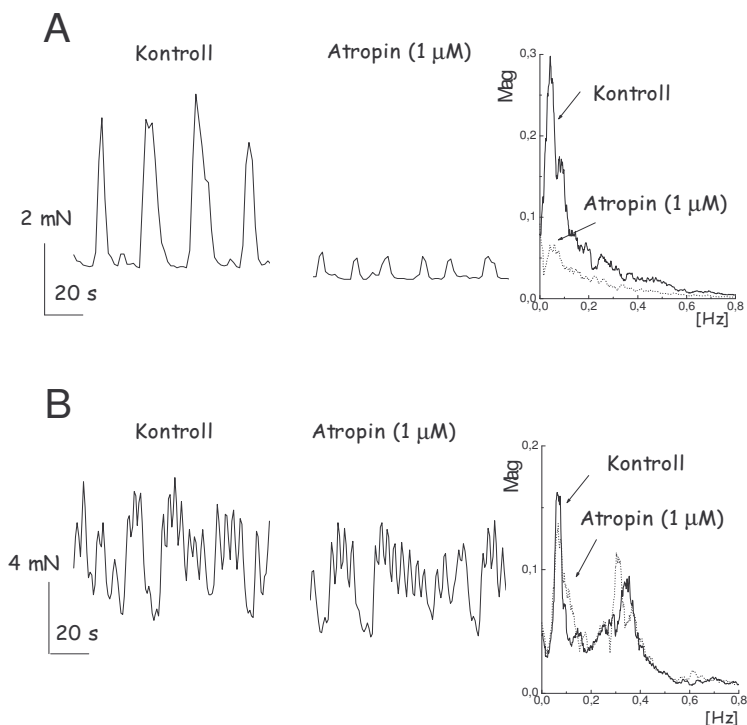


11. ábra.

*1 μM TTX hatása a patkány húgyhólyag spontán kontrakciók amplitúdó és frekvencia értékeire. A bemutatott görbék 2 (A), illetve 4 hetes (B) állatok hólyag kupoláiból készített izompreparátumokat mutatnak 1 μM TTX adagolása előtt (bal oszlop), illetve közben (középső), valamint a két görbéből képzett FFT görbe (jobb oszlop). 1 μM TTX alkalmazása nem befolyásolta sem a kontrakciós, sem az FFT görbét. A folyamatos FFT görbe a kontroll, míg a szaggatott, a TTX kezelés hatását mutatja. A vízszintes vonal az időt (20 s), a függőleges pedig a kontrakciós erőt (4 mN) jelenti.*

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy kimutatható-e kapcsolat a spontán kontrakciók és a húgyhólyagot beidegző neuronális rendszer között. Ezt legegyszerűbben az idegsejtek TTX-el (1 μM) történő gátlásával lehetett tanulmányozni. Az alkalmazott TTX-nek egyik életkorban sem volt kimutatható hatása a húgyhólyag darabok spontán kontrakcióinak

amplitúdó és frekvencia értékeire (11. ábra, n = 6, a 2-3-hetes patkánycsoportnál, n = 9, a 4-5-hetes patkánycsoport esetén).



**12. ábra.**

*1 μM atropin hatása a patkány húgyhólyag spontán kontrakciók amplitúdó és frekvencia értékeire. A bemutatott görbék 2 (A), illetve 4 hetes (B) állatok hólyag kupoláiból készített izompreparátumokat mutatnak 1 μM atropin adagolása előtt (bal oszlop), illetve közben (középső), valamint a két görbéből képzett FFT görbét (jobb oszlop). 1 μM atropin csökkentette a kontrakciók amplitúdóját a 2 hetes állatokban, de gyakorlatilag hatástalan volt a 4 hetes állatok esetében. A vízszintes vonal 20 s-t, a függőleges pedig 4 mN kontrakciós erőt jelent.*

További kérdésként adódott az is, hogy az előzőekben bemutatott kísérletek alapján a neuronális rendszernek nincs számottevő hatása a spontán kontrakciókra, de vajon az ACh, mint neurotranszmitter képes-e befolyásolni a spontán húgyhólyagaktivitást.

Jól ismert az atropin azon hatása, hogy képes gátolni az ACh hatását a muscarinos acetilkolin receptoron. A 12. ábra a spontán izomaktivitás atropinfüggését mutatja be. A regisztrált kontrakciós görbén is megfigyelhető már az atropin (1 μM) hatására bekövetkező amplitúdó csökkenés, ami a 2-3 hetes patkányokban (12A ábra) átlagosan  $65 \pm 8$  %-os volt a kupola és  $39 \pm 15$  %-os a bázis területén (n = 9). Az atropin sokkal kevésbé volt hatásos a

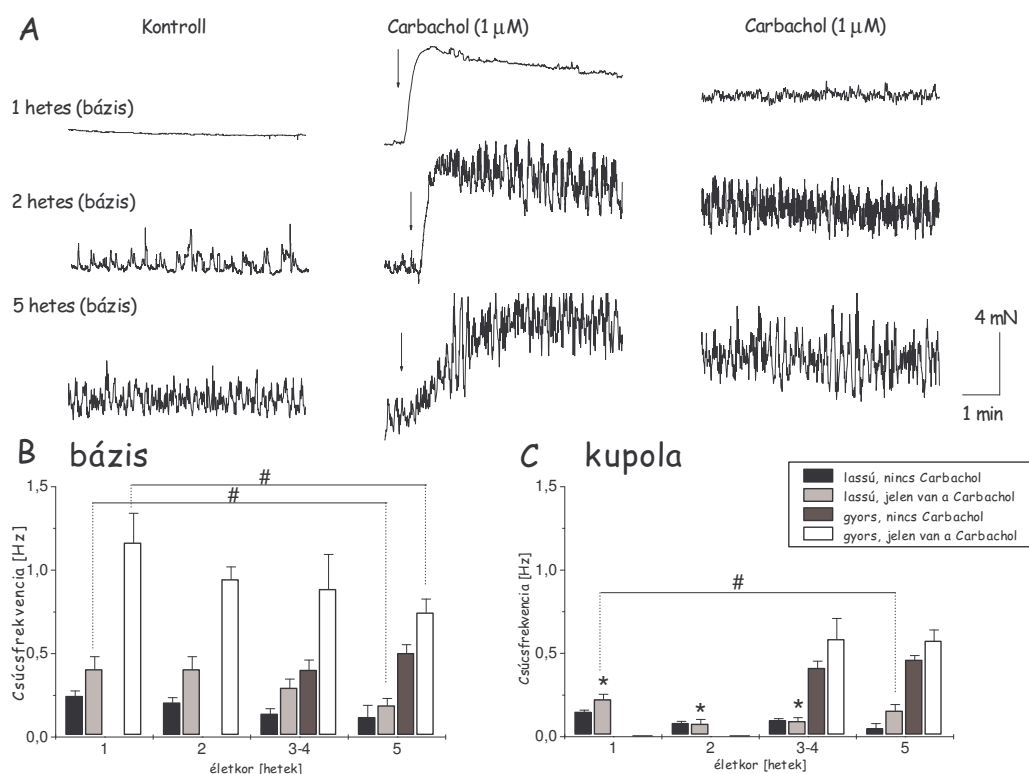
spontán kontrakciókon a 4-5 hetes állatokból (12B ábra) származó húgyhólyagdarabok esetén, mivel az amplitúdó csökkenés átlagosan  $23 \pm 6$  %-os volt a bázis és mindössze  $8 \pm 3$  %-os a kupola területén ( $n = 11$ ), amely azonban szignifikáns eltérést ( $P < 0,05$ ) jelent a két húgyhólyagterület között.

Az atropin csökkentette az izmok bazális tónusát is. Ez a hatás ugyancsak kifejezettebb volt a 2-3 hetes állatok esetén ( $63 \pm 10$  %,  $58 \pm 9$  %, kupola és bázis) a 4-5 hetes állatokon kapott értékekhez hasonlítva ( $22 \pm 6$  %,  $44 \pm 5$  %, kupola és bázis).

### **3.2.3. Carbachol hatása a patkány húgyhólyag spontán kontrakcióinak amplitúdó és frekvencia értékeire**

A kolinerg receptor agonista CCh ( $1 \mu\text{M}$ ) alkalmazásakor először a húgyhólyagizomzat nagyfokú tónusos kontrakciója alakult ki minden vizsgált életkorban, majd ezt követően a spontán kontrakció amplitúdójának és frekvenciájának változása is kimutatható volt (13. ábra).

Az 1 hetes állatokból származó húgyhólyagdarabok 60%-ában a CCh facilitálta a spontán kontrakciók kialakulását. A kontrakciók lassú komponensének csúcshékvenciája szignifikánsan ( $P < 0,05$ ) magasabb volt (minden vizsgált életkorban) a húgyhólyagbázis izomdarabokon ( $0,21 \pm 0,03$  Hz-től  $0,41 \pm 0,08$  Hz-ig) a kupola izomdarabokon meghatározott értékekhez viszonyítva ( $0,08 \pm 0,01$ -től  $0,23 \pm 0,03$  Hz-ig) (13B és 13C ábra). A kontrakciók gyors komponense CCh alkalmazását követően kimutathatóvá vált már az 1-2 hetes állatok esetében is a húgyhólyagbázis izomzatán, viszont továbbra sem volt kimutatható a kupola izomzaton (13B és 13C ábra). Carbachol alkalmazásakor (13B és 13C ábra), a CCh mentes értékekhez hasonlóan szignifikánsan ( $P < 0,05$ ) nagyobb volt a lassú komponens hékvenciája a húgyhólyagbázis izmokban a kupolaizomzathoz viszonyítva (a könnyebb összehasonlíthatóság miatt a 10. ábrán bemutatott adatokat a 13B és 13C ábrákon is feltüntettük).



### 13. ábra

1 mM Carbachol hatása a spontán húgyhólyagkontrakciókra újszülött patkányban. Az A panelen 5 napos (felső), 2 hetes (középső), valamint 5 hetes (alsó) állat hólyagbázisából készített preparátum spontán kontrakciói vannak feltüntetve 1 mM CCh adagolását megelőzően (kontroll, bal oldal), valamint a szer alkalmazása alatt (jobb oldal). A vízszintes vonal 1 percet, a függőleges pedig 4 mN kontrakciós erőt jelent. A nyíl a CCh alkalmazás kezdetét jelöli. A B és C panel a gyors és a lassú komponensek életkorfüggését mutatja CCh jelenlétében, valamint kontroll körülmények között. A könnyebb összehasonlíthatóság miatt a 10. ábrán feltüntetett értékek ezen az ábrán újra feltüntetésre kerültek. A szignifikáns különbségeket a \* és a # jelöli (\* bázis vs. kupola értékek az azonos életkori csoportban, # 1 hetes vs. 5 hetes értékek az azonos hólyagterület esetében). A CCh minden vizsgált korcsoportban szignifikánsan növelte a spontán kontrakciók frekvenciáját, kivéve 1) az 5 hetes állatok hólyagbázisának lassú komponensét, 2) 3-4 hetes állatok hólyagkupolájának lassú komponensét, és 3) az 1-2 hetes állatok hólyagbázisának gyors komponensét, abban az esetben, ha az detektálható volt. Megfigyelhető, hogy CCh alkalmazását követően az FFT gyors komponens a hólyagbázison minden életkori csoportban kimutatható volt, míg a kupola tekintetében csak a 3-5 hetes állatok esetében volt megfigyelhető.

A 2 hetes állatokban a CCh növelte a lassú komponens frekvenciáját a húgyhólyagbázis izomdarabokon, de hatástalan volt a kupola területéről származó izmokon (13B és 13C ábra). Az 1-2 hetes állatokban a CCh növelte a gyors komponens frekvenciáját is a bázis izomdarabokon, de nem volt hatása a kupola izomdarabokra. A 3-4 hetes patkányok esetén a CCh ugyancsak szignifikánsan fokozta a lassú komponens frekvenciáját a bázis izmokon, míg hatástalan volt a kupola területén. Az 5 hetes patkányoknál a szer nem

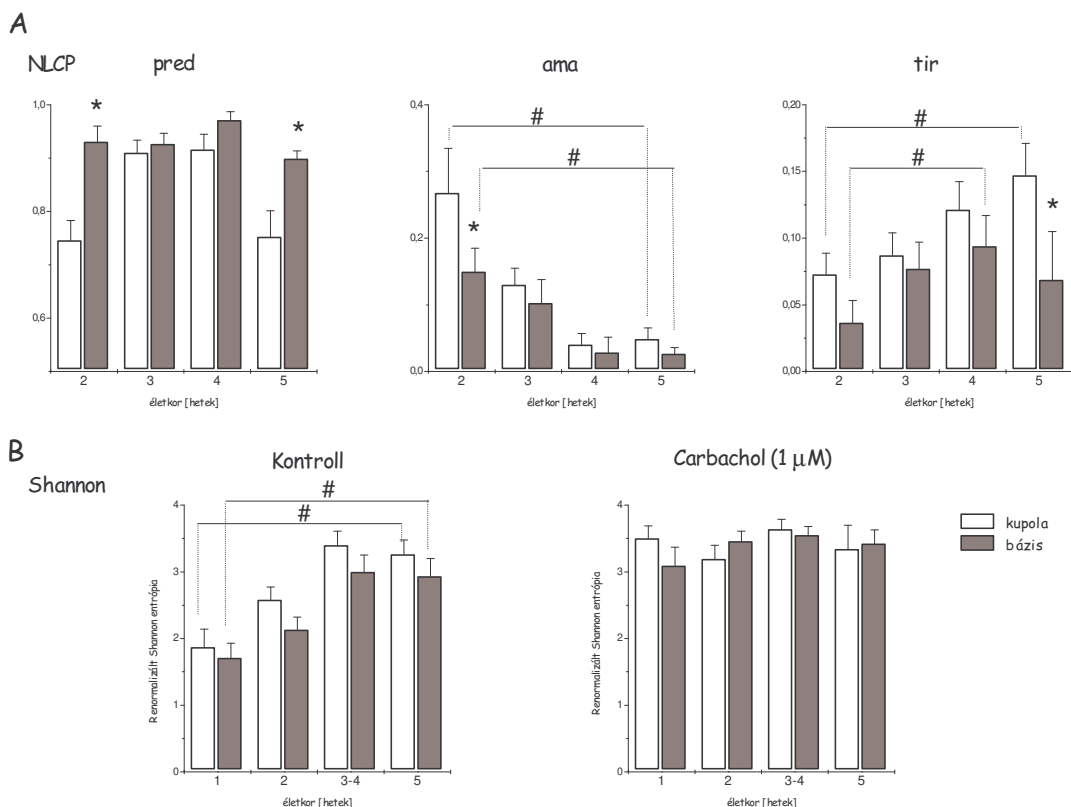
befolyásolta a lassú komponens frekvenciáját egyik területről származó izmokon sem ( $0,19 \pm 0,04$  és  $0,16 \pm 0,04$  Hz, bázis és kupola,  $P > 0,05$ ). A 3-4, valamint 5 hetes patkányok húgyhólyagdarabjainál alkalmazott CCh növelte a gyors komponens frekvenciáját, ráadásul szignifikánsan különböző gyors komponens hozott létre a bázis és a kupola izomdarabjain ( $0,75 \pm 0,08$  és  $0,58 \pm 0,07$  Hz, bázis és kupola,  $P < 0,05$ ). Ez a különbség a CCh-al nem kezelt húgyhólyagban nem volt kimutatható (13. ábra).

#### 3.2.4. A spontán kontrakciók nemlineáris analízise

A húgyhólyag spontán kontrakciós aktivitásának mintázatát NLCP teszt segítségével vizsgáltuk meg a különböző életkorú patkányok esetében (14A ábra). Az 1 hetes állatcsoport 13 egyed tartalmazott, azonban a spontán izomkontrakciók csak 3 patkány esetében voltak észlelhetőek (5-7 napos patkányok). Az alacsony esetszám miatt az 1 hetes állatcsoport NLCP értékei az ábrán nem kerültek bemutatásra, azonban a kontrakciók jól láthatóan szabályosak voltak, amit az individuális görbék NLCP analízise is alátámasztott, hiszen az *ama* és *tir* értékek nullához közeli értékeket mutattak, miközben a predikciós szám (*pred*) közel 1 volt, ami reguláris kontrakcióra utalt. A 2 hetes húgyhólyagok esetén a *pred* értékében a bázis izomdaraboknál ( $0,93 \pm 0,03$ ) nem tapasztaltunk számottevő változást az 1 hetes értékekhez viszonyítva. Ezzel szemben a *pred* csökkent a kupola izomdarabok esetén ( $0,75 \pm 0,04$ ) utalva a regularitás csökkenésére. Az irregularitás növekedésére az *ama* és a *tir* analízis adott választ, miszerint az egyedi kontrakciók amplitúdó és frekvencia variabilitása sokkal kifejezettebb a kupola izmokban (*ama*:  $0,27 \pm 0,07$ , *tir*:  $0,074 \pm 0,015$ ) mint a bázisizomzatban (*ama*,  $0,15 \pm 0,03$ , *tir*,  $0,037 \pm 0,017$ ). A 3 hetes állatokban az amplitúdó variabilitás tovább csökkent (*ama*,  $0,13 \pm 0,03$  és  $0,1 \pm 0,04$ , kupola és bázis), a frekvencia variabilitás viszont növekedett. Az *ama* további csökkenése és a *tir* emelkedése volt kimutatható a 4-5 hetes állatok esetében is, de a *tir* növekedés sokkal kifejezettebbnek bizonyult a kupola izomzat kontrakcióin. Az 5 hetes állatokból izolált húgyhólyagdarabok

esetén a kontrakció regularitását leíró *pred* paraméter csökkent a kupola izmokon, ami fokozott irregularitásra utal. Ennek az oka az, hogy a kontrakciók közötti időintervallumok variabilitása szignifikánsan ( $P < 0,05$ ) növekedett ( $0,07 \pm 0,02$  a 2 hetes húgyhólyagokban, míg  $0,15 \pm 0,024$  az 5 hetes húgyhólyagokban). További érdekes megfigyelés volt az, hogy a regularitásban megfigyelt különbségek a kupola és a húgyhólyagbázis között megszűntek  $1 \mu\text{M}$  CCh alkalmazását követően.

Az adatokat egy sokkal tradicionálisabb módszerrel, a Shannon-entrópia analízissel is megvizsgáltuk. Ennek a módszernek az amplitúdótól független formáját, a renormalizált Shannon-entrópiát használtuk. A húgyhólyagdarabok kontrakcióinak frekvencia függő komplexitása regulárisabb volt az 1 hetes patkányokban (14B ábra). A renormalizált Shannon-entrópia értéke mind a kupola, mind a húgyhólyagbázis izomdarabkáinak kontrakciójánál kisebbnek adódott 2-nél. Tudjuk (Bondarenko, 1997), hogy a renormalizált Shannon-entrópia esetén a nagyobb entrópia értékek jelentik a kevésbé szabályos folyamatokat. Az idősebb állatokból származó izomdaraboknál a Shannon-entrópia értéke szignifikánsan növekedett (14B ábra) utalva arra, hogy az alacsony komplexitású szinkron izomaktivitás eltűnt, és a 3-5 hetes patkány húgyhólyagokban egy komplex, aszinkron izomaktivitás alakult ki. Ebben az életkorban az entrópia értéke elérte a 3-t. További érdekesség, hogy nem volt szignifikáns az eltérés a kupola és a bázis entrópiák tekintetében egyik életkorban sem. Az entrópia értékek életkorfüggése azonban megszűnt  $1 \mu\text{M}$  CCh (14B ábra) alkalmazásakor. Hasonló eredményt kaptunk akkor is, amikor egy új entrópia módszert, az ApEn-t használtunk a görbék analíziséhez (ezek az adatok nem kerültek bemutatásra).



#### 14. ábra

A spontán húgyhólyagkontrakciók NLCP és renormalizált Shannon-entrópia módszerek felhasználásával készített nemlineáris matematikai analízise. A: A predikció (*pred*), az amplitúdó aszimmetria (*ama*) és az idő irreverzibilitás (*tir*) értékeket határoztuk meg NLCP teszt segítségével. Az *ama* értéke az életkor előrehaladtával csökkent, ami arra utal, hogy a nagy amplitúdójú, variábilis kontrakciókat, egy alacsonyabb és homogénebb amplitúdójú kontrakció váltotta fel. A *tir* paraméter szignifikánsan növekedett az életkor előrehaladtával, ami a hólyag kaotikusabb aktivitására utal az idősebb állatok hólyagjaiban. B: Meghatároztuk a görbék entrópiáját is, a renormalizált Shannon-entrópia módszer segítségével kontroll esetben és 1 μM CCh adagolása után is. Az entrópia értékek növekedtek az életkor előrehaladtával, utalva a hólyagkontrakciók kaotikusabb voltára. A CCh növelte az entrópiát és megszüntette az életkorfüggést. A szignifikáns különbségeket a \* és a # jelölik (\* bázis vs. kupola értékek az azonos életkori csoportban, # 1 hetes vs. 5 hetes értékek az azonos hólyagterület esetében). Fontos megemlíteni, hogy a nagyobb *ama*, *tir*, és renormalizált Shannon-entrópia, valamint az alacsonyabb *pred* értékek a kaotikusabb aktivitásra utalnak.

### 3.3. A fagyasztás hatása a húgyhólyag funkciójára

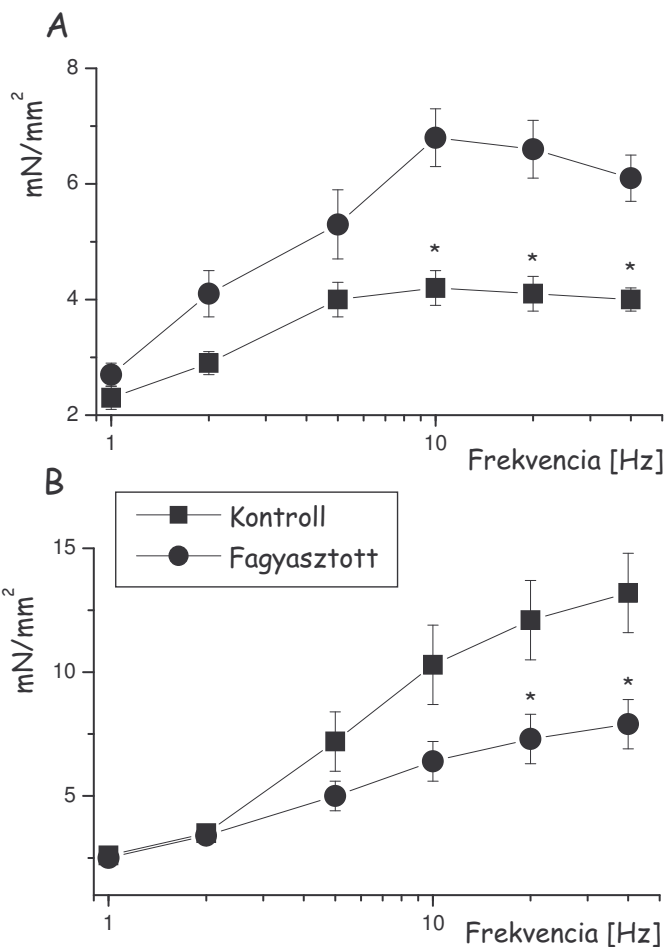
#### 3.3.1. A fagyasztás hatása a teljes húgyhólyag működésére

A fagyasztást követően öt nappal a beavatkozás helyén hegképződést tudunk kimutatni. A makroszkópos kép és a peritonealis letapadás alapján a húgyhólyag gyulladását valószínűsítettük. Mindezt alátámasztotta a mikroszkópos kép is, hiszen az érintett területen

fibrózist és fehérvérsejt infiltrációt láttunk. Azok az izomszövet darabok, amelyek a fagyasztott területről származtak, nem voltak ingerelhetők sem elektromosan, sem a purinoreceptorokat serkentő  $\alpha$ - $\beta$ -mATP adagolása által. Ezzel szemben azon izomdarabok, amelyek 2-3 mm-re a sérüléstől helyezkedtek el, már képesek voltak összehúzódní.

### 3.3.2. A különböző ingerfrekvenciák hatása az ép és a fagyasztást elszenvedett húgyhólyagban

A húgyhólyagból izolált izomdarabokat különböző frekvenciájú (1-40 Hz) és ütésszámú (10 és 80) ingerekkel stimuláltuk. Ahogy a korábbiakban is megfigyelhető volt (Somogyi és mtsai, 1998) a kolinerg kontrakciók sokkal kifejezettebbek voltak a purinerg kontrakciókhoz viszonyítva akkor, amikor hosszabb ingerlést (80 inger) használtunk. A sértett húgyhólyagdarabok



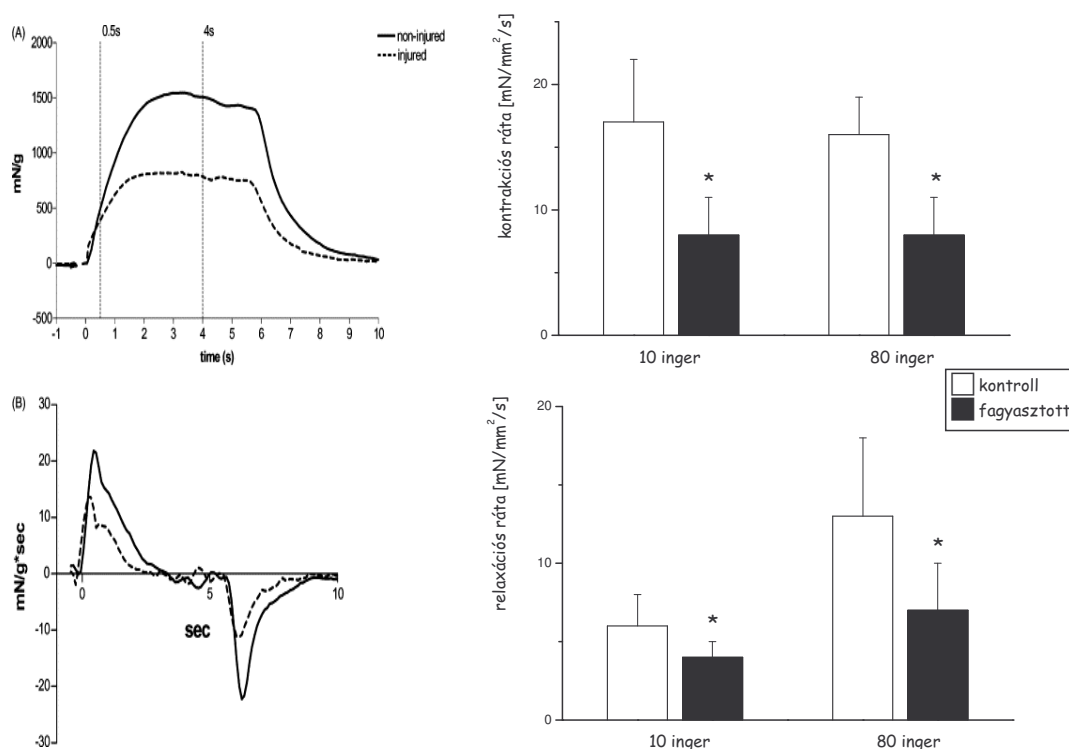
**15. ábra** A fagyasztás hatása az idegingerléssel kiváltott izomkontrakciókra. Az izomösszehúzódnást különböző frekvenciájú és ütésszámú, 10 (A) és 80 (B), téringerléssel hoztuk létre. Szignifikáns eltérés volt kimutatható a kontroll (n=12) és a kezelt (n=38) állatsoport között 10 és 40 Hz között, ha 10 ingert alkalmaztunk, illetve 20 és 40 Hz között 80 inger esetén ( $p < 0.05$ ).

szignifikánsan alacsonyabb kontrakciós erőt tudtak kialakítani, mind a rövid, mind a hosszú ingerlés hatására (15. ábra). Rövid ingerlést (10 inger) alkalmazva 10 és 40 Hz közötti stimuláció esetén az erő kifejtésben bekövetkezett különbség állandó volt az ép és a

fagyasztással sértett húgyhólyagdarabok között (16A ábra). Ezzel ellentétben hosszú ingerlés esetén (80 ütés) a két húgyhólyagpopuláció kontrakciós ereje közötti különbség frekvencia függően növekedett (16B ábra).

### 3.3.3. A maximális kontrakció és relaxáció az ép és a fagyasztást elszenvedett húgyhólyagban

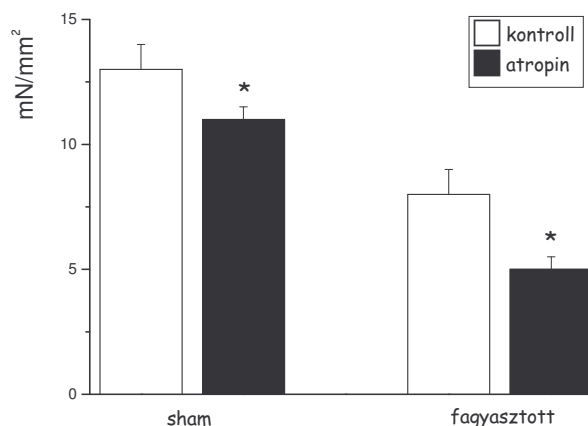
A kontrakció kialakulás sebességének csúcsertékét az erőgörbék idő szerinti első deriváltjának (mN/g\*dt) pozitív csúcsából, míg a relaxáció sebességét a derivált negatív csúcsából határoztuk meg. Ahogy a 16A és B. ábrán is látható, mind a kontrakció, mind a relaxáció csökkent, valamint a hozzájuk tartozó sebesség értékek lelassultak a sértett húgyhólyagban. Megfigyelhető, hogy ezek a változások függetlenek voltak az ingerlés paramétereitől (16. ábra).



**16. ábra.** Reprezentatív kontrakciós görbék (A), illetve az idő szerinti első deriváltak (B) az téringerléssel stimulált hólyag izomdarabokon, valamint a fagyasztás hatása a kontrakció (C) és a relaxáció (D) maximális sebességére 20 Hz-es, 10 és 80 ingeret tartalmazó téringerlés esetén. A függőleges vonalak a kontrakciók 0,5 és 4 s-nál mért nagyságát mutatják. A folyamos vonal egy 80 ingerrel, a szaggatott vonal pedig egy 10 ingerrel kiváltott kontrakciót reprezentál (A). Az idő szerinti első derivált pozitív csúcsát, mint a kontrakció maximális sebességét, a negatív csúcsot pedig, mint a relaxáció maximális sebességét értelmeztük (B). Az idő szerinti első deriváltak a WindqEX program segítségével lettek meghatározva, dt=100 ms figyelembevételével. A szimbólumok (\* és \*\*) a kontroll (n=12) és a kezelt (n=38) állatok közötti statisztikailag szignifikáns különbségeket jelölik ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ).

### 3.3.4. Az atropin hatása a kontrakcióra az ép és a fagyasztást elszenvedett húgyhólyagban

A muscarinos receptor gátló atropin ( $1 \mu\text{M}$ ) téringerléssel kiváltott (20 Hz, 80 stimulus) neuronális kontrakciókra kifejtett hatásait 15 perccel a szer adagolásának elkezdése után teszteltük (17. ábra). Bár az atropin mind az egészséges, mind a fagyasztáson átesett

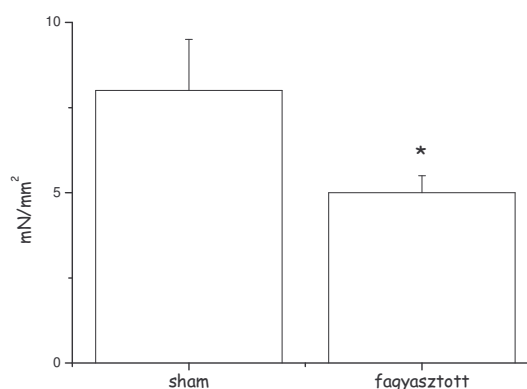


húgyhólyagdarabokban gátolta a neuronális kontrakciókat, a hatás sokkal kifejezettebb volt a sértett húgyhólyagok esetén.

**17. ábra** Az atropin ( $1 \mu\text{M}$ ) hatása a neurogén kontrakciókra kontroll ( $n=12$ ) és kezelt ( $n=38$ ) hólyag esetén, 20 Hz és 80 inger alkalmazásával. Az atropin szignifikánsan csökkentette az ideg ingerléssel kiváltott kontrakciókat, mind a sham operált, kontroll, mind a kezelt állatcsoport esetében. A szimbólum (\*) a kontroll és a kezelt állatok közötti statisztikailag szignifikáns különbséget jelöli ( $p < 0.05$ ; páros t-próba).

### 3.3.5. Az $\alpha$ - $\beta$ -mATP hatása a kontrakcióra az ép és a fagyasztáson átesett húgyhólyagban

Lehetőségünk volt a purinerg kontrakciók vizsgálatára is, melyek során az atropin adagolását  $\alpha$ - $\beta$ -mATP-vel is kiegészítettük. Az  $\alpha$ - $\beta$ -mATP sokkal effektívebben csökkentette a sértett húgyhólyagok kontrakciós paramétereit a kontroll értékekhez viszonyítva (18. ábra).



**18. ábra** Az  $\alpha$ - $\beta$ -mATP ( $50 \mu\text{M}$ ) hatása a hólyag izomdarabok kontrakciójára,  $1 \mu\text{M}$  atropin előkezelést követően a kontroll ( $n=8$ ) és a kezelt ( $n=32$ ) állatok esetében. A szimbólum (\*) a kontroll és a kezelt állatok közötti statisztikailag szignifikáns különbséget jelöli ( $p < 0.05$ ).

## 4. Megbeszélés

### 4.1. Az $\alpha_1$ adrenerg receptorok altípusainak feltérképezése a patkány húgyhólyagban

A bemutatott kísérleteink -a korábbi eredményekkel egyezően (Somogyi és *mtsai*, 1995)- bizonyítják, hogy a húgyhólyag izomzatában az  $\alpha_1$  adrenerg receptor agonista PE, mind pre-, mind postjunctionalis hatásokkal rendelkezik. A PE fokozta az ideg ingerléssel kiváltott kontrakciókat (prejunctionalis hatás), valamint az izomzat bazális tónusát (postjunctionalis hatás). Specifikus gátlószerek alkalmazásával bebizonyítottuk, hogy a pre- és a postjunctionalis hatásokért az  $\alpha_1$  adrenerg receptorok különböző altípusai tehetők felelőssé.

Az már korábbról ismert volt, hogy a PE pre- és postjunctionalis hatásai egyaránt gátolhatók a nem szelektív  $\alpha_1$  adrenerg receptor gátlószereként ismert terazosinnal (Somogyi és *mtsai*, 1995). Azonban a pre- és postjunctionalis membránban található  $\alpha_1$  adrenerg receptorok szubtípusainak megoszlása nem volt ismert. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az idegcsomkokon keresztül téringlerléssel kiváltott izomkontrakciók a specifikus  $\alpha_{1A}$  receptor gátló 5-MU-val gátolhatók voltak (Gross és *mtsai*, 1988). Az alkalmazott 5-MU jobbra tolta a PE dózis-hatás görbét, és a görbe Schild-analízise az antagonizmus kompetitív voltára utalt (6. ábra). A kísérleteink azt is igazolták, hogy az egyéb szelektív  $\alpha_{1A}$  antagonisták, úgymint a WB-4101 (Minneman és *mtsai*, 1988), vagy a Rec15/2739 (Testa és *mtsai*, 1997; Leonardi és *mtsai*, 1997) esetében is kimutatható volt a kompetitív antagonizmus (2. táblázat). Ezzel szemben, az  $\alpha_{1B/1D}$  adrenerg receptorokon sokkal hatékonyabbnak tekintett CEC (Bylund és *mtsai*, 1994; Hieble és *mtsai*, 1995) nem befolyásolta PE által fokozott neuronálisan kiváltott kontrakciókat. Ez arra utalt, hogy az  $\alpha_{1A}$  receptorok részt vettek a serkentő folyamatban, míg az  $\alpha_{1B/1D}$  receptoroknak a szerepe ebben a folyamatban elhanyagolható volt.

Az  $\alpha_{1A}$  adrenerg receptor antagonistája WB-4101 gátolta a PE által fokozott ACh-felszabadulást. Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy az  $\alpha_{1A}$  adrenerg receptorok a

húgyhólyagban a postganglionális prejunctionális membránban található. Ámbár az alkalmazott WB-4101 koncentráció (100 nM) felette volt az  $\alpha_{1A}$  szelektív koncentrációnak (Hieble és *mtsai*, 1995), a CEC nem gátolta a PE-által serkentett ACh-felszabadulást utalva arra, hogy az  $\alpha_{1B/1D}$  adrenerg receptoroknak nincs szerepe a preszinaptikus serkentésben. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a PE alkalmazását követő fokozott ACh-felszabadulás a legfontosabb mechanizmus a neuronális kiváltott kontrakciók fokozódásában.

Korábbi tapasztalataink alapján a kísérletekben alkalmazott elektromos ingerlés mind az ACh, mind a NA felszabadulását előidézte a patkány húgyhólyagban (Somogyi és *mtsai*, 1995 és 1996), ezért fent állt annak a lehetősége, hogy az elektromos ingerlés kapcsán felszabaduló endogén NA aktiválta a preszinaptikus  $\alpha_{1A}$  receptorok egy részét, és ezáltal fokozva az ACh-felszabadulást. Azonban PE hiányában alkalmazott WB-4101 nem gátolta az elektromos ingerléssel kiváltott ACh-felszabadulást, ami azt jelezte, hogy az endogén NA nem aktiválta a preszinaptikus  $\alpha_{1A}$  receptorokat. Ez az eredmény összevágott azzal a korábbi megfigyeléssel, hogy terazosin, egy nem szelektív  $\alpha_{A1}$  antagonist, nem befolyásolta az ACh-felszabadulást, illetve az idegingerléssel kiváltott kontrakciókat patkány húgyhólyagban (Somogyi és *mtsai*, 1995). Másfelől, a húgyhólyag falában található idegvégződésekből felszabaduló ACh képes befolyásolni a NA-felszabadulást (Mattiasson és *mtsai*, 1987; Somogyi és de Groat, 1990 és 1999), ami arra utal, hogy a kolinerg és az adrenerg receptorok közel helyezkedhetnek el egymáshoz, esetleg egy heteroszínaptikus interakciót hoznak létre. Ez a két receptor populáció egymáshoz közeli állapota azonban nem magyarázza az endogén NA hatástalanságát. Sokkal inkább valószínű, hogy a felszabadult endogén NA koncentrációja nem volt elég nagy ahhoz, hogy aktiválja a receptorokat. Bár kimutatható, hogy a PE postjunctionálisan hatva megnöveli a húgyhólyag bazális tónusát, ez a hatás nagy valószínűséggel jelentéktelen az idegi stimulációval kiváltott kontrakciók esetén, mivel az exogén ACh hatása nem fokozható a külső PE adagolással (Somogyi és *mtsai*, 1995).

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy fiatal patkányban (3 hónapos, 250-300 g, Somogyi és mtsai, 1995) nem mutatható ki egy konzisztens hatás a PE adagolást követően. A PE csupán a húgyhólyagdarabok kevesebb, mint 10 %-ban volt hatásos, ami arra utalt, hogy az  $\alpha_1$  típusú adrenerg transzmisszió jelentősége csekély a fiatal patkányokban. Jelen kísérleteink azonban azt bizonyították, hogy az idősebb patkányokból (7 hónapos, vagy idősebb) származó húgyhólyagdarabokban PE adagolást követően fokozódott a bazális tónus. Úgy tűnik, hogy a PE adagolását követő hatások nagymértékben függenek az alkalmazott patkányok típusától is. Orday és mtsai (1986), valamint Suzuki és mtsai (1999) kimutatták, hogy 11 hetes patkányok húgyhólyagjaiban a PE adagolást követően fokozódott a bazális tónus. Ez a két kutatócsoport Fisher-patkányokat használt, szemben az általunk alkalmazott SD (Sprague-Dawley)-patkányokkal. Ennek az eltérésnek a hátterében nagy valószínűséggel az állhat, hogy a Fisher-patkányok húgyhólyagjában hamarabb kezdenek expresszálni az  $\alpha_1$  adrenerg receptorok, míg a Sprague-Dawley patkányokban ez a fehérjeexpressziót érintő módosulás később következik be.

A PE-által fokozott izomösszehúzódásokat a CEC (5-20  $\mu$ M) képes volt gátolni. Ez a szer az  $\alpha_{1B}$  receptorok irreverzibilis gátlószere (Han és mtsai, 1987), valamint képes az  $\alpha_{1D}$  receptorokat is gátolni (Bylund és mtsai, 1994; Hieble és mtsai, 1995). Ezzel szemben az ideg ingerléssel kiváltott kontrakciók PE-függő facilitációját nem gátolta a CEC, ami arra utalt, hogy a postjunctionalis  $\alpha_1$  adrenoreceptorok az  $\alpha_{1B}$  altípusba tartoznak.

A PE serkentő hatásainak időfüggését vizsgálva kiderült, hogy a PE hatása az ideg ingerléssel kiváltott kontrakciók és a direkt izomhatások tekintetében különböző. Míg a neuronális kontrakciókon kimutatott facilitáció nem változott az idő előrehaladtával, addig a bazális tónusra kifejtett tónusfokozó hatás fokozatosan csökkent, utalva a prejunctionalis és a postjunctionalis hatások és a folyamatok mögött álló receptorok különbségére. A postjunctionalis hatásban bekövetkező lecsengés valószínűleg a simaizom membránban található  $\alpha_1$  receptorok internalizációjának lehet a következménye (Wang és mtsai, 1997)

Mivel a patkány húgyhólyagban az  $\alpha$  adrenerg receptoroknak mindhárom altípusa kimutatható (Malloy és mtsai, 1998), ezért elvileg mind az  $\alpha_{1B}$ , mind az  $\alpha_{1D}$  altípusok előfordulhatnak a postjunctionalis membránban, és szerepük lehet a PE-mediálta hatásokban. Mivel ismert az (Wang és mtsai, 1997, Malloy és mtsai, 1998), hogy az  $\alpha_{1B}$  receptorok deszenzitizálódnak, míg az  $\alpha_{1D}$  esetén nincs megfigyelhető deszenzitizáció, ezért valószínű, hogy a PE lecsengő postjunctionalis hatása inkább az  $\alpha_{1B}$  receptorokon valósul meg.

Sajnálatos módon az alacsony koncentrációban alkalmazott CEC (2,5-20  $\mu$ M) fokozta az ideg ingerléssel kiváltott kontrakció amplitúdóját és hosszát. Mindemellett a CEC, az említett koncentrációban növelte az ACh-felszabadulást is. Az 5-MU nem volt képes gátolni ezeket a hatásokat. Mivel ismert (Bultmann és Starke, 1993), hogy a patkányban a vas deferensen a CEC képes hatni a prejunctionalis  $\alpha_2$  adrenerg receptorokra is, ezért elképzelhető, hogy a CEC ACh-felszabadulást fokozó hatása mögött az  $\alpha_2$  receptorok CEC által történő serkentése állhat. További fontos megfigyelés a CEC hatásával kapcsolatban az is, hogy a CEC által létrehozott neurogén kontrakciók amplitúdó és területnövekedését az atropin szignifikáns módon képes volt gátolni. Az atropin gátlás sokkal kifejezettebb volt a kontrakciós görbe területcsökkenését vizsgálva az amplitúdócsökkenéshez viszonyítva. Hasonló hatás mutatható ki (nagyobb mérvű csökkenés a kontrakciós görbe területében az amplitúdócsökkenéshez viszonyítva) a gerincvelő harántléziót követően, ha a kóros állapotban meghatározott értékeket az egészséges állapothoz viszonyítjuk (Somogyi és mtsai, 1998). Az is ismert (MacKenzie & Burnstock, 1984; Maggi et al., 1985; Brading & Mostwin, 1989), hogy az ideg ingerléssel kiváltott húgyhólyagkontrakció mind kolinerg, mind purinerg komponenst tartalmaz. Ez azt is jelenti, hogy az alkalmazott ideg ingerlés esetén a kolinerg hatásokban bekövetkező módosulásokat a kontrakciós görbe területében jelentkező módosulások mutatják meg (Somogyi és mtsai, 1998). A CEC kezelést követően alkalmazott atropinnak a kontrakciós görbe területén jelentkező kifejezettebb gátló hatása (CEC-kezelt vs.

CEC-nem kezelt húgyhólyag) arra utal, hogy a kontrakció kolinerger komponense fokozódott CEC hatására.

Összefoglalva, azt találtuk, hogy az  $\alpha_{1A}$  és az  $\alpha_{1B/1D}$  adrenerg receptorok a húgyhólyag különböző területein találhatóak meg patkány húgyhólyagban. Az  $\alpha_{1A}$  adrenerg receptorok a kolinerger idegvégződésekben a prejunctionalis facilitációban játszanak szerepet, míg az  $\alpha_{1B}$  vagy  $\alpha_{1D}$  adrenerg receptorok közvetlenül a simaizomkontrakciókat szabályozzák. Ezek a hatások sokkal kifejezettebbek az idősebb állatokban. A humán húgyhólyagban  $\alpha_{1A}$  és  $\alpha_{1D}$  adrenerg receptorok ugyancsak kimutathatóak (Malloy és *mtsai*, 1998). Mivel egyes elképzelések szerint az 1 típusú  $\alpha$  adrenerg receptorok szignifikáns szerepet játszhatnak az obstruktív (Lepor és *mtsai*, 1990), valamint a neurogén (Swierzewski és *mtsai*, 1994) húgyhólyagban kialakuló hyperaktivitásban, ezért a receptorok lokalizálása, a húgyhólyagkontrakciós folyamatban, valamint a prejunctionalis és postjunctionalis folyamatokban játszott szerepének tisztázása elengedhetetlen az élettani, valamint patofiziológiai történések megértéséhez. Ugyancsak fontos a receptorok pontos helyének feltérképezése a prejunctionalis  $\alpha_{1A}$  és postjunctionalis  $\alpha_{1B}$  és  $\alpha_{1D}$  receptorokon ható antagonisták kifejlesztéséhez, hiszen más-más esetben alkalmazható terápiás szer fejleszthető ki a receptor-altípusok lokalizációjának és funkciójának ismeretében.

#### **4.2. A húgyhólyagban kialakuló spontán kontrakciók vizsgálata**

Kísérleteink azt igazolták, hogy az első 5 postnatalis hét alatt a patkány húgyhólyag kontraktilitásában jelentős változások zajlanak le. A húgyhólyag alsó (bázis) és felső (kupola) részéből izolált izomdarabok spontán aktivitást mutattak, aminek az amplitúdója, frekvenciája és regularitása igen jelentős életkorfüggést mutatott. Ez a fejlődés arra utalt, hogy az egyedi simaizomsejtek elektromos és kontrakciós aktivitása megváltozik az egyedfejlődés folyamán, ami a sejt-sejt közötti kommunikációban, és ezáltal a szervben belüli elektromos szignál

továbbításában is jelentős módosulásokat eszközöl. A fiatal állatokban a húgyhólyagbázisban a kupolához viszonyítva nagyobb frekvenciájú spontán aktivitás volt kimutatható, ami arra is utalhat, hogy a két húgyhólyagterület funkciója jelentősen eltér egymástól (a húgyhólyagnyak kontrakciója a telődés fázisában, míg a kupola kontrakciója az ürítés fázisában kifejezett). Ez a spontán aktivitás nagy valószínűséggel szerepet játszik a megfelelő húgyhólyagürülés létrehozásában a neuralis vizeletürítő folyamatok kifejlődését megelőzően. Másfelől a koordinált spontán aktivitás megszűnése elősegítheti a húgyhólyag telődését is.

Korábbi kísérletek kimutatták, hogy a teljes húgyhólyagpreparátum a fejlődés első 2-3 hetében kifejezett spontán aktivitással rendelkezik *in vitro* (Sugaya és de Groat, 2000). Ezen spontán aktivitás amplitúdója nagyobb, a frekvenciája pedig kisebb volt a felnőtt állatokban mért értékekhez képest (Sugaya és de Groat, 2000), utalva arra, hogy az éretlen húgyhólyag valamilyen pacemaker központból történő stimulusból kiindulva már képes szinkronizált izomaktivitást létrehozni. A pacemaker aktivitás koordinált módon képes szétterjedni a húgyhólyagban, aktiválva a teljes húgyhólyagizomzatot. A bemutatott eredményeink valószínűsítik, hogy esetleg több ingerközpont található a húgyhólyagban, és a nagyobb frekvenciájú központ(ok) a húgyhólyagbázison található. Az általunk alkalmazott FFT analízis alapján a spontán kontrakciók frekvenciája az 1-2 hetes állatban 0,08 és 0,21 Hz között mozgott. Ezek a lassú aktivitások mind a húgyhólyag bázis, mind a kupola izomdarabokban kimutathatóak voltak, de a nagyobb frekvenciát ugyanazon húgyhólyag esetén mindig a bázisból származó izomdarabokban tudtuk kimutatni. Mindez arra utalt, hogy a húgyhólyag mindkét része képes spontán aktivitás generálására és koordinált továbbítására. Viszont, ha a szív ingerképző és ingerület vezető rendszerét tekintjük példának, akkor feltételezhetjük, hogy más szervekben, így például a húgyhólyagban is van egy magasabb ingerképző központ, amely a nagyobb frekvenciája miatt domináns, és teljes, ép húgyhólyag esetén képes meghatározni az egész szerv aktivitását. Abban az esetben viszont, ha megszakítjuk az ingerület fiziológiás terjedését, akkor az alacsonyabb pacemaker aktivitással

rendelkező, ezáltal gyérebb kontrakciót kialakító ingerképző területek feltámadnak, és elkezdik az adott húgyhólyagterület ingerlését a rájuk jellemző frekvenciával. Bár a teljes húgyhólyagon és az izomdarabokon végzett kísérletek körülményei jelentősen eltértek egymástól, meg kell említeni, hogy a spontán kontrakciók frekvenciája igen hasonló volt az 1-2 hetes állatok esetében (Sugaya és de Groat, 2000) (5-12 s a mi méréseinknél, és 20 s a Sugaya és de Groat, 2000 alapján).

A teljes húgyhólyagon és a húgyhólyagdarabokon kapott eredmények között a későbbi életkorokban is megtalálható a párhuzam. A teljes húgyhólyag esetén a spontán kontrakciók frekvenciája megnőtt, az amplitúdó lecsökkent, miközben a húgyhólyagaktivitás kaotikusabbá vált a 3-5 hetes állatokban. A FFT-al kapott eredmények hasonló változásokat mutattak a bázis és a kupola izomdarabokon. A 3 hetes állatok esetében megjelent egy gyorsabb aktivitásra jellemző csúcs (hozzávetőleg 0,4 Hz-nél). Ez a csúcs az 5 hetes állatokból származó húgyhólyagizom-darabokból meghatározott FFT görbéken egyre kifejezettebbnek mutatkozott. Ez az aktivitás frekvenciáját tekintve (2,5 s az átlagos csúcstávolság) igen hasonló a felnőtt patkány teljes húgyhólyagban meghatározott értékéhez (1,9 s, Sugaya és de Groat, 2000).

Az idősebb patkányok teljes húgyhólyagján, illetve a húgyhólyagdarabokban talált gyorsabb, kevésbé reguláris aktivitás a pacemaker központokban végbemenő változásokra is utalhat, aminek következtében egyre több, egymástól többé-kevésbé függetlenül működő központ alakul ki. Ezt a megállapítást alátámasztották a nemlineáris analízissel (ApEn) kapott eredmények is. Az 1 hetes állatokból (ez kizárólag a 6-7 napos állatokat jelenti) származó húgyhólyagdarabok esetén mind a bázis, mind a kupola izomdarabokon kimutatható volt, hogy az amplitúdó és az időaszimmetria értékek közel zérók, valamint a predikciós faktor közel 1. Ezek a paraméterek egy igen reguláris folyamatra utalnak. Ha hasonló analízisnek vetjük alá az idősebb állatokból származó görbéket, akkor azt láttuk, hogy a folyamat mind amplitúdó, mind frekvencia tekintetében sokkal irregulárisabb karakterű volt, ami ráadásul

sokkal kifejezettebbnek bizonyult a kupola területén. Ha az adatokat egy tradicionálisabb módszerrel, az entrópia vizsgálattal értékeltük, hasonló eredményeket kaptunk. Az analízishez a Shannon-entrópia amplitúdótól független változatát használtuk, ami jelen esetben leginkább a folyamat frekvenciafüggését mutatta meg. Mindezek alapján az eredmények azt mutatták, hogy a húgyhólyagizomzat spontán működése az 1-2 hetes állatokban egy szinkron, kevésbé komplex folyamat (alacsonyabb entrópia). Ezzel ellentétben az idősebb állatok esetén az értékek egy igen komplex, aszinkron folyamatra utaltak, amelynek megfelelően a húgyhólyag-aktivitás sokkal kaotikusabb volt. Ez a kaotikus működés ráadásul sokkal inkább kimutatható volt a kupola területén. Ez leginkább két folyamatra utalhatott: egyrészt a már korábban is említett multifocalis pacemaker rendszerek kialakulására, másrészt az intercellularis (gap-junction) kapcsolatokban az egyedfejlődés kapcsán bekövetkező down-regulációra (de Groat, szóbeli közlés). Hasonló megfigyeléseket tettek Kanai és mtsai (2003) optikai képalkotó eljárás alkalmazásával.

Azt is megvizsgáltuk, hogy van-e szerepe a neuralis mechanizmusoknak a spontán kontrakciók kialakításában, modulációjában. Az idegsejtekben is megtalálható nátrium csatornák gátlószere a TTX nem befolyásolta a spontán kontrakciókat, utalva arra, hogy az idegi mechanizmusok nem jelentősek a spontán kontraktilitás szabályozásában. *In vitro* gerincvelő harántsérült állatok esetében ettől eltérő eredményt kaptak, miszerint a TTX növelte a spontán kontrakciókat (Sugaya és de Groat, 1994). Mindezek, egyéb kísérletekkel kiegészítve (Sugaya és de Groat, 2002) arra utalnak, hogy a húgyhólyag tónusos gátló impulzusokat kap a gerincvelőtől, ami csökkenti a simaizomsejtek pacemaker aktivitását.

Amikor a postjunctionalis muscarinos receptorok működését atropinnal gátoltuk, a spontán húgyhólyagkontrakciók amplitúdója lecsökkent, miközben a frekvenciában nem volt szemmel látható elváltozás. Mindezeket a 2 hetes és idősebb állatokban sikerült kimutatni. Maggi és mtsai (1986) szintén kimutatták, hogy az atropinnak létezik egy kismértékű spontán kontrakciót gátló hatása a néhány napos állatokban, míg az atropin hatástalannak tekinthető az

idős állatokban. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a spontán kontrakciókat befolyásolja a kolinerg idegvégződésekből felszabaduló ACh. Mivel az atropin nem befolyásolja a spontán kontrakciók frekvenciáját, megállapíthatjuk, hogy a neuronokból felszabaduló ACh nem befolyásolja a pacemaker sejtek működését, ellenben csökkenti a sejt-sejt kommunikációt, ezáltal az ingerület húgyhólyagban történő tovaterjedését. Hasonló jellegű megfigyelést tettek Tsai és mtsai (2004), amikor megmutatták, hogy humán umbilicalis vénából származó endothelialis sejteken az ACh nikotinos receptorokon keresztül hatva down-regulálta a gap-junctionokat felépítő connexin42-t.

A postjunctionalis muscarinos receptorok CCh-al történő aktiválása egy nagy amplitúdójú izomösszehúzódást hozott létre, valamint megváltoztatta a spontán kontrakciók mintázatát is. A CCh 1 hetes állatban növelte a lassú aktivitást a húgyhólyag mindkét területén, valamint kialakította a gyors frekvenciájú hullámokat a húgyhólyagbázison, viszont nem hozta létre a kupola izomdarabokon. A kapott eredmények alapján feltételezhető, hogy a pacemaker aktivitás fokozódik egyrészt (direkt módon) a muscarinos receptorok aktiválódása által, másrészt (indirekt módon) a húgyhólyagfalban bekövetkező feszülés növekedés miatt. Ez az indirekt hatás egyrészt azért jöhet létre, mert aktiválódnak a mechanoszenzorok a húgyhólyag falában, másrészt a fokozott feszülés hat a simaizomelemek feszülésfüggő ioncsatornáinak működésére is. Bár az első lehetőség nem elhanyagolható, mások a CCh hatását uroepithelmentes egér húgyhólyagdarabokon vizsgálva a simazomhatást valószínűsítik inkább (Ekman és mtsai, 2006). A CCh hatására fokozott aktivitás háttérében a húgyhólyagfal növekvő feszülése is állhat, ami aktiválhatta a pacemaker központokat (Szigeti és mtsai, 2005).

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az újszülött patkány húgyhólyagban idegingerlés hiányában nagy amplitúdójú koordinált kontrakciók alakulnak ki, amelyeket modulál a kolinerg idegvégződésekből felszabaduló ACh. FFT analízis azt bizonyította, hogy a húgyhólyagbázison szignifikánsan nagyobb a kontrakciós aktivitás a kupolához viszonyítva,

utalva arra, hogy a nagyobb aktivitás elősegíti a húgyhólyag urethra felőli területének záródását, ily módon megakadályozva a vizelet elfolyását. A kapott eredmények ugyancsak felvetették annak a lehetőségét is, hogy a teljes húgyhólyag kontrakciós válaszában szerepet játszó pacemaker központok leginkább a bázison találhatóak, és az ingerület innen terjed rá a húgyhólyag egészére.

A koordinált, nagy amplitúdójú, alacsony frekvenciájú kontrakciós aktivitás fokozatosan csökken az idősebb állatok esetén, és a kontrakciót felváltja egy alacsony amplitúdójú, nagy frekvenciájú, irreguláris aktivitás, ami a sok pacemaker központ együttes jelenlétére és működésére is utalhat. Ez az intrinsic kontrakciós aktivitásban életkor előrehaladásával kialakuló változás időben akkor következik be, amikor a vizelet ürítése akaratlagossá válik a kísérletes állatokban (de Groat és *mtsai*, 1975, de Groat és *mtsai*, 1998, Sugaya és de Groat, 2000). A sejtek intrinsic tulajdonságaiban bekövetkező módosulások azt a célt szolgálják, hogy a szervben megjelenjen az érett vizelet tároló-ürítő funkció.

#### **4.3. A fagyasztás hatása a húgyhólyag funkciójára**

Kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a fagyasztás miként módosítja a kontraktilis funkciókat a húgyhólyagban. Az általunk is alkalmazott fagyasztásos eljárás egy olyan experimentális módszer, amit a szöveti sérülést követő megváltozott funkció, valamint a lehetséges terápiás beavatkozások vizsgálatára használnak a szív- és a vázizom esetén (Iritchev és *mtsai*, 1997, Lewis és *mtsai*, 1998, Murry és *mtsai*, 1996, Sakai és *mtsai*, 1999). Kísérleteinkben a fagyasztott húgyhólyag kontrakciója csökkent mind elektromos ingerlést, mind kémiai ( $\alpha$ - $\beta$ -mATP) stimulációt követően.

A fagyasztás által okozott mikroszkópikus és makroszkópikus eltérések csak részlegesen magyarázzák a funkcióban bekövetkezett változásokat. Azokban a kísérleteinkben, ahol az izomdarabok a fagyasztott területből lettek kivéve, gyakorlatilag lehetetlen volt bármilyen kontrakciót létrehozni akár téringerléssel, akár  $\alpha$ - $\beta$ -mATP

alkalmazásával. Bár az így előállított izomdarabok makroszkópiusan épnek tűntek, az eredményeink arra utalnak, hogy jelentősen megváltoztak a kontraktilis paraméterek. A fagyasztásos beavatkozást követően a hisztológiai kép megváltozását mutatták ki szívben is (Lewis és *mtsai*, 1998, Sakai és *mtsai*, 1999). Érdekeséggé válhat, hogy szívben, a fagyasztás eredményességéhez az adott szívterület hosszabb expozíciójára (1-3 perc) vagy esetleg többszöri beavatkozásra (10-szer 1 perc) volt szükség, valamint az alkalmazott hőmérséklet  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  volt. Összehasonlításképpen, mi a húgyhólyag esetében 30 másodpercig alkalmaztuk a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztást. Ezeknek az eltéréseknek a hátterében a szervek falvastagságának különbsége állhat, hiszen a kamrák fala sokkal vastagabb a húgyhólyag falához viszonyítva, ami azt is jelenti, hogy sokkal hosszabb és intenzívebb fagyasztásra van szükség az izomkárosodás kialakításához.

Az elektromos ingerléssel kiváltott húgyhólyag-kontrakciók paraméterei frekvencia- és területfüggést mutatnak (Somogyi és *mtsai*, 1998, Zoubek és *mtsai*, 1993). A neuronális húgyhólyagkontrakciók egyrészt az idegsejtekből felszabaduló ACh által aktivált postjunctionalis muscarinos  $M_3$  receptorok, másrészt az ATP (nonadrenerg-nonkolinerg, NANC mechanizmus) által ingerelt  $P_{2X}$  receptorok aktiválódása révén jön létre, ráadásul nem zárható ki a két mechanizmus interakciója sem. A két mechanizmus elkülönítése végett két, egymástól különböző téringert alkalmaztunk. Az alacsony frekvenciájú ingerlés (1-5 Hz) leginkább a purinerg folyamatokat aktiválja, minimális ACh felszabadítással (Somogyi és *mtsai*, 1994, Somogyi és *mtsai*, 1998). Ezzel szemben a nagyobb frekvenciával történő (10-40 Hz), és relatív hosszú ingerlés (80 inger, vagy több), leginkább az ACh-t szabadítja fel a prejunctionalis idegvégződésekből, ami a kontrakciók kolinerg komponensének fokozódását okozza (Somogyi és *mtsai*, 1998, Somogyi és *mtsai*, 1999). Ha viszont a nagy frekvenciájú ingerlést csak rövid ideig alkalmazzuk (csak 10 inger), akkor a kontrakció kolinerg komponensét csökkenteni tudjuk, a csökkent prejunctionalis ACh-felszabadulás miatt (Somogyi és *mtsai*, 1994). Mindez azt is jelenti, hogy a postjunctionalis  $M_3$  receptorok

atropinnal történő kezelése nagyobb gátlást hoz létre a nagyobb frekvenciájú, hosszú ingerlés esetén, a rövidebb, vagy alacsonyabb frekvenciájú ingerléshez viszonyítva (Somogyi és *mtsai*, 1999).

A szívben végzett fagyasztásos beavatkozás okozta funkcióváltozások miatt (Lewis és *mtsai*, 1998, Sakai és *mtsai*, 1999) mind a szisztolés, mind a diasztolés nyomás lecsökkent a kiindulási értékekhez viszonyítva. Eredményeink alátámasztják a korábban szíven tett megfigyeléseket, hiszen a fagyasztással kezelt húgyhólyagban, mind az idegingerléssel, mind az  $\alpha$ - $\beta$ -mATP-vel kiváltott húgyhólyagkontrakciók csökkentek az ép húgyhólyagkontrakciókhoz viszonyítva. A fagyasztás csökkentette a húgyhólyag kontrakciós képességét, leginkább a nagyobb frekvenciájú ingerlés esetében (20 és 40 Hz), ahol a kolinerg komponens kifejezettebb. További eredményeinkből kiderült, hogy a muscarinos antagonistá atropin sokkal nagyobb mértékben gátolta a fagyasztással kezelt húgyhólyag kontrakcióját a nem kezelt húgyhólyaghoz viszonyítva, utalva arra, hogy a kontrakció kialakításában a kolinerg mechanizmus relatív aránya nagyobb a fagyasztást követően. Hasonló módosulást, a kolinerg komponens részarányának növekedését lehet kimutatni gerincvelő harántsérülést követően (Somogyi és *mtsai*, 1998, Yokota és Yamaguchi, 1999). Azt lehet mondani, hogy a húgyhólyagműködés változása akár centrális (gerincvelő harántlézió), akár perifériás (fagyasztás) miatt alakul ki, a kontrakció kolinerg részaránya fokozódik, ami egy tónusos, hosszan elhúzódó izom-összehúzódást hoz létre, ami a húgyhólyag hatékonyabb kiürülését idézné elő. A kolinerg folyamatok dominanciájának háttérében vagy a fokozódó ACh-felszabadulás, vagy pedig a postjunctionalis P<sub>2X</sub> receptorok down-regulációja állhat. Mivel az ACh-felszabadulást nem mértük, ezért nincs arra vonatkozó adatunk, hogy a húgyhólyag fagyasztását követően következményes idegsérülés jönne létre.

A kontrakciós görbének egy gyors emelkedése, illetve egy lassabb relaxációs szakasza mutatható ki. A kontrakción, illetve a relaxáción megnyilvánuló hatásokat a kontrakciós görbe első deriváltjának pozitív (kontrakció) és negatív (relaxáció) csúcsaira kifejtett

módosulásokkal vizsgáltuk. A kontrakció maximális rátája szignifikánsan csökkent fagyasztást követően. A kontrakcióban bekövetkező lassulás magyarázható a kolinerg hatások dominanciájával, hiszen ismert, hogy a kontrakció kolinerg komponense lassabban alakul ki a purinerg részhez viszonyítva (Mackenzie és mtsai, 1984, Maggie és mtsai, 1985). Elképzelhető, hogy az elektromos ingerléssel kiváltott kontrakciók amplitúdója közvetlenül meghatározza a kontrakció sebességét (pl. a nagyobb amplitúdójú kontrakció gyorsabban alakul ki). Az a megfigyelés, hogy nem találtunk különbséget az alacsony amplitúdójú kontrakciók (10 ingerrel kiváltott), valamint a nagy amplitúdójú kontrakciók (80 ingerrel létrehozott) kialakulási sebességeiben, arra utal, hogy nincs a kontrakció amplitúdójának számottevő hatása a kontrakció kialakulásának sebességére. A fagyasztást követően lassabban kialakuló kontrakció háttérében ezáltal a simaizom kontraktilis rendszerében bekövetkező sérülés kell, hogy álljon.

A relaxáció sebességében bekövetkező elváltozások vizsgálata sajnos nem ennyire előremutató. Ez esetben a kontrakció amplitúdója és a relaxáció sebessége között pozitív korreláció fedezhető fel, miszerint a nagyobb amplitúdójú kontrakció gyorsabb relaxációt idéz elő. Nehéz közvetlen kapcsolatot találni a relaxáció sebességének megváltozása és a fagyasztás között. A húgyhólyagizomzat relaxációja a húgyhólyag telődését határozza meg. Ezáltal a relaxációs paraméterekben bekövetkező elváltozások a húgyhólyag-compliance fontos indikátorai. A közeljövőben mind *in vivo*, mind *in vitro* kísérletek kivitelezését tervezzük a húgyhólyag-compliance és a relaxációs paraméterek kapcsolatának tisztázása végett.

Amikor  $\alpha$ - $\beta$ -mATP-vel a postjunctionalis purinerg  $P_{2X}$  receptorokat aktiváltuk és deszenzitizáltuk, a húgyhólyagkontrakció szignifikánsan csökkent a fagyasztott húgyhólyagban, ami a simaizomsérülés következményeként értelmezhető. A fagyasztott húgyhólyagban az elektromos ingerlés által létrehozott csökkent kontrakciós válasz háttérében a purinerg folyamatok csökkenése is állhat. Azonban, ha szeparáltuk a purinerg részét az

elektromosan kiváltott kontrakciónak (atropin gátlás után), akkor azt tapasztaltuk, hogy -a fagyasztástól függően, vagy függetlenül- nem változott a  $\alpha$ - $\beta$ -mATP-vel előidézett kontrakció gátlás, ami arra utal, hogy a fagyasztás által előidézett szövetsérülés áll a nem megfelelő kontrakciók hátterében.

Összefoglalva, a fagyasztás a húgyhólyagkontrakciós rendszerben több változást hozott létre, többek között megváltoztatta a kolinerg és purinerg komponensek arányát az ideg ingerléssel kiváltott kontrakciók tekintetében. Az eredményeink és megfigyeléseink alapján úgy tűnik, hogy a beavatkozás egy reprodukálható és állandó elváltozást hoz létre a húgyhólyagban, ezáltal megfelelő kísérleti hátteret biztosít a megváltozott húgyhólyagkontrakciók vizsgálatához, és a megfelelő terápia kifejlesztéséhez.

## 5. Összefoglalás

1. Patkány húgyhólyagból készített izomdarabokon vizsgáltuk az elektromos téringerléssel kiváltott neuronális izomkontrakciókat, valamint a 3H-ACh-felszabadulást. Az  $\alpha_1$  agonista phenylephrin (PE) fokozta az idegingerléssel kiváltott kontrakciók amplitúdóját, serkentette az ACh-felszabadulást, valamint növelte a húgyhólyagdarabok bazális tónusát. Az alacsony koncentrációban alkalmazott specifikus  $\alpha_{1A}$  antagonisták, 5-methyl urapidil (5-MU), REC15/2739 és a WB-4101 kompetitíven gátolta a PE-által fokozott kontrakciókat. A WB-4101 (100 mM) gátolta a PE-által fokozott ACh-felszabadulást. Az irreverzibilis  $\alpha_{1B}$  antagonistá chloroethyl-clonidin (CEC) csökkentette a PE-által fokozott bazális tónus növekedést, azonban hatástalan volt a PE-által megnövelt kontrakciókra és az ACh-felszabadulásra. A CEC növelte az idegingerléssel kiváltott kontrakciók amplitúdóját és a kontrakciós görbe alatti területet. Az atropin szignifikánsan gátolta a CEC ezen hatásait, utalva arra, hogy a CEC fokozza az idegingerléssel kiváltott kolinerg válaszreakciót.  
Mindezek alapján megállapítható, hogy az  $\alpha_{1A}$  és a CEC szenzitív  $\alpha_{1B}$  és/vagy  $\alpha_{1D}$  adrenerg receptorok a patkány húgyhólyag különböző helyein expresszálódnak: a kolinerg idegvégződésen található  $\alpha_{1A}$  adrenerg receptorok mediálják a prejunctionalis facilitációt, ezzel szemben a postjunctionalis  $\alpha_{1B/1D}$  adrenoceptorok meghatározzák a postjunctionalis simaizomkontrakciókat.
2. A húgyhólyag spontán működésének postnatalis változását vizsgáltuk 1-5 hetes patkányokból származó húgyhólyag alsó (bázis) és felső (dóm) izomdarabokon. Az izomaktivitást gyors Fourier-transzformáció (FFT), valamint nemlineáris tesztek felhasználásával vizsgáltuk. A spontán izomkontrakciók nem voltak kimutathatók az 1-5 napos állatok esetén, míg a 6-7 napos állatok 50%-ában már kimutathatókká váltak. A FFT-analízis egy frekvenciacsúcsot mutatott, ami azonban szignifikánsan nagyobb volt a bázis esetében. Egy második csúcs jelent meg a 3-5 hetes állatoknál. Az atropin csökkentette, miközben a TTX nem változtatta meg a spontán kontrakciók amplitúdóját. Ezzel szemben a muscarinos agonista CCh serkentette a spontán izomaktivitást.  
A bemutatott adatok arra utalnak, hogy a korai postnatalis életben regisztrált spontán aktivitás kezdetben lassú. Ennek a folyamatnak a háttérében azok a pacemaker központok koordinált működése áll, amelyek vagy a bázison, vagy a dómon található meg. Az idősebb állatokból származó húgyhólyag darabokon megfigyelt gyorsabb aktivitás esetleg arra utal, hogy több egymástól független pacemaker központ fejlődött ki, amelyek lerontva egymás hatását növelik a húgyhólyag vizelettároló kapacitását.
3. Az altatott patkányok hasfalát megnyitottuk és a húgyhólyag szerózus falán fagyasztásos sérülést hoztunk létre. A beavatkozás után öt nappal a húgyhólyagokat eltávolítottuk, és a kimetszett izomdarabokon megvizsgáltuk az idegingerléssel, valamint az  $\alpha, \beta$  metilén-ATP ( $\alpha, \beta$ -mATP)-vel kiváltott kontrakciókat mind a húgyhólyag-operált, mind a „sham” operált állatok esetén. A fagyasztott húgyhólyag esetében csökkent a kontrakciós erő, ami a nagyobb frekvenciájú ingerlés esetén kifejezettebb volt. Az  $\alpha, \beta$ -mATP-vel kiváltott kontrakciós erő szintén csökkent a fagyasztott húgyhólyagnál. Kiegészítésképpen megemlíthető, hogy az alkalmazott atropin sokkal effektívebben gátolta az idegingerléssel kiváltott húgyhólyag kontrakciókat a fagyasztott húgyhólyag esetében, ami a kolinerg folyamatok dominanciájának növekedésére utal fagyasztást követően.  
Mindezek alapján megállapítható, hogy a fagyasztás egy olyan reprodukálható eljárás, amely megváltoztatja a húgyhólyag kontraktilitását, beleértve a kolinerg regulációt is. Ezáltal a módszer egy megfelelő modell, amellyel tanulmányozhatók a megváltozott kontrakciós paraméterek pl. szövetbeültetést követően.

## **Enikő A Széll M.D.: Regulation of the contractility of the urinary bladder under healthy and diseased condition**

1. Neurally evoked contractions and release of 3H-acetylcholine (ACh) during electrical field stimulation were measured in rat urinary bladder strips. The  $\alpha_1$  agonist phenylephrine (PE) increased the amplitude of neurally evoked contractions, facilitated the release of ACh and increased the baseline tone of the bladder strips. Low concentrations of specific  $\alpha_{1A}$  antagonists, 5-methyl urapidil (5-MU), REC15/2739 and WB-4101 competitively inhibited the facilitation of the neurally-evoked contractions. WB-4101 (100 nM) inhibited the PE-induced facilitation of ACh release. The irreversible  $\alpha_{1B}$  antagonist chloroethyl-clonidine (CEC) inhibited the PE-evoked rise in base line tone, but did not affect the PE-induced facilitation of the neurally evoked contractions nor the facilitation of ACh release. However, CEC increased the area and amplitude of the neurally-evoked contractions. Atropine significantly inhibited the CEC evoked increase in area and amplitude of the electrically evoked contractions indicating that CEC facilitated the cholinergic responses of the electrically stimulated bladder strips.

It is concluded that  $\alpha_{1A}$  and CEC sensitive  $\alpha_{1B}$  and/or  $\alpha_{1D}$  adrenoceptors are expressed in the rat bladder in different locations. On the cholinergic nerve terminals  $\alpha_{1A}$  adrenoceptors mediate prejunctional facilitation, whereas postjunctional  $\alpha_{1B/1D}$  adrenoceptors mediate smooth muscle contraction.

2. Changes in spontaneous activity of the urinary bladder during postnatal development were examined in muscle strips from the base and dome of bladders from 1- to 5-week-old rats. Activity was analyzed using fast Fourier transformation (FFT) and nonlinear tests. Spontaneous activity was not detected in strips from 1- to 5-day-old rats but was observed in 50% of strips from 6- to 7-day-old rats and was prominent in strips from 2-week-old animals. FFT analysis revealed one peak in activity, which was significantly faster in the bladder base than in the dome. A second peak was detected at 3–5 week of age. Atropine but not tetrodotoxin decreased the amplitude of spontaneous contractions, whereas carbachol, a muscarinic agonist, unmasked or stimulated spontaneous activity.

These data suggest that slow rhythmic activity observed previously in neonatal whole bladders is generated by pacemaker cells in the bladder base or dome. The emergence of faster activity in bladders from older animals may reflect the development of multiple pacemaker sites, which would reduce coordination within the bladder wall and improve storage function in the mature bladder.

3. In anesthetized rats, the bladder was exposed and cryoinjury was induced by abruptly freezing the serosal side of the bladder wall with dry ice. Five days later, the rats were euthanized, and strips were prepared from the area adjacent to the injury. Neurally and  $\alpha,\beta$  methylene-ATP ( $\alpha,\beta$ -mATP)-evoked contractions were measured in bladder strips from cryoinjured or intact bladders prepared from sham-operated rats. Cryoinjured bladder strips produced significantly lower contractile forces than intact strips to electrical stimulation at higher (10–40 Hz) frequencies. The contractile response to  $\alpha,\beta$ -mATP was smaller in the cryoinjured preparations indicating that the changes may have also occurred at the postjunctional site. In addition, atropine was more effective at inhibiting the neurally evoked contractions in the cryoinjured bladder strips suggesting that a cholinergic dominance occurs after cryoinjury.

It is concluded that cryoinjury is a viable method of causing a defined, reproducible injury to the urinary bladder resulting in impaired function of both the cholinergic transmission and the smooth muscle. The bladder cryoinjury can be used as a model for studying impaired bladder compliance and detrusor contractility as well as treatments that may improve bladder function such as tissue engineering.

## **6. Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretnék köszönetet mondani a Pittsburghi Egyetem Gyógyszertani Intézet társprofesszorának, Dr. de Groat professzor úrnak, aki lehetőséget biztosított számomra, hogy betekintést nyerhessek a kutatómunka sajtóságos, izgalmas világába, és aki személyisége varázsával, a számomra olyannyira megtisztelő elnyert barátságával örökre meghatározta életemet. Szeretnék továbbá köszönetet mondani szerzőtársaimnak, akik nélkül nem készülhettek volna el az adott kéziratok. Kiemelném Somogyi professzor úr szerepét, aki bevezetett a húgyhólyag farmakológia rejtélyeibe, valamint Chancellor professzor urat, akinek a személyében egy kiváló urológust ismerhettem meg.

Szeretném megköszönni Oláh professzor asszony türelmét, hiszen hosszas távollétem alatt nélkülözni tudta munkámat, továbbá segítségét. Javaslataival, érdemi megjegyzéseivel lehetővé tette az egyetemi doktori értekezésem megírását.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani a családomnak, leginkább gyermekeimnek, akik elviselték, hogy a megnövekedett munka miatt kevesebb figyelmem jutott rájuk. Legvégül ajánlom ezt a Ph.D. értekezést édesanyámnak, akit a kézirat készítése alatt vesztettem el.

## 7. Irodalomjegyzék

1. Arunlakshana O., Schild H.O. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 14: 48-58, 1959.
2. Andersson K.E., Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 84(3): 935-986, 2004.
3. Basar E., Eroglu C. Spectral analysis of spontaneous activity in smooth muscles. In: Physiology of Smooth Muscle, edited by Bulbring E and Shuba MF. New York: Raven, 137-146, 1976.
4. Baskin L.S., Hayward S.W., Sutherland R.A., DiSandro M.S., Thomson A.A., Cunha G.R.. Cellular signaling in the bladder. *Front. Biosci.* 2: d592-595, 1997.
5. Bauer S.B. Special considerations of the overactive bladder in children. *Urology.* 60(5 Suppl 1): 43-48, 2002.
6. Bondarenko V.E. Self-organization process in chaotic neural networks under external periodic force. *Int. J. Bifurcation Chaos* 7: 1887-1895, 1997.
7. Boselli C, Govoni S, Condino A.M., D'Agostino G. Bladder instability: a re-appraisal of classical experimental approaches and development of new therapeutic strategies. *J. Auton. Pharmacol.* 21(5-6): 219-229, 2001.
8. Brading A.F. Spontaneous activity of lower urinary tract smooth muscles: correlation between ion channels and tissue function. *J. Physiol.* 570(Pt 1) :13-22, 2006.
9. Brading A.F., Mostwin J.L. Electrical and mechanical responses of guinea-pig bladder muscle to nerve stimulation. *Br. J. Pharmacol.* 98: 1083-1090, 1989.
10. Bultmann R., Starke K. Chlorethylclonidine: an irreversible agonist at prejunctional  $\alpha_2$  adrenoceptors in rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 108: 336-341, 1993
11. Bylund D.B., Eikenberg D.C., Hieble P.J., Langer S.Z., Lefkowitz R.J., Minneman K.P., Molinoff P.R., Ruffolo R.R. Jr., Trendelenburg U. IV. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharm. Rev.* 46: 121-136, 1994.
12. Cahncellor M., Yoshimura N., In Campbell's Urology 8<sup>th</sup> Edition, Editors: Patrick C. Walsh, MD, Alan B. Retik, MD, E. Darracott Vaughan, Jr., MD, Alan J. Wein, MD, Louis R. Kavoussi, MD, Andrew C. Novick, MD, Alan W. Partin, MD, PhD and Craig A. Peters, MDW B Saunders, 831-886, 2002.
13. Chess-Williams R. Potential therapeutic targets for the treatment of detrusor overactivity. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 8(2): 95-106, 2004.

14. Christ G.J., Liebert M. Proceedings of the Baltimore smooth muscle meeting: identifying research frontiers and priorities for the lower urinary tract. *J. Urol.* 173(4): 1406-1409, 2005.
15. Dacher J.N., Savoye-Collet C. Urinary tract infection and functional bladder sphincter disorders in children. *Eur. Radiol.* 4 Suppl 4:L101-106, 2004.
16. Ekman M., Andersson K.E., Arner A. Developmental regulation of nerve and receptor mediated contractions of mammalian urinary bladder smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 532(1-2): 99-106, 2006.
17. Ekman M., Fagher K., Wede M., Stakeberg K., Arner A. Decreased phosphatase activity, increased Ca<sup>2+</sup> sensitivity, and myosin light chain phosphorylation in urinary bladder smooth muscle of newborn mice. *J. Gen. Physiol.* 125(2): 187-196, 2005.
18. Fry CH, Hussain M, McCarthy C, Ikeda Y, Sui GP, Wu C. Recent advances in detrusor muscle function. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* 215: 20-25, 2004.
19. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol. Sci.* 22(1):32-39, 2001.
20. de Groat W.C. Plasticity of bladder reflex pathways during postnatal development. *Physiol. Behav.* 77(4-5): 689-92, 2002.
21. de Groat W.C., Araki I., Vizzard M.A., Yoshiyama M., Yoshimura N., Sugaya K., Tai C., Roppolo J.R. Developmental and injury induced plasticity in the micturition reflex pathway. *Behav. Brain Res.* 92: 127-140, 1998.
22. de Groat W.C., Douglas J.W., Glass J., Simonds W., Weimer B., Werner P. Changes in somato-vesical reflexes during postnatal development in the kitten. *Brain Res.* 94: 150-154, 1975.
23. de Groat W.C., Yoshiyama M., Ramage A.G., Yamamoto T., Somogyi G.T. Modulation of voiding and storage reflexes by activation of 1 adrenoceptors. *Eur. Urol.* 36(suppl. 1): 68-73, 1999.
24. de Groat WC, Yoshimura N. Pharmacology of the lower urinary tract. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41: 691-721. 2001;
25. Gross G., Hanft G., Rugevics C. 5-methyl-urapidil discriminates between subtypes of the 1-adrenoceptor. *Eur. J. Pharmacol.* 151: 333-335, 1988.
26. Han C., Abel P.W., Minneman K.P. Heterogeneity of 1 receptors revealed by chloroethylclonidine. *Mol. Pharmacol.* 32: 505-510, 1987.
27. Heymen S. Psychological and cognitive variables affecting treatment outcomes for urinary and fecal incontinence. *Gastroenterology.* 126(1 Suppl 1): S146-151, 2004.

28. Hieble J.P., Bylund D.B., Clarke D.E., Einkenburg D.C., Langer S.Z., Lefkowitz R.J., Minneman K.P., Ruffolo, JR., International Union of Pharmacology X. Recommendation for nomenclature of 1 adrenoceptors: Consensus update. *Pharm. Rev.* 47: 267-270, 1995.
29. Hourani S.M.O. Postnatal development of purinoreceptors in rat visceral smooth muscle preparations. *Gen Pharmac.* 32: 3-7, 1999.
30. Iritchev A., Langer M., Zweyer M., Theisen R., Wernig A. Functional improvement of damaged adult mouse muscle by implantation of primary myoblasts. *J. Physiol.* 500: 775-785, 1997.
31. Kageyama S, Fujita K, Suzuki K, Shinbo H, Masuda N, Uchida W. Effect of age on the responses of rat bladder detrusor strips to adenosine triphosphate. *BJU Int.* 85: 899-904, 2000.
32. Kanai A., Golin F., Roppolo J., Birder L., Tai C., Meyers S., de Groat W.C. Age-induced changes in urinary bladder activity detected using voltage- and calcium-sensitive dyes. *FASEB J.* A649, 2003.
33. Kruse M.N., and de Groat W.C. Micturition reflexes in decerebrate and spinalized neonatal rats. *Am. J. Physiol.* 258: R1508-R1511, 1990.
34. Kruse M.N., Noto H, Roppolo J.R., and de Groat W.C. Pontine control of the urinary bladder and external urethral sphincter in the rat. *Brain Res.* 532: 182-190, 1990.
35. Leonardi A., Hieble J.P., Guarneri L., Naselsky D.P., Poggese E., Sironi G., Sulpizio A.C., Testa R Pharmacological characterization of the uroselective alpha-1 antagonist Rec 15/2739 (SB216469): Role of the IL adrenoceptor in tissue selectivity, part1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281: 1272-1283, 1997.
36. Lepor H., Knap-Maloney G., Sunshine H. A dose titration study evaluating terazosin, a selective, once-a-day 1 blocker for the treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia. *J. Urol.* 144: 1393-1398, 1990.
37. Lewis C.W., Atkins B.Z., Hutcheson K.A., Gillen C.T., Reedy M.C., Glower D.D., Taylor D.A. A load independent in vivo model for evaluating therapeutic interventions in injured myocardium. *Am. J. Physiol.* 275: H1834-H1844, 1998.
38. Longhurst P. Developmental aspects of bladder function. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* 215: 11-19, 2004.
39. Mackenzie I., Burnstock G. Neuropeptide action on the guinea-pig urinary bladder; a comparison with the effect of field stimulation and ATP. *Eur. J. Pharmacol.* 105: 85-94, 1984

40. Maggi C.A., Santicioli P., Meli A. Postnatal development of myogenic contractile activity and excitatory innervation of rat urinary bladder. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 247: R972-R978, 1984.
41. Maggi C.A., Santicioli P., Meli A. Pharmacological evidence for existence of two components in twitch response to field stimulation of detrusor strips from the rat urinary bladder. *J. Auton. Pharmacol.* 5: 221-229, 1985.
42. Maggi C.A., Santicioli P., Meli A. Postnatal development of micturition reflex in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 250: R926-R931, 1986.
43. Malloy B.J., Price D.T., Price R.R., Bienstock A.M., Dole M.K., Funk B.L., Rudner X.L., Richardson C.D., Donatucci C.F., Schwinn D.A. 1-adrenergic receptor subtypes in human detrusor. *J. Urol.* 160: 937-943, 1998.
44. Mattiasson A., Andersson K-E., Elbadawi A., Morgan E., Sjögren C. Interaction between adrenergic and cholinergic nerve terminals in the urinary bladder of rabbit, cat and man. *J. Urol.* 137: 1017-1019, 1987.
45. McKenna PH, Herndon CD. Voiding dysfunction associated with incontinence, vesicoureteral reflux and recurrent urinary tract infections. *Curr. Opin. Urol.* 10(6): 599-606, 2000.
46. Mills I.W., Greenland J.E., McMurray G., McCoy R., Ho KM., Noble J.G., Brading A.F. Studies of the pathophysiology of idiopathic detrusor instability: the physiological properties of the detrusor smooth muscle and its pattern of innervation. *J Urol.* 163: 646-651 2000.
47. Minneman K.P., Han C., Abel P.W. Comparison of 1-adrenergic receptor subtypes distinguished by chlorethylclonidine and WB 4101. *Mol. Pharmacol.* 33: 509-514, 1988.
48. Mostwin JL. Pathophysiology: the varieties of bladder overactivity. *Urology.* 60(5 Suppl 1): 22-27. 2002
49. Murry C.E., Wiseman R.W., Schwartz S.M., Hauschka S.D. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J. Clin. Invest.* 98: 2512-2523, 1996.
50. Nijman RJ. Classification and treatment of functional incontinence in children. *BJU Int.* 85(Suppl 3): 37-42; discussion 45-6. 2000.
51. Oh S.J., Lee K.H., Kim S.J., Kim K.W., Kim K.M., Choi H. Active properties of the urinary bladder: in vitro comparative studies between adult and neonatal rats. *BJU Int.* 85: 1126-1133, 2000.
52. Ordway G.A., Kolta M.G., Gerald M.C., Wallace L.J. Age related change in alpha-adrenergic responsiveness of the urinary bladder of the rat is regionally specific. *Neuropharmacol.* 25: 1335-1340, 1986.

53. Pincus S. Approximate entropy as a measure of system complexity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2297-2301, 1991.
54. Rosenblatt J.S., Lehrman D.S. Maternal behavior of the laboratory rat. In: *Maternal Behavior in Mammals*, edited by Rheingold HL. New York: Wiley, 1963.
55. Sakai T., Li R.-K., Weisel R.D., Mickle D.A.G., Kim E.-J., Tomita S., Jia Z.-Q., Yau Z.-Q. Autologous heart cell transplantation improves cardiac function after myocardial injury. *Ann. Thorac. Surg.* 68: 2074-2080, 1999.
56. Schulman SL. Voiding dysfunction in children. *Urol. Clin. North. Am.* 31(3): 481-90, 2004.
57. Shafik A, El-Sibai O, Shafik AA, Shafik I. Identification of interstitial cells of Cajal in human urinary bladder: concept of vesical pacemaker. *Urology.* 64(4): 809-13, 2004.
58. Somogyi G.T., de Groat W.C. Modulation of the release of 3H-norepinephrine from the base and body of the rat urinary bladder by endogenous adrenergic and cholinergic mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255: 204-210, 1990.
59. Somogyi G.T., de Groat W.C. Evidence for inhibitory nicotinic and facilitatory muscarinic receptors on cholinergic nerve terminals of the rat urinary bladder. *J. Auton. Nerv. Syst.* 37: 89-98, 1992.
60. Somogyi G.T., de Groat W.C. Function, signal transduction mechanisms and plasticity of presynaptic muscarinic receptors in the urinary bladder. *Life Sci.* 64: 411-418, 1999.
61. Somogyi G.T., Tanowitz M., de Groat W.C. M-1 muscarinic receptor mediated facilitation of acetylcholine release in the rat urinary bladder. *J. Physiol.* 480: 81-89, 1994.
62. Somogyi G.T., Tanowitz M., de Groat W.C. Prejunctional facilitatory alpha-adrenoceptors in the rat urinary bladder. *Br. J. Pharmacol.* 114: 1710-1716, 1995.
63. Somogyi G.T., Tanowitz M., Zernova G.V., de Groat W.C. M1 muscarinic receptor facilitation of ACh release in rat bladder mediated by protein kinase C. *J. Physiol.* 496: 245-254, 1996.
64. Somogyi GT, Zernova GV, Tanowitz M, de Groat WC. Role of L- and N-type Ca<sup>2+</sup> channels in muscarinic receptor-mediated facilitation of ACh and noradrenaline release in the rat urinary bladder. *J. Physiol.* 499(Pt 3): 645-54, 1997.
65. Somogyi G.T., Zernova G.V., Yoshiyama M., Yamamoto T., de Groat W.C. Frequency dependence of muscarinic facilitation of transmitter release in the urinary bladder strips from neurally intact or chronic spinal cord transected rats. *Br. J. Pharmacol.* 125: 241-246, 1998.
66. Stam C.J., Pijn J.P.M., Pritchard W.S. Reliable detection of nonlinearity in experimental time series with strong periodic components. *Physica D.* 112: 361-380, 1998.

67. Stam C.J., Pritchard W.S. Dynamics underlying rhythmic and non-rhythmic variants of abnormal, walking delta activity. *Int. J. Psychophysiol.* 34: 5-20, 1999.
68. Strait B.J., Dewey T.G. The Shannon information entropy of protein sequences. *Biophys J.* 71: 148-155, 1996.
69. Sugaya K., de Groat W.C. Micturition reflexes in the in vitro neonatal rat brain stem-spinal cord-bladder preparation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 266: R658-R667, 1994.
70. Sugaya K., de Groat W.C. The influence of temperature on activity of the isolated whole bladder preparation of neonatal and adult rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278: R238-R246, 2000.
71. Sugaya K, and de Groat WC. Inhibitory control of the urinary bladder in the neonatal rat in vitro spinal cord-bladder preparation. *Dev. Brain. Res.* 138: 87-95, 2002.
72. Suzuki Y., Moriyama N., Kanada A., Okaya Y., Kawabe K., Aisaka K. The role of IL - adrenoceptor in rat urinary bladder: Comparison between young adult and aged rats. *Life Sci.* 65: 2553-2559, 1999.
73. Swierzewski S.J., Gormley E.A., Belville W.D., Sweetser P.M., Wan J., McGuire E.J. The effect of terazosin on bladder function in the spinal cord injured patients. *J. Urol.* 151: 2951-2954, 1994.
74. Szigeti GP, Somogyi GT, Csernoch L, Szell EA. Age-dependence of the spontaneous activity of the rat urinary bladder. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 26(1): 23-9, 2005.
75. Testa R., Guarneri L., Angelico P., Poggesi E., Taddei C., Sironi G., Colombo D., Naselsky J.P., Hieble J.P., Leonardi A. Pharmacological characterization of the uroselective 1 antagonist Rec 15/2739 (SB216469): Role of the IL adrenoceptor in tissue selectivity, part II. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281: 1284-1293, 1997.
76. Testa R, Guarneri L, Angelico P, Velasco C, Poggesi E, Cilia A, Leonardi A. Effect of different 5-hydroxytryptamine receptor subtype antagonists on the micturition reflex in rats. *BJU Int.* 87(3): 256-64, 2001.
77. Tran LV, Somogyi GT, De Groat WC. Inhibitory effect of neuropeptide Y on adrenergic and cholinergic transmission in rat urinary bladder and urethra. *Am. J. Physiol.* 266(4 Pt 2): R1411-7, 1994.
78. Tsai CH, Yeh HI, Tian TY, Lee YN, Lu CS, Ko YS. Down-regulating effect of nicotine on connexin43 gap junctions in human umbilical vein endothelial cells is attenuated by statins. *Eur. J. Cell Biol.* 82(12): 589-95, 2004.

79. Wang J., Zheng J., Anderson J.L., Toews M.L. A mutation in the hamster  $\alpha$ B-adrenergic receptor that differentiates two steps in the pathway of receptor internalization. *Mol. Pharmacol.* 52: 306-313, 1997.
80. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv. Physiol. Educ.* 27(1-4): 201-6, 2003.
81. Yamamoto T, Ghosh R, De Groat WC, Somogyi GT. Facilitation of transmitter release in the urinary bladders of neonatal and adult rats via  $\alpha$ 1-adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 414(1): 31-5, 2001.
82. Yokota T., Yamaguchi O. Changes in cholinergic and purinergic neurotransmission in pathologic bladder of chronic spinal rabbit. *J. Urol.* 156: 1862–1866, 1996.
83. Yoshida M, Homma Y, Inadome A, Yono M, Seshita H, Miyamoto Y, Murakami S, Kawabe K, Ueda S. Age-related changes in cholinergic and purinergic neurotransmission in human isolated bladder smooth muscles. *Exp Gerontol* 36: 99-109, 2001.
84. Zoubek J., Somogyi G.T., de Groat W.C. A comparison of inhibitory effects of neuropeptide Y on rat urinary bladder, urethra and vas deferens. *Am. J. Physiol.* 265: R537-R543, 1993.

## 8. Közleménylista

### A tézisekhez kapcsolódó *in extenso* dolgozatok (IF az ISI 2005 alapján)

**Szell EA**, Yamamoto T, de Groat WC and Somogyi GT: Smooth muscle and parasympathetic nerve terminals in the rat urinary bladder have different subtypes of  $\alpha 1$  adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* 130: 1685-91, 2000. **IF: 3,410 Cit: 25**

Somogyi GT, Yokoyama T, **Szell EA**, Smith CP, de Groat WC, Huard J, Chancellor MB. Effect of cryoinjury on the contractile parameters of bladder strips: a model of impaired detrusor contractility. *Brain Res. Bull.* 59: 23-8, 2002. **IF: 2,481 Cit: 2**

**Szell EA**, Somogyi GT, de Groat WC, Szigeti GP. Developmental changes in spontaneous smooth muscle activity in the neonatal rat urinary bladder. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285: R809-16, 2003. **IF: 3,802 Cit: 6**

Szigeti GP, Somogyi GT, Csernoch L, **Szell EA**. Age-dependence of the spontaneous activity of the rat urinary bladder. *J. Muscle. Res. Cell M.* 26(1): 23-9, 2005. **IF: 1,338 Cit: 0**

**Összes impakt faktor: 11,031**

**Összes független citáció: 33**

### A tézisekhez kapcsolódó idézhető absztraktok

Somogyi GT, **Szell EA**, Yamamoto T, and de Groat WC: The function of alpha-1 adrenoceptors in the bladders of adult and neonatal rats. *Fundam. Clin. Pharm.* 13/Suppl. 1: 164S, 1999. **IF: 1,717**

Somogyi GT, **Szell EA**, Yamamoto T, and de Groat WC: Smooth muscle and parasympathetic nerve terminals have different subtypes of  $\alpha 1$  adrenoceptors in the rat urinary bladder. *Neurosci. Abstr.* 25: 1170, 1999. **IF: 3,410**

**Szell EA**, Somogyi GT, de Groat WC and Szigeti GP: Developmental changes in smooth muscle spontaneous activity in the neonatal rat urinary bladder. *Biophysical J.* 78: 671Pos, 2000. **IF: 4,507**

Szigeti GP, Somogyi GT, Csernoch L, **Szell EA**. Age-dependence of cholinergic and purinergic receptors in urinary bladder. *J. Muscle. Res. Cell M.* 26(1): 2005. **IF: 1,338**

**Összes Impakt Faktor: 10,972**

#### **A tézisek témakörében tartott előadások**

Somogyi GT, **Szell EA**, Yamamoto T, and de Groat WC: The function of alpha-1 adrenoceptors in the bladders of adult and neonatal rats. *2<sup>nd</sup> European Congress of Pharmacology*, Budapest, 1999.

Somogyi GT, **Szell EA**, Yamamoto T, and de Groat WC: Smooth muscle and parasympathetic nerve terminals have different subtypes of  $\alpha 1$  adrenoceptors in the rat urinary bladder. *29th Annual Meeting, Society for Neuroscience*, Miami Beach, USA, 1999.

**Szell EA**, Somogyi GT, de Groat WC and Szigeti GP: Developmental changes in smooth muscle spontaneous activity in the neonatal rat urinary bladder. *Annual Meeting, Biophysical Society*, New Orleans, USA, 2000.

#### **A tézisekhez nem kapcsolódó, egyéb *in extenso* dolgozatok**

Bánk J., **Széll E.**, Bedő G., Gesztelyi G., Nagy V.: Transcranial Doppler measurements in migraine and tension type headache. *Clin. Neurology* 48, 173-176, 1995. **IF: 0**

#### **A tézisekhez nem kapcsolódó, egyéb idézhető absztraktok**

Jenes A, Ruzsnavszky F, **Szell EA**, Varga A, Somogyi GT, Csernoch L, Szigeti GP. The role of the cholinergic and purinergic interaction in the contraction of the cultured human and rat urinary bladder smooth muscle cells. *J. Muscle. Res. Cell M.* 27(5-7): 2006. **IF: 1,338**

#### **A tézisekhez nem kapcsolódó, egyéb előadások**

**Szell E**, Frank M, Jenes Á, Somogyi GT, Szigeti GP. Patkány húgyhólyag kolinerg és purinerg mechanizmusainak korfüggése. *Magyar Élettani Társaság 69. vándorgyűlése*, Budapest, 2005.

- Szigeti GP, Somogyi GT, Csernoch L, **Szell EA**. Age-dependence of cholinergic and purinergic receptors in urinary bladder. (felkért előadás) *XXXIV. European Muscle Conference*, Hortobágy, 2005.
- Szigeti GP, Jenes Á, Ruzsnavszky F, **Szell E**, Varga A, Csernoch L. A felnőtt patkány hólyag-kontrakcióinak szabályozása, és modellként való felhasználása. *Magyar Élettani Társaság 70. vándorgyűlése*, Szeged, 2006.
- Jenes Á, Ruzsnavszky F, **Szell E**, Varga A, Csernoch L, Szigeti GP. A patkány húgyhólyagműködés szabályozásának életkor- és hólyagterület-függése. *Magyar Élettani Társaság 70. vándorgyűlése*, Szeged, 2006.
- Jenes A, Ruzsnavszky F, **Szell EA**, Varga A, Somogyi GT, Csernoch L, Szigeti GP. The role of the cholinergic and purinergic interaction in the contraction of the cultured human and rat urinary bladder smooth muscle cells. *XXXV. European Muscle Conference*, Heidelberg, Germany, 2006.

## Önéletrajz

**Dr. Széll Enikő Ágnes** vagyok. 1968. október 30-án születtem Debrecenben. Édesapám Dr. Széll Sándor 81 éves, 1988-óta nyugdíjas. Korábban a Debreceni Városi Bíróságon dolgozott büntetőjogi-, majd polgári peres bíróként. Édesanyám -Dr. Széll Sándorné, született Mózes Margit- akit idén 76 éves korában vesztettem el. Nyugdíjba vonulása előtt a Magyar Államvasutaknál dolgozott, mint utókalkulátor. Édesapám Debrecenben él, testvérem nincs. 1992-ben kötöttem házasságot Dr. Szigeti Gyulával. Férjem jelenleg a Debreceni Orvostudományi Egyetem Élettani Intézetének adjunktusa. Két gyermekünk született, 1999-ben Mark és a 2003-ban Liliana.

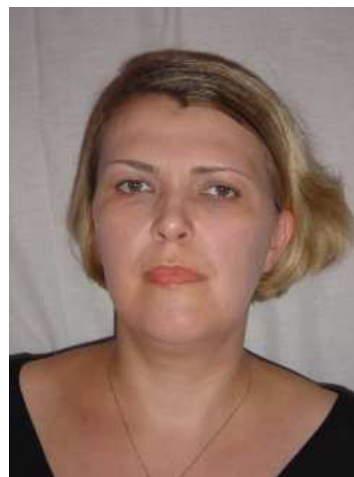
Iskolai tanulmányaimat a Tanítóképző Főiskola Gyakorló Általános Iskolájában, majd a Kossuth Lajos Tudomány Egyetem Gyakorló Gimnáziumában végeztem, mindvégig kitűnő átlageredménnyel. 1987-ben tettem Érettségi vizsgát, jeles eredménnyel, majd felvételt nyertem a Debreceni Orvostudományi Egyetem Általános Orvosi Karára. Az egyetem első két évében tevékeny résztvevője voltam a Felvételre Előkészítő Bizottságnak. Ötödéves koromtól a fejfájások vizsgálata állt érdeklődésem középpontjában. Diplomamunkámat is ezen témakörből írtam. Az Általános Orvosi diplomát 1994-ben szereztem meg *cum laude* minősítéssel.

A diploma megszerzése után a DOTE Házi-orvosi rezidensi képzésében vettem részt, és 1996-ban családorvos rezidensi vizsgát tettem, jeles minősítéssel. Ezután egy hónapig az Országos Mentőszolgálatnál dolgoztam, majd 1997-ben a DOTE Gyermekklinikáján helyezkedtem el. Érdeklődésemet továbbra is a neurológiai betegségek határozták meg. 1998-ban férjem meghívást kapott az Egyesült Államokba, ahol összesen 4 évet (1998-2000 és 2001-2003) töltöttünk. Ott kutató orvosként dolgoztam. Tizenhárom hónapot tölthettem el a Pittsburghi Egyetem Gyógyszertani Intézetében a gerincvelő-sérülés húgyhólyagra kifejtett hatásainak vizsgálatával. Ennek eredményeként több tudományos dolgozatom jelent meg, amelyek a Ph.D. fokozathoz szükséges szakmai tevékenységemet reprezentálják. Gyermekeim születését (Mark 1999 és Liliana 2003) követően GYED, illetve GYES-en voltam. 2006. áprilisában tértem vissza a Gyermekklinikára, ahol jelenleg is dolgozom.

Debrecen, 2006. október 20.

Dr. Széll Enikő Ágnes

## Dr. Széll Enikő Ágnes - tudományos önéletrajz



- *Születési hely és idő:* Debrecen, 1968. október 30.
- *Családi állapot:* férjezett (Dr. Szigeti Gyula Péter egyetemi adjunktus, DE OEC Élettani Intézet), 2 gyermek (Mark Bence 1999, Liliana Vivien 2003)
- *Graduális képzés (egyetemi tanulmányok):*  
Általános orvos (1987-1994), általános orvosdoktori diploma (1994, *Cum Laude*, Debreceni Orvostudományi Egyetem)  
Állam- és jogtudomány (2004-), jelenleg III. éves levelező joghallgató (Debreceni Egyetem, Állam- és Jogtudományi Kar)
- *Postgraduális képzés:*  
Háziorvosi licencevizsga (1996, *Summa Cum Laude*, Debreceni Orvostudományi Egyetem)
- *Nyelvvizsgák:* angol („C”, középfok), orosz (alapfok)
- *Jelenlegi beosztás:* klinikai szakorvosjelölt (DE OEC Gyermekklinika)
- *Tanulmányút:* University of Pittsburgh, Department of Pharmacology, Pittsburgh, PA, USA (1998-1999, Dr. William C de Groat és Dr. George T Somogyi)
- *Oktatói tevékenység:* orvos és forgorvostan hallgatók oktatása magyar nyelven
- *Publikációs aktivitás:*
  - Megjelent, vagy elfogadott *in extenso* dolgozatok száma: **5** (ebből 1 magyar nyelvű, 1 pedig review), kumulatív impakt faktor: **11,031**
  - A dolgozatok összesített citációs indexe: **33**
  - Idézhető absztraktok száma: **5**, kumulatív impakt faktor: **12,310**
  - Konferenciákon tartott előadások száma: **8**
- *Munkahelyek:*
  - 1994-1996: rezidens, DOTE, Családorvosképző Központ
  - 1997- :klinikai orvos, DE OEC, Gyermekklinika
  - 1998-1999: postdoctoral fellow, Department of Pharmacology, University of Pittsburgh, PA, USA
- *Hazai és nemzetközi tudományos kollaborációk:*  
William C de Groat (University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA), George T Somogyi (Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA), Anders Arner (Karolinska Institutet, Stockholm, Svédország), Szigeti Gyula Péter (DE OEC, Élettan) a húgyhólyag működésének vizsgálata.
- *Tudományos érdeklődés:*  
a húgyhólyag működésének vizsgálata, fejfájás