

**ENDOTELIINIRESEPTORIT MUNUAISTEN  
VAJAATOIMINNASSA**

**Maria Sariola**  
**Syventävien opintojen kirjallinen työ**  
**Tampereen yliopisto**  
**Lääketieteen laitos / sisätaudit**  
**tammikuu/2013**

Tampereen yliopisto  
Lääketieteen laitos

Maria Sariola: Endoteliinireseptorit munuaisten vajaatoiminnassa

Kirjallinen työ, 34 s.  
Ohjaaja: Professori Ilkka Pörsti  
Tammikuu 2013

Avainsanat: ETA, ETB, 5/6-nefrektomia, kalsiumaineenvaihdunta, oksonihappo

## Tiivistelmä

Endoteliinit ovat vasoaktiivisia peptidejä, joista tärkein on ET-1. Endoteliineillä on kaksi kohdereseptoria, endoteliini A –reseptori (ETA) ja endoteliini B –reseptori (ETB). ETA välittää ET-1:n vasokonstriktiovaava vaikutusta, kun taas ETB:n aktivaatio saa aikaan vasodilataation. Endoteliinejä tuotetaan lähes jokaisessa elimistön solutyypissä. ET-1 vaikuttaa munuaisissa veden ja natriumin eritykseen pääasiassa ETB-reseptorien kautta. ETA-aktivaatio taas saa aikaan pitkäkestoisen vasokonstriktion. ET-1:n määrä ja biologinen aktiivisuus lisääntyvät munuaissairauksissa, ja tällä on merkitystä munuaisvaurion etenemisessä. Patologisissa tiloissa ET-1 lisää munuaisissa vasokonstriktiota, inflammaatiota, solujakautumista ja fibroosia. Tämä voi kiihdyttää jo olemassa olevaa munuaissairautta. Kahdessa eri pituisessa kokeellisessa munuaisten vajaatoiminnan mallissa pyrimme selvittämään endoteliinireseptorien ilmentymistä munuaisten korteksissa ja medullassa urospuolisilla Sprague-Dawley –rotilla. Yhteensä 75 rotalle aiheutettiin munuaisten vajaatoiminta tekemällä 5/6-nefrektomia, kun taas 39 rotalle suoritettiin valeoperaationa munuaiskapselin poisto. Kaksitoistaviikkoisessa tutkimuksessa rotat jaettiin kolmen viikon kuluttua leikkauksesta neljään ryhmään: 5/6-nefrektomia, 5/6-nefrektomia ja oksonihappolisä, verrokkit ja valeoperaatio + oksonihappolisä. Tutkimusasetelma ryhmissä kesti yhdeksän viikkoa. Kaksikymmentäseitsemänviikkoisessa tutkimuksessa rotat jaettiin 15 viikon kuluttua leikkauksesta viiteen ryhmään: 5/6-nefrektomia, 5/6-nefrektomia + kalsiumlisä, 5/6-nefrektomia + fosfaattilisä, 5/6-nefrektomia + parikalsitolihoido ja verrokkiryhmä. Ryhmien mukainen jako kesti 12 viikkoa. Molemmissa malleissa havaittiin korteksin ETA-määrien lisääntyminen vajaatoimintaryhmillä noin 1,6-kertaiseksi ja medullan ETA-määrien lisääntyminen noin 1,5-kertaiseksi verrattuna verrokkiryhmiin. ETB-reseptorin määrissä ei tapahtunut muutoksia. Molempien reseptorityyppien geeniekspressio lisääntyi vajaatoimintaryhmissä 27-viikkoisessa mallissa, kun taas 12-viikkoisessa mallissa ne olivat vajaatoimintaryhmissä matalammat kuin valeoperaatioryhmissä. Tutkimus osoittaa, että ETA-määrä lisääntyy proteiinitasolla riippumatta vajaatoiminnan asteesta, verenpaineesta, kalsium-, fosfaatti-, D-vitamiini-, PTH- ja uraattitasoista sekä natrium- ja kaliumtasapainosta.

# SISÄLLYS

|   |    |
|---|----|
| 1 JOHDANTO.....   | 1  |
| 1.1. Endoteliinit.....  | 1  |
| 1.1.1 Rakenne ja vaikutukset.....   | 1  |
| 1.1.2 Endoteliini munuaisissa.....  | 2  |
| 1.1.2.1 Endoteliini nestetasapainon ja verenpaineen säätelyssä.....                   | 3  |
| 1.1.2.2 Endoteliini vesitasapainon ja happo-emästatasapainon säätelyssä.....          | 4  |
| 1.2 Krooninen munuaisten vajaatoiminta.....   | 5  |
| 1.2.1 Munuaisten normaalit tehtävät.....  | 5  |
| 1.2.2 Epidemiologia.....  | 5  |
| 1.2.3 Etiologia.....  | 6  |
| 1.2.4 Patofysiologia.....   | 7  |
| 1.2.5 Oireet.....   | 8  |
| 1.2.6 Hoidon periaatteet.....   | 9  |
| 1.2.7 Kardiovaskulaarikomplikaatiot.....  | 9  |
| 1.3 Endoteliinijärjestelmä munuaisten vajaatoiminnassa.....                           | 10 |
| 1.3.1 Patofysiologian mekanismeja.....  | 10 |
| 1.3.2. Endoteliini ja munuaisten vajaatoiminnan kardiovaskulaarikomplikaatiot.....    | 12 |
| 1.4 Kalsium, fosfaatti ja parikalsitoli.....  | 13 |
| 1.5 Oksonihappo.....  | 14 |
| 2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS.....  | 14 |
| 3 AINEISTO JA MENETELMÄT.....   | 15 |
| 3.1 Koe-eläimet.....  | 15 |
| 3.2 ET-reseptorimääritykset ja lähetti-RNA –määritykset.....                          | 16 |
| 3.3 Tilastoanalyysi.....  | 17 |
| 4 TULOKSET.....   | 18 |
| 4.1 Kaksitoistaviikkoinen kokeellinen munuaisten vajaatoiminnan malli.....            | 18 |
| 4.1.1 Rottien ominaisuudet tutkimuksen alussa ja lopussa.....                         | 18 |
| 4.1.2 ETA- ja ETB-reseptorien määrä autoradiografian avulla arvioituna.....           | 19 |
| 4.1.3 ETA- ja ETB-reseptorien lähetti-RNA-määrät.....                                 | 21 |
| 4.2 Kaksikymmentäseitsemänviikkoinen kokeellinen munuaisten vajaatoiminnan malli..... | 22 |
| 4.2.1 Rottien ominaisuudet tutkimuksen alussa ja lopussa.....                         | 22 |
| 4.2.2 ETA- ja ETB-reseptorien määrä autoradiografian avulla arvioituna.....           | 26 |
| 4.2.3 ETA- ja ETB-reseptorien lähetti-RNA-määrät.....                                 | 27 |
| 5 POHDINTA.....   | 29 |
| 6 LÄHTEET.....  | 33 |

# 1 JOHDANTO

## 1.1 Endoteliinit

### 1.1.1 Rakenne ja vaikutukset

Endoteliinit (ET) ovat vasoaktiivisia peptidejä. Endoteliiniperhe koostuu kolmesta 21-aminohappopeptidistä, ET-1, ET-2 ja ET-3. Näistä tärkein on ET-1, jota tuotetaan lähinnä endoteelisoluissa. ET-1-lähetti-RNA (ET-1-mRNA) koodaa prepropeptidiä, joka hajotetaan ensin big-ET-1-propeptidiksi ja sitten lopulliseksi ET-1-peptidiksi. (Kohan 2009) Endoteliinia tuotetaan lähes jokaisessa elimistön solutyypissä ja se pystyy sitoutumaan lähes jokaiseen elimistön solutyypin (Kohan 2010).

ET-1 on elimistön voimakkain ja pitkäaikaisin vasokonstriktori. Sen aiheuttama vasokonstriktio on noin 100 kertaa voimakkaampi kuin noradrenaliinin vaikutus. (Barton 2010) Verisuonten supistustilan lisäksi ET-1 vaikuttaa natriumin ja veden eritykseen, solujen kasvuun ja proliferaation sekä ekstrasellulaarimatriksin tuotantoon (Kohan 2010). Se osallistuu myös immuunijärjestelmän ja tulehdusreaktioiden säätelyyn, glukoosin metaboliaan, maksa- ja rasvasolujen metaboliaan ja verisuonten sileän lihaskudoksen proliferaatioon. Endoteliinillä on merkitystä myös sikiönkehityksessä. (Barton 2010)

Endoteliinin vaikutukset välittyvät kahden G-proteiinivälitteisen reseptorin kautta. Endoteliini A – reseptori (ETA) välittää endoteliinin vasokonstriktioivaa ja kasvua kiihdyttävää vaikutusta. Sen sijaan endoteliini B – reseptorin (ETB) aktivaatio aiheuttaa vasodilataatiota ja kasvun inhibitiota typpioksidin ja prostasykliinin välityksellä. (Barton 2010, Peltonen ym. 2009) ETA-reseptori sitoo herkimmin ET-1:ä ja heikoimmin ET-3:a, kun taas ETB-reseptorin affiniteetti kaikkiin endoteliineihin on samanlainen. On kuvattu myös kolmas endoteliinireseptori, jota ei kuitenkaan ole nisäkkäillä. ETA- ja ETB-reseptorit voivat muodostaa sekä homo- että heterodimeerejä, mikä

vaikuttaa reseptorifunktioiden tutkimista. (Kohan 2009) Endoteliinin vaikutus on lähinnä autokriininen tai parakriininen, joten vaikutukset ovat paikallisia (Kohan 2010).

Verisuonissa ETA esiintyy sileässä lihaskudoksessa, missä se aiheuttaa vasokonstriktion. ETB taas esiintyy endoteelisoluilla, missä sen aktivoituminen aiheuttaa vasodilataation. ETB-reseptoreita on pienemmässä määrin myös verisuonten sileissä lihassoluissa, missä ne saavat ETA-reseptorin tavoin aikaan vasokonstriktion. Erityisen paljon ETB-reseptoreita on keuhkoverenkierrossa. (Neuhofer ja Pittrow 2009) Muiden vaikutustensa lisäksi ETB-reseptorit vastaavat ET-1-puhdistumasta. ETB-reseptorin salpaus aiheuttaa plasman ET-1-pitoisuuksien nousemisen. (Kohan 2010)

### **1.1.2 Endoteliini munuaisissa**

Munuaiskorteksissa ET-1:ä syntetisoidaan pääasiassa intrarenaalisten suonten endoteelissä, intraglomerulaarisella endoteelillä ja vähäisemmässä määrin mesangiaalisoluissa ja podosyyteissä. Tubulusten alueella eniten endoteliiniä tuotetaan sisemmässä medullaarisessa kokoojaputksessa (IMCD). Tällä alueella on 10 kertaa enemmän ET-1-tuotantoa kuin muissa tubuluksen osissa. Medullan ET-1-synteesi on suurempaa kuin missään muussa elimistön kudoksessa. (Neuhofer ja Pittrow 2009) Myös ET-1:n sitoutuminen reseptoreihin on medullan alueella suurempaa kuin korteksissa. Munuaisissa on todettu olevan ainakin kahta endoteliiniä hajottavaa entsyymiä. (Kohan 2009)

ETA-reseptoreita on munuaiskorteksissa runsaasti suurten arterioiden sileissä lihassoluissa, afferenteissa ja efferenteissä arterioissa ja mesangiaalisoluissa. ETB-reseptoreita on glomerulusten ja verisuonten soluissa. Medullan alueella on endoteliinireseptoreita tiheämmin kuin missään muualla kehossa. Näistä 70-90 % on ETB-reseptoreita ja ne sijaitsevat pääasiassa IMCD:ssä. Eläinkokeissa on havaittu, että tubulusten epiteelissä ETB/ETA-reseptorisuhde on 5-10/1. (Neuhofer ja Pittrow 2009)

ET-1 aiheuttaa munuaisissa kortikaalisten ja medullaaristen suonien supistumista, mesangiaalisolujen kontraktiota ja fibroblastien tuottaman ekstrasellulaarimatriksin määrän lisääntymistä. Se säätelee munuaisten verenvirtausta, glomerulussuodatusta, happo-emästasapainoa sekä natriumin ja veden reabsorptiota. (Neuhofer ja Pittrow 2009)

Munuaisten verisuonisto on herkempi ET-1:n vaikutuksille kuin muut elimistön verisuonistot (Neuhofer ja Pittrow 2009). Ihmisillä munuaisissa tapahtuvan vasokonstriktion aiheuttaa nykyisen käsityksen mukaan ETA-reseptori, joka pitää yllä toonista vasokonstriktiota (Barton 2010).

### **1.1.2.1 Endoteliini nestetasapainon ja verenpaineen säätelyssä**

Medullan ET-systeemi toimii neste- ja elektrolyyttitasapainon säätelijänä. Endoteliini toimii vasopressiinin ja angiotensiini II:n vastavaikuttajana. (Kohan 2009, Neuhofer ja Pittrow 2009) ET-1 vaikuttaa natriumin eritykseen ja sitä kautta verenpaineeseen. Endoteliinin vaikutusmekanismeihin kuuluvat munuaisen verenvirtauksen, GFR:n ja natriumin kuljetuksen säätely. Nämä vaikutukset välittyvät pääasiassa ETB-reseptorien kautta kokoojaputkessa. (Kohan 2009)

ETB-reseptoriin sitoutuessaan ET-1 vähentää natriumin reabsorptiota medullaarisessa paksussa nousevassa tiehyessä (MTAL) ja kortikaalisessa kokoojaputkessa (CCD) sekä inhiboi Na/K-ATPaasin aktiivisuutta IMCD:ssa. Se myös vähentää epiteliaalisten natriumkanavien (ENaC) todennäköisyyttä olla auki ja inhiboi Na-K-2Cl-kanavia. (Kohan 2009, Neuhofer ja Pittrow 2009) Endoteliini siis poistaa natriumia virtsaan, jolloin verenpaine laskee. ETB-reseptorit ovat toonisesti aktiivisia MTAL:ssa ja kokoojaputkessa autokriinisen ja parakriinisen stimulaation vuoksi. ETB-puutos aiheuttaa suolasensitiivisen hypertension ja natriumin retention, johon ei voida vaikuttaa ETA-antagonisteilla tai ACE-estäjillä. (Neuhofer ja Pittrow 2009)

Myös ETA-reseptoreilla saattaa olla natriureettista vaikutusta, sillä ETA-ETB -poistogeenisille rotille aiheutuu pahempi hypertensio kuin ETB-poistogeenisille rotille (Kohan 2010). Lisäksi

ETB-poistogeenisille rotilla on ET-1-infuusiollla saatu aikaan natriureesi, joka on kumoutunut ETA-reseptorinsalpaajilla. Toisaalta kokoojaputken ETA -poistogeenisillä rotilla on heikompi vaste vasopresiinille ja lisääntynyt vedenerityskyky, mikä puhuisi ETA-reseptoreiden antidiureettisen vaikutuksen puolesta. Kokemukset eläinkokeista ja ETA-salpaajista ihmisillä viittaavat siihen, että myös ETA-reseptori välittää natriureettisia ja diureettisia vaikutuksia. (Kohan 2009)

Endoteliinin aiheuttama diureesi ja natriureesi ovat erityisen tärkeitä runsaan natriuminsaannin aikana. Runsas natriuminsaanti kiihdyttää medullan ET-1-tuotantoa, jotta natriureesi lisääntyisi. (Neuhofer ja Pittrow 2009)

### **1.1.2.2 Endoteliini vesitasapainon ja happo-emästatapainon säätelyssä**

Endoteliinijärjestelmä vaikuttaa myös veden poistumiseen munuaisista natriumista riippumatta. ET-1 vähentää vasopressiinin stimuloimaa veden läpäisevyyttä kokoojaputkessa ETB-reseptorien välityksellä (Neuhofer ja Pittrow 2009). Kokoojaputken ET-1 – poistogeenisillä rotilla on todettu matalat plasman vasopressiinipitoisuudet sekä väkevöitynyt virtsa ja niiden kyky erittää lisääntynyt juotu nestemäärä on häiriintynyt (Kohan 2009).

ET-1 lisää medullan verenvirtausta dilatoimalla laskevaa vasa rectaa ETB-reseptoriaktivaation kautta. Rotilla ET-1 saa aikaan diureesin ja natriureesin renaalisen verenkierron lisääntyessä. Pieni annos ET-1:ä aiheuttaa efferentissä arteolissa voimakkaamman vasokonstriktion kuin afferentissa arteolissa, mutta samalla se supistaa mesangiaalisoluja, jolloin glomerulusten suodattumisnopeus (GFR) pysyy tasapainossa. Patofysiologisilla pitoisuuksilla ET aiheuttaa kuitenkin natriureesin sijasta natriumin kerääntymisen, koska munuaisten verenvirtaus ja GFR vähenevät. (Neuhofer ja Pittrow 2009)

Metabolinen asidoosi stimuloi munuaisten ET-1-tuotantoa. Endoteliini voi vaikuttaa ETB-reseptorin kautta virtsan happamoitumiseen. (Kohan 2009)

## **1.2 Krooninen munuaisten vajaatoiminta**

### **1.2.1 Munuaisten normaalit tehtävät**

Munuaisilla on monia tehtäviä. Ne vastaavat vesi- ja elektrolyyttitasapainon sekä happo-emästasapainon säätelystä ja aineenvaihdunnan lopputuotteiden poistosta. Munuaisten kautta poistuu myös muita elimistölle haitallisia aineita. Lisäksi munuaisilla on endokriinisiä tehtäviä. Reniinin erityksen kautta munuaiset osallistuvat verenpaineen säätelyyn ja erythropoietiinin (EPO) kautta munuaiset lisäävät luuytimen punasolutuotantoa.

Munuaiset vaikuttavat myös kalsium- ja fosfaattiaineenvaihdunnan säätelyyn. Munuaisissa tapahtuu D-vitamiinin esiasteen muuttuminen aktiiviseksi D-vitamiiniksi, kalsitrioliksi. D-vitamiini lisää kalsiumin ja fosfaatin imeytymistä suolistosta. (Vauhkonen ja Holmström 2006)

### **1.2.2 Epidemiologia**

Suomen munuaistautirekisterin vuosiraportin 2010 mukaan vuosien 2006–2010 keskimääräinen uusien aktiivihoitopotilaiden ilmaantuvuus oli 469 potilasta vuodessa. Vuonna 2010 ilmaantuvuus oli samaa luokkaa kuin vuonna 2009, mutta 15 % pienempi kuin vuonna 2000 ja 16 % pienempi kuin vuonna 2005. Vuoden 2010 uusista aktiivihoitopotilaista yli 65 % oli miehiä. Suurin ero sukupuolten välillä oli havaittavissa yli 75-vuotiaiden ryhmässä, jossa ilmaantuvuus oli naisilla 73 % pienempi kuin miehillä.

Vaikea-asteisen munuaisten vajaatoiminnan eli uremian ilmaantuvuus kasvoi voimakkaasti 1990-luvulla, mutta 2000-luvulla kasvu pysähtyi ja viime vuosien aikana ilmaantuvuus näyttää jopa pienentyneen. Samanlainen suuntaus on havaittu myös monessa muussa maassa. Vuonna 2009 aktiivihoidon ilmaantuvuus oli Suomessa Pohjoismaiden pienin. Aktiivihoitopotilaiden ikävakioitu kuolleisuus on viime vuosina vähentynyt. Kuolemantapausten määrä on kuitenkin pysynyt lähes muuttumattomana, koska väestö ikääntyy ja potilaat ovat vanhempia. Aktiivihoidon vallitsevuus kasvaa jatkuvasti, mutta viime vuosina kasvu on hidastunut. Väestön



ikäntyminen tulee kuitenkin lisäämään aktiivihoitopotilaiden määrää jatkossa. Yli 75-vuotiaiden aktiivihoidon vallitsevuus on kaksinkertaistunut vuosien 2000 ja 2010 välillä. (Munuais- ja maksaliittoliitto ry 2010) Väestön ikärakenteen vanhenemisen lisäksi aktiivihoitopotilaiden määrää nostaa tyyppin 2 diabetekseen liittyvän diabeettisen nefropatian lisääntyminen (Vauhkonen ja Holmström 2006).

Krooninen munuaisten vajaatoiminta on kansantaloudellisesti merkittävä sairaus. Se lisää sairastavuutta ja kuolleisuutta sekä heikentää elämänlaatua. Munuaissairauksien ennaltaehkäisyllä sekä varhaisella diagnostiikalla ja hoidolla voidaan ehkäistä vajaatoiminnan kehittymistä.

### **1.2.3 Etiologia**

Suomen munuaistautirekisterin vuosiraportin 2010 mukaan Suomessa yleisimmät uremiaan johtavat sairaudet ovat tyyppin 1 ja 2 diabetes, glomerulonefriitti sekä aikuistyyppin rakkulamunuaistauti. Näistä yleisin on tyyppin 2 diabetes. 1990-luvulla dialyysihoidoa tarvitsevien tyyppin 2 diabeetikkojen määrä kasvoi voimakkaasti, mutta sittemmin kasvu on pysähtynyt. Tyyppin 1 diabeteksen aiheuttama uremian aktiivihoidon ilmaantuvuus on pienentynyt viime vuosina, vaikka taudin vallitsevuus väestössä kasvaa. Muita krooniseen munuaisten vajaatoimintaan johtavia syitä ovat nefroskleroosi, amyloidoosi, krooninen pyelonefriitti sekä hypertensio, virtsatie-esteet, Alportin oireyhtymä, synnynnäiset sairaudet, tubulointerstiaalinen nefriitti, syöpä ja toksiinit (Vauhkonen ja Holmström 2006). Viime vuosina pyelonefriitin aiheuttama krooninen uremia ja dialyysihoidoa vaativa amyloidoosi ovat vähentyneet.

Kaikki munuaissairaudet voivat hoitamattomina johtaa krooniseen munuaisten vajaatoimintaan. Krooninen munuaisten vajaatoiminta voi edetä silloinkin, kun alkuperäinen munuaistauti on jo parantunut. Lisäksi monet tekijät, kuten hypertensio ja proteinuria, voivat kiihdyttää munuaisten vajaatoiminnan etenemistä, ellei niitä hoideta. (Vauhkonen ja Holmström 2006) Krooninen munuaisten vajaatoiminta voi olla kohonneen verenpaineen syy tai seuraus. Muita

munuaissairautta kiihdyttäviä tekijöitä ovat diabetes, hyperinsulinemia, korkea kolesterolipitoisuus ja ikääntyminen. (Johnson 2003)

#### 1.2.4 Patofysiologia

Munuaisten vajaatoiminnassa glomerulussuodatus vähenee. National Kidney Foundationin hoitosuosituksen Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) määritelmän mukaan krooninen munuaisten vajaatoiminta on yli kolme kuukautta kestänyt munuaisvaurio, johon liittyy munuaisten rakenteen tai toiminnan häiriö, tai glomerulusten suodattumisnopeuden (Glomerular Filtration Rate, GFR) lasku alle tason 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>. Munuaistaudit voidaan luokitella GFR:n perusteella viiteen eri luokkaan. Ensimmäisessä vaiheessa potilaalla on munuaisvaurio, mutta GFR on joko normaali tai lisääntynyt, eli potilaalla ei ole munuaisten vajaatoimintaa. Toisessa vaiheessa munuaisvaurioon liittyy lievästi alentunut GFR (60-89 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>). Kolmannessa vaiheessa GFR on laskenut tasolle 30-59 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> ja potilaalla on kohtalainen munuaisten vajaatoiminta. Neljännessä vaiheessa potilaalla on vaikea-asteinen munuaisten vajaatoiminta (GFR 15-29 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>). Viidennessä vaiheessa GFR on laskenut alle tason 15 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, munuaiset eivät enää kykene suoriutumaan tehtävistään ja potilas tarvitsee aktiivihoitoa, dialyysia ja munuaissiirännäistä. (National Kidney 2002)

Nefronien määrän vähentyessä elimistön aineenvaihduntatuotteiden ja toksiinien poisto elimistöstä hidastuu. Kreatiniinin ja urean erittyminen virtsaan ei ole aktiivisesti säädeltyä, joten niiden pitoisuus veressä alkaa suurentua nopeasti nefronikadon edetessä. Uremia eli virtsamyrkytys tarkoittaa tilaa, jossa munuaisten kyky poistaa kuona-aineita on vaikea-asteisesti heikentynyt ja verenkiertoon kertyy ureaa. Urean määrä veressä ilmentää toksisten aineiden määrää.

Natriumin, kaliumin, vetyionien ja veden eritysvirtsaan on tarkoin säädeltyä, joten niiden pitoisuudet säilyvät aluksi normaaleina. Kun säätely ei enää riitä pitämään elektrolyyttejä tasapainossa, elimistöön alkaa kerääntyä vettä ja veren kalium- ja vetyionipitoisuudet suurenevat. Natriumtaso pysyy usein lähes normaalina. Kun munuaiset eivät enää pysty poistamaan ylimääräisiä vetyioneja, elimistöön syntyy metaboliininen asidoosi.

Nefronikadon edetessä fosfaatin erityis virtsaan alkaa vähentyä ja veren fosfaattitaso nousee. Samalla munuaisten toiminnan heiketessä aktiivisen D-vitamiinin, kalsitriolin, muodostuminen vähenee. Tällöin kalsiumin imeytyminen suolistosta vähenee ja seerumin kalsiumpitoisuus pienenee. (Vauhkonen ja Holmström 2006) Lisäkilpirauhanen pyrkii korjaamaan tilannetta lisäämällä lisäkilpirauhashormonin (PTH) eritystä, jolloin kehittyy sekundaarinen hyperparatyreoosi. (Saliba ym. 2009) Normaalitylanteessa aktiivinen D-vitamiini inhiboi PTH:n synteesiä ja sekreetiota sekä lisäkilpirauhasen liikakasvua, mutta tämä vaikutus vähenee munuaisten vajaatoiminnan myötä. (Vauhkonen ja Holmström 2006)

### **1.2.5 Oireet**

Useimmiten kroonisen vajaatoiminnan kehittyminen on pitkäaikainen prosessi, joten elimistö ehtii sopeutua muutoksiin ja oireita alkaa esiintyä vasta sitten, kun suuri osa nefroneista on tuhoutunut lopullisesti. Erytropoietiinin tuotanto alkaa heikentyä jo lievässä munuaisten vajaatoiminnassa, jolloin luuytimen punasolutuotanto vähenee ja hemoglobiinitaso voi laskea. Vaikeassa vajaatoiminnassa ilmenee anemiaa.

Nefronikadon myötä elimistöön kerääntyy kuona-aineita ja seerumin fosfaattipitoisuudet suurenevat, mikä voi aiheuttaa ihon kutinaa, haurastumista ja kuivumista. Kuona-aineiden kertyminen elimistöön aiheuttaa väsymystä, iho-oireita, pahoinvointia, oksentelua, vatsaoireita, ripulia ja verenvuotoja. Myös tajunnanhäiriöitä voi esiintyä.

Vajaatoiminnan edetessä uremiaan virtsamäärät alkavat vähentyä. Tämä johtaa nesteen kertymiseen ja turvotusten syntyyn. Liiallinen nestemäärä kuormittaa sydäntä ja voi johtaa hengenahdistukseen ja lopulta keuhkoödeemaan. Myös proteiinien karkaaminen virtsaan aiheuttaa nesteen siirtymiseen verenkierrosta kudoksiin.

Uremia on katabolinen tila. Tällöin proteiineja hajoaa enemmän kuin niitä syntyy, joten ajan myötä lihasmassa vähenee ja potilas laihtuu. Uremiaan liittyvä asidoosi kiihdyttää kataboliaa. (Vauhkonen ja Holmström 2006)

### **1.2.6 Hoidon periaatteet**

Olellisena osana konservatiivista hoitoa on verenpaineen laskeminen ja riskitekijöiden, kuten kolesterolin, tupakan ja alkoholin, välttäminen. Anemiaa, asidoosia ja D-vitamiinin puutosta sekä natrium- ja vesitasapainon häiriöitä hoidetaan sekä pyritään estämään kaliumin, PTH:n ja fosfaatin nousu ja kalsiumarvojen laskeminen. Munuaisten lisävaurioita pyritään ehkäisemään välttämällä mm. tulehduskipulääkkeitä ja varjoaineiden käyttöä.

Kroonisen munuaisten vajaatoiminnan aktiivihoitomuotoja ovat hemo- ja peritoneaalidialyysi ja munuaisensiirto. (Vauhkonen ja Holmström 2006)

### **1.2.7 Kardiovaskulaarikomplikaatiot**

Krooniseen munuaisten vajaatoimintaan liittyy lisääntynyt kuolleisuus kardiovaskulaarisairauksiin (Stenvinkel 2010). Kardiovaskulaarisairaudet ovat tärkein munuaispotilaiden kuolleisuutta lisäävä tekijä (Barton 2010). Puolet dialyysipotilaista kuolee ennenaikaisesti kardiovaskulaarisen sairauden takia riippumatta yleisistä riskitekijöistä, kuten hypertensiosta ja diabeteksestä (Stenvinkel 2010).

Munuaispotilailla kardiovaskulaarisairauksille altistavat anemia, asidoosi, nestekertymä, hypertensio ja toksiinien kertyminen (Luke 1998, Rostand ja Druke 1999). Lisäksi krooninen munuaisten vajaatoiminta pahentaa jo olemassa olevia kardiovaskulaarisairauksien riskitekijöitä kuten dyslipidemiaa ja hypertensiota.

Verisuonten kalsifikaatio on yleinen munuaisten vajaatoiminnan komplikaatio (Mizobuchi ym. 2009). Munuaisten vajaatoimintaa sairastavilla potilailla on 2-5 kertaa enemmän

sepelvaltimoiden kalsifikaatiota kuin terveillä saman ikäisillä (Braun ym. 1996). Kalsium-fosfaattitasapainon häiriöt, erityisesti hyperfosfatemia, vaikuttavat munuaisfunktion alenemiseen, ektooppiseen kalsifikaatioon, kardiovaskulaarikomplikaatioihin ja kuolleisuuden lisääntymiseen (Luke 1998, Rostand ja Drueke 1999). Verisuonen seinämän sileälihassolut voivat erilaistua kondrosyyttien tai osteoblastien kaltaisiksi ja mineralisoida kollageenia ja muita proteiineja. Kalsifikaation riskiä lisäävät munuaisten ekskreetion heikentyminen, poikkeavasta luometaboliasta johtuvat kohonneet kalsium- ja fosforipitoisuudet sekä kalsifikaation inhibiittoreiden vähentyminen. (Moe ja Chen 2004) Verisuonten kalsifikaation eston on todettu olevan aktiivinen prosessi, ja tämä suojamekanismi on munuaisten vajaatoiminnassa häiriintynyt (Jono ym. 2006, Mizobuchi ym. 2009, Nakagami ym. 2011).

## **1.3 Endoteliinijärjestelmä munuaisten vajaatoiminnassa**

### **1.3.1 Patofysiologian mekanismeja**

Endoteliinillä on tärkeä rooli munuaistaudin etenemisessä. Patologisissa tilanteissa munuaisten endoteliinin määrä ja biologinen aktiivisuus lisääntyvät. Tämä tapahtuu myös diabeteksen ja kohonneen verenpaineen yhteydessä. (Barton 2010) ET-1 lisää munuaisissa vasokonstriktiota, inflammaatiota, solujakautumista ja fibroosia, mikä puolestaan lisää hypertensiota, ateroskleroosia ja munuaisten vajaatoimintaa. Näin ET-1 aiheuttaa patologisia muutoksia glomeruluksissa ja tubulussoluissa. (Kohan 2010)

ET:n on todettu lisäävän nefriinikatoa podosyyteistä ja vaurioittavan niiden aktiinisäikeistä muodostuvaa tukirankaa, jolloin välihilan toiminta häiriintyy (Barton 2010, Kohan 2010). Se saa aikaan myös glomerulusten tyvikalvon hypertrofiaa podosyyttivaurion kautta (Barton 2008). ETA-reseptorien kautta välittyvä vasokonstriktio efferenteissä arterioleissa edistää glomerulaarista kapillaarien hypertensiota ja näin lisää proteinuriaa. Glomerulukseen tuleva proteiini yhä lisää ET-1:n vapautumista podosyyteistä, mikä aiheuttaa noidankehän kautta uusia vaurioita. (Neuhofer ja Pittrow 2009)

Endoteliini lisää glomeruluksissa kollegeenin ja fibronektiinin tuotantoa ja aiheuttaa glomeruloskleroosia ja proteinuriaa. Endoteliinijärjestelmä lisää mesangiaalisolujen proliferaatiota ja myös aktivoi fibrogeenisia aineenvaihduntareittejä mesangiaalisoluissa. (Barton 2008) Mesangiaalisolut näyttävät vapauttavan suurimman osan ET-1:stä patologisissa tilanteissa ja monet kroonisiin kardiovaskulaarisiin ja renaalisiin häiriöihin liittyvät tekijät voivat lisätä ET-1-tuotantoa niissä. Mesangiaalisolujen suuri ET-1-tuotanto sekä auto- ja parakriininen toiminta on merkityksellistä diabetekseen, hypertensioon ja glomerulonefriittiin liittyvän glomerulaarisen vaurion patogeneesissä. ET-1 voi autokriinisesti edistää mesangiaalisolujen proliferaatiota ja ekstrasellulaarimatriksin tuotantoa ETA-reseptorin kautta. (Neuhofer ja Pittrow 2009)

Proksimaalisessa tubuluksessa suuren suodattuneen proteiinimäärän reabsorptio saa aikaan ET-1:n, sytokiinien ja kemokiinien vapautumisen. Tästä aiheutuu tubulointerstiaalinen inflammaatio ja fibroosi, joka johtaa arpeutumiseen. Munuaisten vajaatoimintaa sairastavilla potilailla on havaittu proksimaalisten tubulusten ET-1-synteesin stimuloituminen biopsioissa, joissa endoteliinimäärän todettiin korreloivan proteinurian määrään. (Neuhofer ja Pittrow 2009)

Endoteliini lisää angiotensiini II:n muodostusta lisäämällä ACE:n aktiivisuutta (Barton 2008). ET-1 vaikuttaa ETA:n kautta ja yhdessä angiotensiinin kanssa lisäten vaskulaarisolujen hypertrofiaa ja hyperplasiaa, tulehdussolujen infiltraatiota ja fibroosia (Kohan 2010). Lisäksi endoteliini lisää happiradikaalien muodostusta (Barton 2008).

Munuaisten ET-1-synteesiä lisäävät sytokiinit, kasvutekijät, kemokiinit, vasoaktiiviset välittäjäaineet, hyperglykemia, suodattuneet proteiinit, hormonit, happiradikaalit ja kolesteroli. Lisäksi metabolisen asidoosin on todettu lisäävän ET-1-tuotantoa. Näiden tekijöiden vaikutuksesta ET-1-tasot voivat kohota ja vaikuttaa munuaissairauden etenemiseen. (Kohan 2010)

ET-1-tuotanto on lisääntynyt kroonisessa munuaisten vajaatoiminnassa niin ihmisillä kuin koe-eläimilläkin (Kohan 2010). Munuaisten vajaatoiminnassa voidaan todeta huomattavasti

kohonneet plasman ET-1-tasot ja samalla ET-1:n erityis virtsaan on lisääntynyt moninkertaisesti terveisiin kontrolleihin verrattuna. Virtsan ET-1:n on todettu olevan lähes kokonaan intrarenaalista ja sen määrä korreloi proteinurian asteeseen. Kokeellisissa rottamalleissa on havaittu, että toimivien nefronien vähentyessä ET-1-ekspressio lisääntyy ja korreloi proteinurian ja poistetun munuais kudoksen määrään. (Neuhofer ja Pittrow 2009)

Hypertensiivisillä potilailla plasman ET-1-tasot korreloivat munuaisten toimintahäiriöön. Samoin ne korreloivat seerumin kreatiniiniin ja albuminurian asteeseen diabeettista nefropatiaa sairastavilla potilailla. (Kohan 2010)

Endoteliini reseptoriantagonistien on todettu vähentävän munuaisvauriota ja taudin etenemistä. Prekliinisissä tutkimuksissa ETA-reseptorisalpaajat ovat olleet epäselektiivisiä reseptorisalpaajia tehokkaampia. Endoteliini antagonistit myös vähentävät munuaisten vajaatoimintaan liittyvää proteinuriaa. Endoteliini reseptorisalpauksella on saatu aikaan verenpaineen, paastoverensokerin, glykosyloituneen hemoglobiinin, triglyseridien, lipoproteiini A:n ja virtsahapon tasojen laskua. Toisaalta ne aiheuttavat nesteiden kertymistä, voivat aiheuttaa spermatogeneesin häiriöitä ja ovat teratogeenisiä. (Kohan 2010)

### **1.3.2 Endoteliini ja munuaisten vajaatoiminnan kardiovaskulaarikomplikaatiot**

Endoteliinin tuotto kudoksissa lisääntyy kardiovaskulaarisairauksien yhteydessä ja tällä on merkitystä verenkierron häiriöiden syntyyn kardiovaskulaarisairauksissa (Bohm ja Pernow 2007). Endoteliinin määrän kudoksissa on havaittu lisääntyvän aorttaläpän ja verisuonten kalsifikaation yhteydessä (Peltonen ym. 2009, Wu ym. 2003). Lisäksi ET-1:n määrän on todettu lisääntyneen rottien arterioissa nefrektomian jälkeen (Lariviere ja Lebel 2003) ja sen uskotaan vaikuttavan verisuonten seinämän paksuuntumiseen munuaisten vajaatoiminnassa (Amann ym. 2003).

Endoteliini vaikuttaa verisuonten muovautumiseen. ETA-aktivaatio ja yhteisvaikutus angiotensiini II:n kanssa lisäävät fibroosia, tulehdussolujen infiltraatiota sekä vaskulaaristen

solujen hypertrofiaa ja hyperplasiaa. Koe-eläimillä ET-reseptorisalpaus vähentää ateroskleroosia. (Dhaun ym. 2008, Epstein ja Anderson 2009)

## **1.4 Kalsium, fosfaatti ja parikalsitoli**

Kalsiumsuoloja käytetään fosfaatinsitojina munuaisten vajaatoiminnassa. Kokeellisissa munuaisten vajaatoiminnan malleissa korkea kalsiumin saanti on johtanut lisääntyneeseen vasorelaksaatioon ja natriureesiin. Sen on todettu myös laskevan verenpainetta ja lisäävän Na-eksreetiota rotilla, joilla on kohonnut verenpaine. Sitomalla fosfaattia kalsiumsuolat samalla vähentävät PTH:n määrää veressä ja hillitsevät sekundaarista hyperparatyreoosia. (Pörsti ym. 2004)

Munuaisten vajaatoiminnassa veren fosfaattipitoisuus lisääntyy, kun fosfaatin erittyminen virtsaan vähenee. Hyperfosfatemian on todettu olevan yhteydessä munuaisten vajaatoimintaan liittyvään lisääntyneeseen kardiovaskulaarikuolleisuuteen. (Luke 1998, Rostand ja Drueke 1999) FGF-23 on hormoni, joka lisää fosforin eritystä virtsaan ja vähentää fosforin ja kalsiumin imeytymistä suolistosta. Sen on ajateltu säätelevän fosfaattitasapainoa pidemmällä aikavälillä, sillä se reagoi fosforitason muutoksiin hitaammin kuin PTH. (Fukagawa ym. 2005)

Parikalsitoli on kalsitriolin synteettinen, biologisesti aktiivinen D-vitamiinireseptorin aktivaattori. Parikalsitoli aiheuttaa D-vitamiinireseptorin määrän lisääntymisen selektiivisesti lisäkilpirauhasessa ilman, että reseptorin pitoisuus suolistossa nousee. Se aiheuttaa myös kalsiumreseptorien lisääntymisen etenkin lisäkilpirauhasessa. Näin parikalsitoli pienentää lisäkilpirauhashormonin (PTH) pitoisuuksia, estää lisäkilpirauhasen liikakasvua ja vähentää PTH:n synteesiä ja erittymistä. Vaikutus luun resorptioon on vähäisempi. Parikalsitoli vaikuttaa hyvin vähän seerumin kalsium- ja fosforipitoisuuksiin.

Parikalsitolia käytetään sekundaarisen hyperparatyeroosin ehkäisyyn ja hoitoon potilaille, jotka saavat hemodialyysihoitoa kroonisen munuaisten vajaatoiminnan takia. Yliannostus voi aiheuttaa hyperkalsemian. (Jokihaara ym. 2006)



## **1.5 Oksonihappo**

Virtsahappo eli uraatti syntyy elimistössä puriinien kataboliasta. Se poistetaan elimistöstä munuaisissa. Munuaisten vajaatoimintaan liittyy kohonnut seerumin virtsahappopitoisuus eli hyperurikemia.

Useimmilla nisäkkäillä urikaasi hajottaa virtsahapon allantoiiniksi. Ihmisellä urikaasigeeni ei kuitenkaan toimi. Oksonihappo on urikaasin estäjä, jolla voidaan kokeellisissa munuaisten vajaatoiminnan malleissa esim. rotilla aiheuttaa hyperurikemia. Se saa aikaan uraattitason nousun, mutta ei vaurioita munuaisia.

In vitro – tutkimuksissa on todettu, että virtsahappo stimuloi ET-1-geeniekspressiota sileissä lihassoluissa ja kardiomyosyyteissä (Kohan 2010).

## **2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS**

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, miten munuaisten ETA- ja ETB-reseptorien ilmentyminen muuttuu kokeellisessa munuaisten vajaatoiminnan mallissa 5/6-nefrektomiarotilla. Samoin pyrittiin selvittämään, muuttuuko ETA/ETB-suhde munuaisten vajaatoiminnassa ja mitkä tekijät vaikuttavat reseptorimääriin. Proteiinitason lisäksi selvitettiin kokeellisen munuaisten vajaatoiminnan vaikutusta geeniekspressionon tutkimalla ETA- ja ETB-reseptorien mRNA-määriä.

## 3 AINEISTO JA MENETELMÄT

### 3.1 Koe-eläimet

Aineisto on peräisin kahdesta kokeellisesta tutkimuksesta. Molemmissa tutkimuksissa käytettiin urospuolisia Sprague-Dawley -rotia. Kahdeksan viikon ikäisille rotille tehtiin joko 5/6-nefrektomia (oikean munuaisen poisto ja vasemman munuaisen ylä- ja alapoolien poisto) tai valeoperaatio (sham), jossa munuiskapseli poistettiin. Anestesiassa käytettiin ketamiinia (75 mg/kg) ja diatsepaamia (2,5 mg/kg). Leikkauksen jälkeen rotille annettiin antibiootteina metronidatsolia (60 mg/kg) ja kefuroksiimia (225 mg/kg) sekä kivunlievityksenä buprenorfiinia (0,2 mg/kg 3 kertaa päivässä 3 päivän ajan) (Kööbi ym. 2003). Molemmissa tutkimuksissa rotilta mitattiin vuorokausivirtsan määrä sekä veden- ja ravinnonkulutus metaboliahäkissä ennen lopullisia näytteenottoja. Systolinen verenpaine mitattiin häntämansetilla.

Kahdentoista viikon kestoisessa tutkimuksessa rotat (n=48) jaettiin systolisen verenpaineen ja painon suhteen tasaisesti neljään ryhmään (jokaisessa ryhmässä n=12) kolmen viikon kuluttua operaatiosta: verrokit (Sham), verrokit + oksonihappolisä (Sham+Oxo), 5/6-nefrektomia (NX) sekä 5/6-nefrektomia ja oksonihappolisä (NX+Oxo). Oksonihappolisää saavien rottien ravinnon oksonihappopitoisuus oli 2,0 %. Ryhmien mukaiset dieetit kestivät yhdeksän viikon ajan, minkä jälkeen rotat punnittiin, nukutettiin ja niiltä kerättiin veri- ja kudospäätteet. Verinäytteitä ei saatu yhdeltä NX- ja kolmelta Sham-ryhmän rotalta anestesian aiheuttaman sydämenpysähdyksen takia. Endoteliinireseptorimääriä ei saatu yhdeltä NX+Oxo-ryhmän rotalta ja mRNA-määrittämiä ei saatu yhdeltä NX-ryhmän rotalta.

Toisessa, 27-viikkoisessa tutkimuksessa muutettiin rottien kalsiumaineenvaihduntaa. Rotat (n=66) jaettiin viiteen ryhmään 15 viikkoa leikkauksen jälkeen: verrokit (Sham, n=15), 5/6-nefrektomia (NX, n=13), 5/6-nefrektomia + kalsiumlisä (NX+Ca, n=12), 5/6-nefrektomia + fosfaattilisä (NX+Pi, n=13) ja 5/6-nefrektomia + parikalsitolihoido (NX+Pari, n=13). Jako

suoritettiin siten, että ryhmien väliset systoliset verenpaineet, painot ja plasman kreatiniinitasot olivat samankaltaiset. Sham-, NX- ja NX+Pari-ryhmien ravinto sisälsi 0,3 % Ca ja 0,5 % Pi, NX+Ca-ryhmän ravinto 3,0 % Ca, 0,5 % Pi, ja NX+Pi-ryhmän ravinto 0,3 % Ca, 1,5 % Pi. NX+Pari-ryhmälle annettiin lisäksi intraperitoneaalisia parikalsitoli-injektioita 100 ng/rotta kolmesti viikossa. Tutkimusasetelma ryhmissä kesti 12 viikkoa, minkä jälkeen rotat punnittiin ja nukutettiin. Endoteliinireseptorimäärityksiin otettiin mukaan ryhmittäin edellä olevan järjestyksen mukaisesti 5, 7, 7, 7 ja 7 rottaa ja mRNA-määrityksiin ryhmittäin 14, 7, 10, 7, ja 9 rottaa.

Molemmissa malleissa veri- ja kudospäytteen oton aikana käytettiin anestesiaa intraperitoneaalista uretaania (1,3 g/kg). Verinäytteet otettiin kanyloiduista kaulavaltimoista. Antikoagulanttina toimi joko hepariini tai EDTA. Munuaiset poistettiin, punnittiin ja leikattiin puoliksi. Toinen puolikas fiksoitiin 4 % -formaldehydiin vuorokaudeksi ja upotettiin parafiiniin. Toisen munuaisen puolikas jäädytettiin -40 °C isopentaanissa ja säilytettiin -80 °C.

Eläinkoelautakunta on myöntänyt asianmukaiset luvat aineiston keräämiseen.

### **3.2 ET-reseptorimääritykset ja lähetti-RNA -määritykset**

ET-reseptoreiden määrityksiin käytettiin autoradiografiaa. ET-reseptoreihin sitoutuvana merkkiaineena käytettiin radioaktiivisella jodilla [<sup>125</sup>I] leimattua humaani-ET-1:a. Kryostaatiolla leikattiin 20 µm paksuisia leikkeitä jäädytetystä munuaiskudoksesta ja nämä kiinnitettiin Super Frost Plus -laseille (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany), kuivattiin desikkaattorissa 4 °C:ssa yön yli ja varastoitiin -80 °C:ssa. Autoradiografia suoritettiin aiemmin kuvatus menetelmän mukaisesti (Dean ym. 1996). Lähetti-RNA -määritykset tehtiin käyttämällä RT-PCR:a.

### 3.3 Tilastoanalyysi

Tilastollisessa käsittelyssä käytettiin ohjelmaa SPSS17. Menetelminä käytettiin yksisuuntaista varianssianalyysia ja ryhmien varianssien ollessa epätasaisesti jakautuneita non-parametristä Kruskal-Wallis-testiä. Post-hoc-analyysit suoritettiin käyttäen Tukeyn testiä ja Mann-Whitney U-testiä. Tulokset ilmoitettiin keskiarvoina ja hajontalukuina käytettiin luottamusvälejä (CI), keskihajontaa, (SD) ja keskiarvon keskivirhettä (SE). Tulosten numeerisen vaihtelun ollessa hyvin suurta suoritettiin log-10-transformaatio ennen tilastollista analyysia (FGF-23 pitoisuudet). Tuloksissa luottamusväli on 95 % eli eroja pidettiin merkitsevinä, kun  $p < 0,05$ . Tuloksissa on käytetty eksaktia merkitsevyyttä.

## 4 TULOKSET

### 4.1 Kaksitoistaviikkoinen kokeellinen munuaisten vajaatoiminnan malli

#### 4.1.1 Rottien ominaisuudet tutkimuksen alussa ja lopussa

Tutkimusasetelman alkaessa rotat painoivat keskimäärin 336 g eivätkä ryhmät eronneet merkitsevästi rottien painon tai verenpaineen suhteen (taulukko 1). Tutkimusasetelman lopussa NX-ryhmän rottien paino ei ollut muuttunut merkitsevästi verrattuna Sham-ryhmän rottiin, mutta NX+Oxo-ryhmän rotat painoivat vähemmän kuin NX-ryhmän rotat. Viimeisen viikon verenpainemittauksissa NX+Oxo-ryhmän verenpaineet olivat merkitsevästi korkeammat kuin Sham+Oxo-ryhmän rottien verenpaineet. Muiden ryhmien välillä ei havaittu merkitsevää eroa.

Sekä urea- että kreatiniinipitoisuudet olivat merkitsevästi korkeammat 5/6-nefrektomiaryhmillä kuin Sham-ryhmillä. Lisäksi Sham-Oxo-ryhmän rotilla ureapitoisuus oli merkitsevästi korkeampi kuin Sham-ryhmän rotilla. Uraattipitoisuudet olivat merkitsevästi suuremmat oksonihapporyhmillä kuin Sham- ja NX-ryhmillä. Veren pH ei eronnut ryhmittäin.

Veren natrium- ja kalsiumpitoisuudet eivät eronneet ryhmittäin. Sen sijaan Sham+Oxo-ryhmän veren kaliumarvot olivat merkitsevästi matalammat kuin muissa ryhmissä.

Vajaatoiminta lisäsi vuorokausivirtsamääriä, mutta oksonihappolisällä ei ollut vaikutusta virtsamääriin. Vuorokausivirtsan natrium- ja kaliummäärät eivät muuttuneet 5/6-nefrektomian vaikutuksesta, mutta oksonihapporyhmien vuorokausivirtsan natriummäärät olivat matalammat ja kaliummäärät korkeammat kuin Sham-ryhmässä. Lisäksi NX+Oxo-ryhmässä vuorokausivirtsan kaliummäärä oli suurempi kuin NX-ryhmässä. K:Na-suhde oli korkeampi oksonihapporyhmissä kuin Sham- ja NX-ryhmissä. Vuorokausivirtsan kalsium ei eronnut ryhmittäin.

**Taulukko 1.**

|  | <b>Sham</b><br>(n=9-12) | <b>Sham+Oxo</b><br>(n=12) | <b>NX</b><br>(n=11-12)  | <b>NX+Oxo</b><br>(n=11-12) |
|--|-------------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------------|
| Alkupaino (g) viikolla 3                 | 338±21                  | 337±24                    | 333±26                  | 332±23                     |
| Loppupaino (g) viikolla 12               | 433±29                  | 412±37                    | 448±35                  | 411±29 <sup>†</sup>        |
| Systolinen verenpaine viikolla 3 (mmHg)  | 120±13                  | 121±16                    | 127±16                  | 125±17                     |
| Systolinen verenpaine viikolla 12 (mmHg) | 134±25                  | 136±17                    | 142±19                  | 152±15                     |
| <b>Plasmamääritykset</b>                 |                         |                           |                         |                            |
| Urea (mmol/l)                            | 6,62±1,03               | 8,33±1,46 <sup>*</sup>    | 13,54±2,89 <sup>*</sup> | 14,54±6,93 <sup>*</sup>    |
| Kreatiniini (µmol/l)                     | 40,2±15,2               | 48,5±10,6                 | 81,9±10,4 <sup>*</sup>  | 83,1±28,1 <sup>*</sup>     |
| Uraatti (µmol/l)                         | 36,0±32,1               | 117,3±72,4 <sup>*</sup>   | 62,9±63,1               | 152,3±65,7 <sup>*†</sup>   |
| pH                                       | 7,42±0,09               | 7,37±0,08                 | 7,34±0,11               | 7,37±0,07                  |
| Na (mmol/l)                              | 136±1,6                 | 137±2,0                   | 137±2,9                 | 137±1,9                    |
| K (mmol/l)                               | 4,12±0,38               | 3,79±0,28 <sup>*</sup>    | 4,28±0,65               | 4,42±0,60                  |
| Ca (mmol/l)                              | 2,42±0,06               | 2,36±0,08                 | 2,43±0,15               | 2,42±0,08                  |
| <b>Vuorokausivirtsamääritykset</b>       |                         |                           |                         |                            |
| Volyymi (ml)                             | 25,2±5,8                | 25,8±6,3                  | 53,2±13,2 <sup>*</sup>  | 49,2±13,6 <sup>*</sup>     |
| Na (mmol)                                | 8,5±1,4                 | 6,6±0,9 <sup>*</sup>      | 7,6±0,8                 | 6,4±2,2 <sup>*</sup>       |
| K (mmol)                                 | 2,8±0,5                 | 4,6±0,7 <sup>*</sup>      | 2,9±0,3                 | 3,7±0,7 <sup>*†</sup>      |
| K:Na-suhde (%)                           | 33,7±2,3                | 69,1±5,1 <sup>*</sup>     | 38,6±4,1                | 61,9±13,6 <sup>*†</sup>    |
| Ca (µmol)                                | 28,6±15,5               | 47,5±18,9                 | 40,0±21,4               | 34,8±15,2                  |

Laboratoriolöydöksiä (keskiarvo ja SD).

\* = eroaa merkitsevästi (p<0,05) Sham-ryhmästä

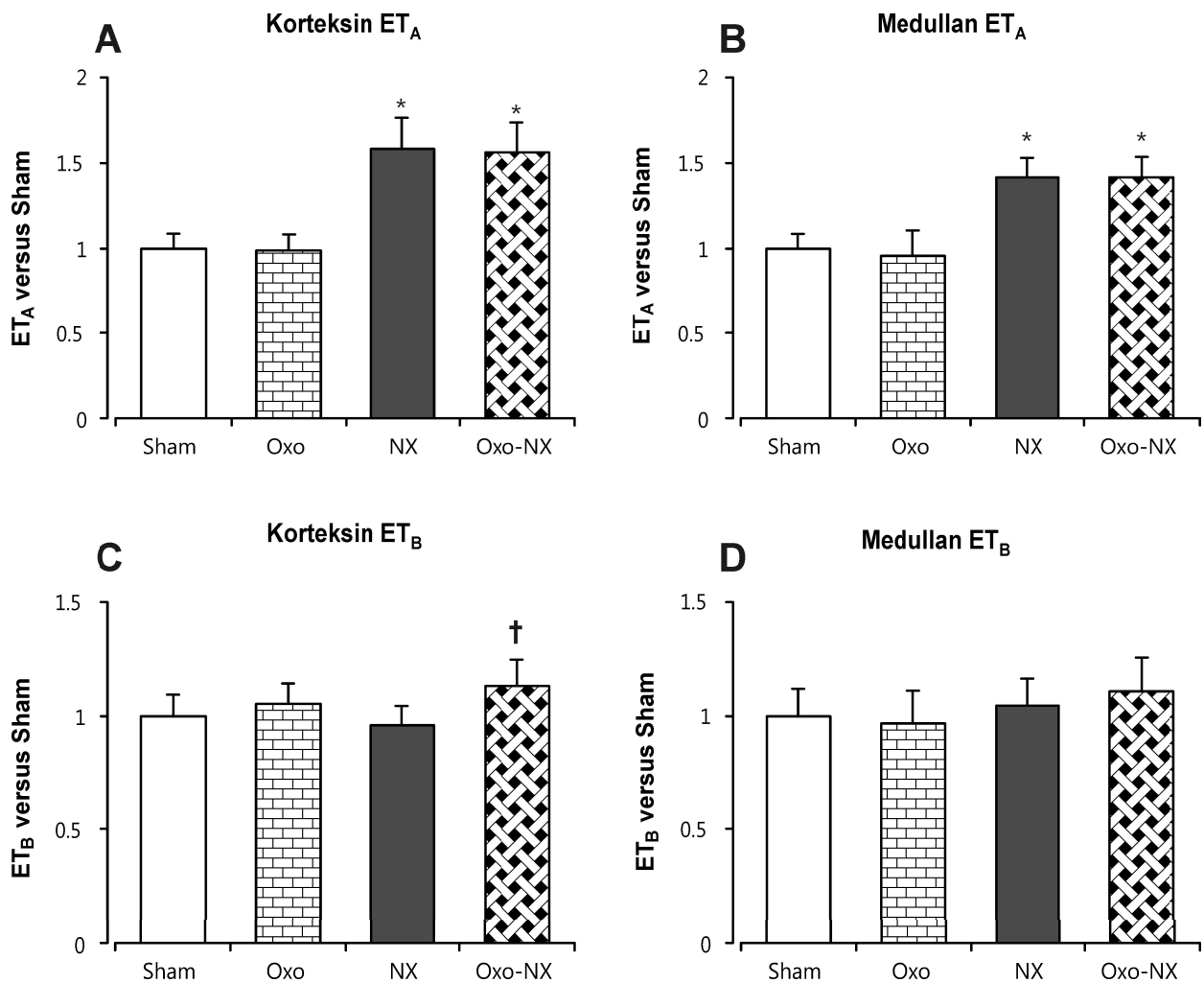
† = eroaa merkitsevästi (p<0,05) NX-ryhmästä, selkeyden vuoksi taulukkoon on merkitty ainoastaan ne tapaukset, joissa NX+Oxo-ryhmä eroaa NX-ryhmästä.

#### 4.1.2 ETA- ja ETB-reseptorien määrä autoradiografian avulla arvioituna

ETA-reseptorien määrät olivat korkeammat nefrektomiaryhmissä kuin Sham-ryhmissä. Sekä NX- että NX+Oxo-ryhmissä ETA-reseptorimäärä oli korkeampi kuin Sham- ja Sham+Oxo-ryhmissä sekä korteksissa että medullassa. Korteksissa nefrektomiaryhmien ETA-reseptorimäärä oli noin 1,6-kertainen ja medullassa noin 1,4-kertainen Sham-ryhmiin verrattuna. Kummankaan nefrektomiaryhmän välillä ei ollut merkitsevää eroa, kuten ei Sham-ryhmienkään välillä.

ETB-reseptorien määrissä havaittiin merkitsevää eroa ainoastaan korteksissa NX- ja NX+Oxo-ryhmien välillä, joista NX+Oxo-ryhmän reseptorimäärät olivat korkeampia. Medullassa ryhmien välillä ei ollut merkitsevää eroa. Reseptorimäärien keskiarvot suhteutettuna Sham-ryhmän arvoihin on esitetty kuvassa 1.

ETA/ETB-suhde oli merkitsevästi suurempi molemmissa nefrektomiryhmissä kuin Sham-ryhmissä. Nefrektomiaryhmien välillä ei ollut merkitsevää eroa, eikä myöskään Sham-ryhmien välillä.



**Kuva 1.** ET<sub>A</sub>- ja ET<sub>B</sub>-reseptoreiden määrät luottamusväleineen korteksissa ja medullassa 12-viikkoisessa kokeellisen munuaisten vajaatoiminnan mallissa. Muiden ryhmien arvot on suhteutettu Sham-ryhmän arvoon, joka toimii vertailuarvona.

\*=eroaa merkitsevästi ( $p < 0,05$ ) Sham-ryhmästä

† = eroaa merkitsevästi ( $p < 0,05$ ) NX-ryhmästä

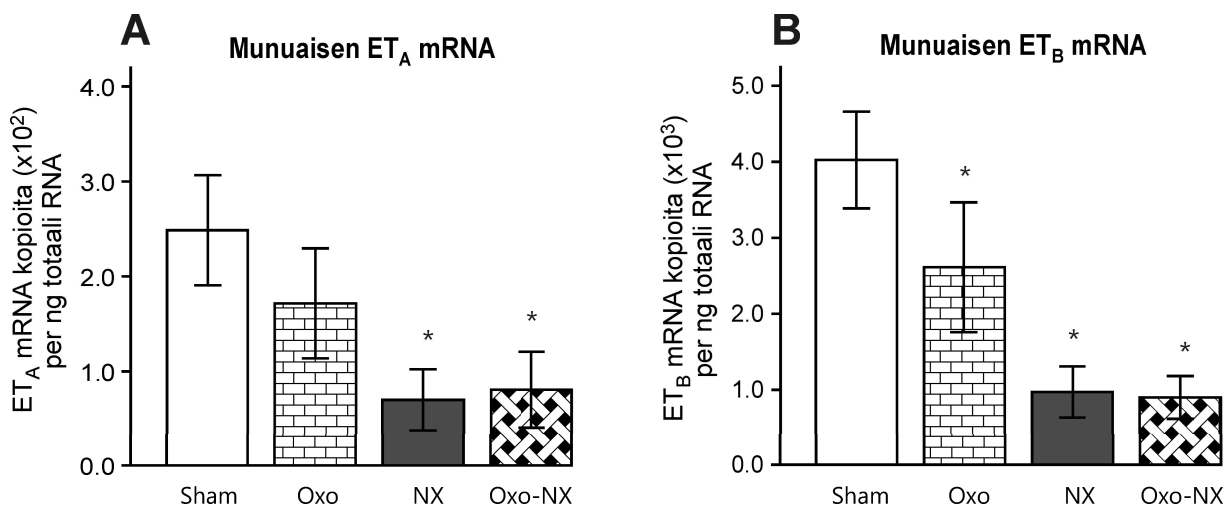
#### 4.1.3 ET<sub>A</sub>- ja ET<sub>B</sub>-reseptorien lähetti-RNA-määrät

ET<sub>A</sub>-mRNA-määrä oli huomattavasti pienempi nefrektomiaryhmissä kuin Sham-ryhmissä (kuva 2). NX- ja NX+Oxo-ryhmät erosivat sekä Sham-ryhmästä että Sham+Oxo-ryhmästä.

Nefrektomiaryhmät eivät eronneet keskenään, kuten eivät Sham-ryhmäkään.



ETB-mRNA-määrä oli suurin Sham-ryhmässä, kun taas nefrektomiaryhmissä määrät olivat pienempiä. NX- ja NX+Oxo-ryhmät erosivat Sham-ryhmästä ja Sham+Oxo-ryhmästä. Lisäksi Sham- ja Sham+Oxo-ryhmien välillä oli tilastollisesti merkitsevää eroa siten, että oksonihappolisää saaneiden rottien ETB-mRNA-määrät olivat pienemmät. Nefrektomiaryhmien välillä ei ollut eroa.



**Kuva 2.** ET<sub>A</sub>- ja ET<sub>B</sub>-reseptoreiden mRNA-määrät luottamusväleinen ryhmittäin 12-viikkoisessa kokeellisen munuaisten vajaatoiminnan mallissa.

\*=eroaa merkitsevästi ( $p < 0,05$ ) Sham-ryhmästä

## 4.2 Kaksikymmentäseitsemänviikkoinen kokeellinen munuaisten vajaatoiminnan malli

### 4.2.1 Rottien ominaisuudet tutkimuksen alussa ja lopussa

Rotat painoivat keskimäärin 484 g viikolla 15, kun jako ryhmiin tapahtui (taulukko 2). Painon suhteen ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa. Tutkimuksen lopussa NX+Ca- ja NX+Pi-ryhmien rottien paino oli merkitsevästi pienempi kuin Sham-ryhmän rottien paino. Muiden ryhmien välillä ei ollut eroa rottien loppupainoissa. Systolinen verenpaine tutkimusasetelman alussa oli korkeampi vajaatoimintaryhmissä kuin verrokkiryhmässä.

Loppuverenpaine oli vajaatoimintaryhmissä korkeampi kuin verrokeilla, eli vajaatoiminta nosti verenpainetta. Fosfaatti- ja parikalsitolilisät eivät vaikuttaneet verenpaineeseen, mutta fosfaatin sitominen kalsiumkarbonaatilla laski verenpainetta, sillä NX+Ca-ryhmän verenpaineet olivat merkitsevästi matalammat kuin muissa 5/6-nefrektomiaryhmissä.

Vajaatoimintaryhmissä havaittiin kohonneiden kreatiniini- ja urea-arvojen perusteella selvä munuaisten vajaatoiminta. NX+Ca- ja NX+Pari-ryhmien välillä oli merkitsevää eroa ureatasoissa siten, että parikalsitoliryhmässä ureatasot olivat korkeammat kuin kalsiumryhmässä. Veren pH-arvo oli NX-ryhmässä merkitsevästi matalampi kuin Sham-ryhmässä, mutta muut vajaatoimintaryhmät eivät eronneet verrokeista.

Vajaatoiminnalla ei ollut vaikutusta veren natriumpitoisuuteen. Sen sijaan fosfaattiryhmän veren natriumpitoisuus oli suurempi kuin muissa ryhmissä. Lisäksi NX+Ca-ryhmän veren natriumtasot olivat merkitsevästi matalammat kuin Sham-ryhmän natriumtasot. Kaliumpitoisuus oli NX- ja NX+Pari-ryhmissä merkitsevästi korkeampi kuin Sham-ryhmässä. Fosfaattilisä sen sijaan laski kaliumtasoa NX-ryhmään verrattuna. Lisäksi NX+Pi- ja NX+Pari-ryhmät erosivat merkitsevästi NX+Ca-ryhmästä siten, että fosfaattiryhmän kaliumpitoisuudet olivat matalammat ja parikalsitoliryhmän pitoisuudet korkeammat kuin kalsiumryhmässä.

Munuaisten vajaatoiminta ei vaikuttanut veren kalsiumpitoisuuksiin. Kuitenkin veren kalsiumpitoisuus oli muita korkeampi NX+Ca-ryhmässä ja lisäksi NX+Pi-ryhmässä kalsiumpitoisuus oli merkitsevästi matalampi kuin Sham-ryhmässä. Fosfaattipitoisuus oli vajaatoimintaryhmissä korkeampi kuin verrokkiryhmässä lukuun ottamatta NX+Ca-ryhmää, jonka pitoisuudet olivat matalimmat. PTH-määrä oli vajaatoimintaryhmissä koholla lukuun ottamatta kalsiumryhmää, jonka PTH-tasot olivat matalammat kuin Sham-ryhmässä.

Vajaatoiminta nosti FGF-23-pitoisuuksia. Lisäksi kalsiumlisä laski FGF-23-pitoisuudet Sham-ryhmää matalammiksi. D-vitamiinin määrä (25OH-D<sub>3</sub>- ja 1,25(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>-vitamiini) oli vajaatoimintaryhmissä matalampi kuin Sham-ryhmässä ja lisäksi parikalsitoliryhmässä merkitsevästi matalampi kuin muissa ryhmissä.

Vajaatoiminta aiheutti vuorokausivirtsan määrän lisääntymisen. NX+Pi- ja NX+Pari-ryhmissä virtsamäärät olivat suuremmat kuin NX- ja NX+Ca-ryhmissä. Vajaatoiminnalla ei ollut vaikutusta vuorokausivirtsan natriumin eikä kaliumin eritykseen. Fosfaattiryhmän vuorokausivirtsan kaliummäärä oli kuitenkin pienempi kuin verrokkiryhmässä. Vajaatoiminta nosti vuorokausivirtsan K:Na-suhdetta, mutta kalsium- ja fosfaattilisät laskivat suhdetta. Matalin K:Na-suhde oli fosfaattiryhmässä. Vajaatoiminta lisäsi myös vuorokausivirtsan kalsiumin eritystä. Lisäksi kalsiumryhmän erittämät kalsiummäärät olivat NX-ryhmää merkitsevästi korkeampia.

**Taulukko 2.**

|   | <b>Sham</b><br>(n=13-15) | <b>NX</b><br>(n=7-13) | <b>NX+Ca</b><br>(n=11-12) | <b>NX+Pi</b><br>(n=7-13) | <b>NX+Pari</b><br>(n=8-13) |
|---|--------------------------|-----------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Paino (g) jaettaessa ryhmiin (viikko 15)                  | 507 ± 33                 | 479 ± 35              | 483 ± 35                  | 486 ± 46                 | 482 ± 34                   |
| Loppupaino (g) (viikko 27)                                | 564 ± 30                 | 507 ± 107             | 481 ± 49*                 | 431 ± 101*               | 503 ± 96                   |
| Systolinen verenpaine viikolla 15 (mmHg)                  | 135 ± 9                  | 154 ± 21*             | 153 ± 14*                 | 152 ± 16*                | 154 ± 12*                  |
| Systolinen verenpaine lopussa (viikko 25) (mmHg)          | 130 ± 7                  | 171 ± 15*             | 143 ± 14*†                | 161 ± 14*#               | 167 ± 16*#                 |
| <b>Plasmamääritykset</b>                                  |                          |                       |                           |                          |                            |
| Urea (mmol/l)   | 5,3 ± 0,6                | 23,3 ± 23,1*          | 12,9 ± 3,8*               | 34,8 ± 30,4*             | 33,8 ± 29,3*#              |
| Kreatiniini (µmol/l)                                      | 66 ± 8                   | 170 ± 100*            | 116 ± 24*                 | 178 ± 82*                | 209 ± 125*                 |
| pH  | 7,40 ± 0,06              | 7,29 ± 0,19*          | 7,40 ± 0,05               | 7,38 ± 0,05              | 7,38 ± 0,05                |
| Na (mmol/l)   | 138,4 ± 2,5              | 138,6 ± 4,3           | 136,5 ± 1,4               | 144,1 ± 3,1*†#           | 139,3 ± 4,4*‡              |
| K (mmol/l)  | 3,5 ± 0,4                | 4,5 ± 1,7*            | 3,6 ± 0,2                 | 3,2 ± 0,4*†#             | 3,9 ± 0,4*#‡               |
| Ca-ion (mmol/l)   | 1,35±0,03                | 1,34±0,08             | 1,59±0,12*†               | 0,93±0,24*†#             | 1,31±0,16*‡                |
| Fosfaatti (mmol/l)  | 1,22±0,23                | 2,52±1,42*            | 0,70±0,20*†               | 5,47±3,21*#              | 3,03±1,28*#                |
| PTH (pg/ml)   | 110±66                   | 1173±978*             | 4±2*†                     | 3620±675*†#              | 619±762*‡                  |
| log FGF23 (pg/ml)   | 2,32±0,16                | 3,31±0,81*            | 1,88±0,23*†               | 4,02±0,55*#              | 4,54±0,91*†#               |
| 25OH-D <sub>3</sub> -vitamiini (nmol/l)                   | 32±11                    | 20±11*                | 14±3*                     | 16±41*                   | 13±2*                      |
| 1,25(OH) <sub>2</sub> -D <sub>3</sub> -vitamiini (pmol/l) | 273±100                  | 70±61*                | 106±73*                   | 106±121*                 | 6±3*†#‡                    |
| <b>Vuorokausivirtsamääritykset</b>                        |                          |                       |                           |                          |                            |
| Volyyymi (ml)   | 21,3±5,5                 | 40,8±11,6*            | 44,3±15,9*                | 63,4±20,1*†#             | 57,9±21,0*†#               |
| Na (mmol)   | 5,5 ± 1,0                | 4,2 ± 2,0             | 6,3 ± 2,1                 | 9,5 ± 5,9                | 6,6 ± 2,4                  |
| K (mmol)  | 2,7 ± 0,4                | 2,2 ± 0,7             | 2,5 ± 0,4                 | 1,7 ± 0,6*               | 2,6 ± 0,7                  |
| K/Na suhde (%)  | 42 ± 4                   | 58 ± 22*              | 41 ± 8*†                  | 21 ± 8*†#                | 43 ± 16*                   |
| Ca (µmol)   | 23 ± 18                  | 65 ± 30*              | 563 ± 153*†               | 48 ± 23*                 | 143 ± 84*‡                 |

Laboratoriolöydöksiä (keskiarvo ± SD).

\* = eroaa merkitsevästi (p<0,05) Sham-ryhmästä

† = eroaa merkitsevästi (p<0,05) NX-ryhmästä

# = eroaa merkitsevästi (p<0,05) NX+Ca-ryhmästä

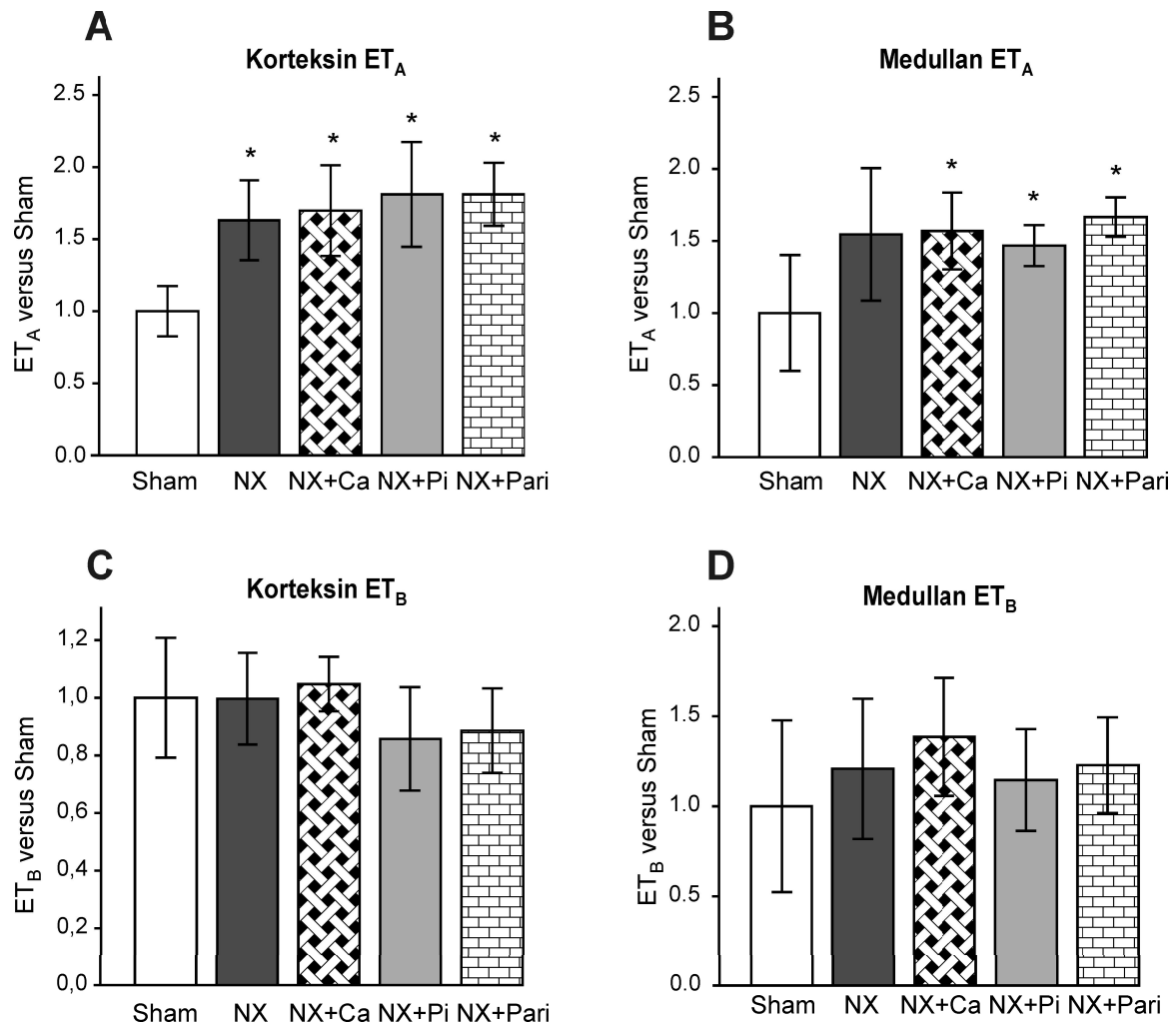
‡ = eroaa merkitsevästi (p<0,05) NX+Pi-ryhmästä

#### 4.2.2 ETA- ja ETB-reseptorien määrä autoradiografian avulla arvioituna

ETA-reseptorien määrässä korteksissa ja medullassa oli tilastollisesti merkitsevää eroa ryhmien välillä (kuva 3). Korteksin ETA-reseptorimäärät erosivat siten, että vajaatoimintaryhmissä reseptorien määrä oli noin 1,7-kertainen Sham-ryhmään verrattuna. Vajaatoimintaryhmien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa. Myös medullassa ryhmät NX+Ca, NX+Pi ja NX+Pari erosivat merkitsevästi Sham-ryhmästä siten, että kyseisissä vajaatoimintaryhmissä reseptorien määrä oli noin 1,5-kertainen. NX- ja Sham-ryhmien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa eivätkä vajaatoimintaryhmät eronneet toisistaan.

ETB-reseptorin määrä korteksissa ja medullassa ei eronnut ryhmittäin.

ETA/ETB-suhde oli suurin NX- ja NX+Pi-ryhmissä ja matalin Sham-ryhmässä. NX-ryhmä ja NX+Pi-ryhmä erosivat Sham-ryhmästä. Muiden ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa.

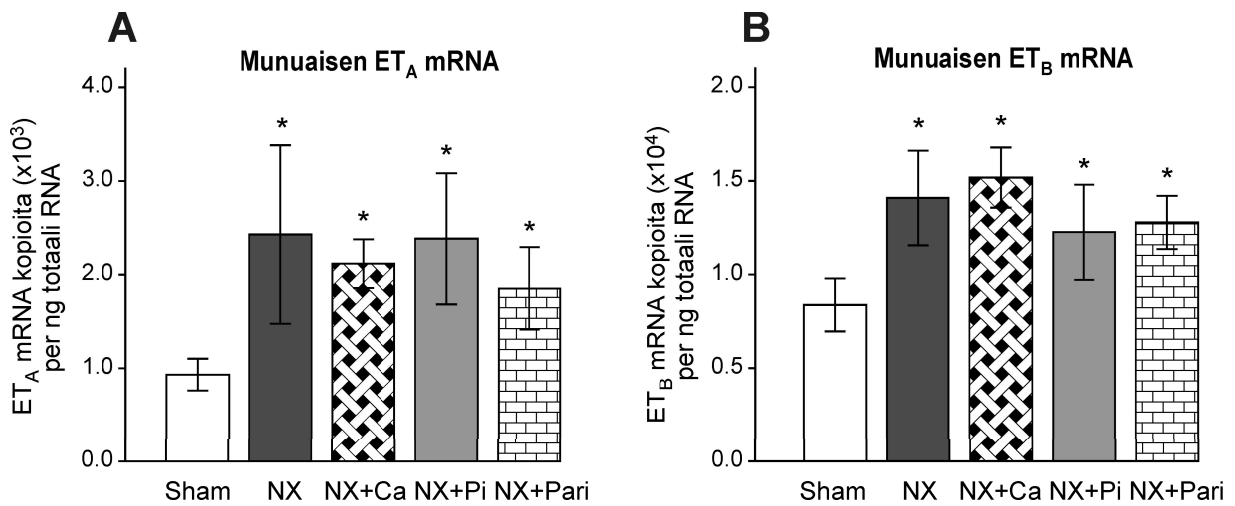


**Kuva 3.** ET<sub>A</sub>- ja ET<sub>B</sub>-reseptorien määrät luottamusväleineen korteksissa ja medullassa 27-viikkoisessa kokeellisen munuaisten vajaatoiminnan mallissa. Muiden ryhmien arvot on suhteutettu Sham-ryhmän arvoon, joka toimii vertailuarvona.  
\* = eroaa merkitsevästi (p<0,05) Sham-ryhmästä

#### 4.2.3 ET<sub>A</sub>- ja ET<sub>B</sub>-reseptorien lähetti-RNA-määrät

Sham-ryhmän ET<sub>A</sub>-reseptorien mRNA-määrät erosivat kaikista muista ryhmistä siten, että vajaatoimintaryhmissä mRNA-määrät olivat koholla Sham-ryhmään verrattuna (kuva 4).

Myös ET<sub>B</sub>-reseptorien mRNA-määrät olivat vajaatoimintaryhmissä merkitsevästi suuremmat kuin verrokkiryhmässä. Lisäksi NX+Ca- ja NX+Pari-ryhmien välillä havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero siten, että kalsiumryhmässä ET<sub>B</sub>-mRNA -määrä on suurempi kuin parikalsitoliryhmässä.



**Kuva 4.** ET<sub>A</sub>- ja ET<sub>B</sub>-reseptoreiden mRNA-määrät luottamusväleinen ryhmittäin pidemmässä kokeellisen munuaisten vajaatoiminnan mallissa.  
\* = eroaa merkitsevästi (p<0,05) Sham-ryhmästä

## 5 POHDINTA

Tutkimuksessa selvitettiin, vaikuttaako kokeellinen munuaisten vajaatoiminta endoteliinireseptorien määrään munuaiskudoksessa. Valmiin proteiinin lisäksi mitattiin geenin ilmentymistä mRNA-määrien avulla. Tutkimuksessa todettiin, että kokeellinen munuaisten vajaatoiminta nostaa ETA-määriä sekä korteksissa että medullassa, kun taas ETB-reseptorien määrässä ei tapahdu merkitsevää muutosta. Tästä seuraa, että vajaatoiminnassa myös ETA/ETB-suhde voi nousta. Tutkimuksessa muutettiin munuaisten vajaatoiminnassa häiriintyviä asioita eli kalsium-fosfori-tasapainoa sekä veren uraattipitoisuutta, joka edelleen vaikutti K-Na-tasapainoon, mutta nämä tekijät eivät kuitenkaan selittäneet ETA-määrien lisääntymistä.

Tutkimus käsitti kaksi pitkäaikaista munuaisten vajaatoiminnan mallia, joista toinen kesti 12 viikkoa ja toinen 27 viikkoa. Molemmissa malleissa onnistuttiin saamaan aikaan 5/6-nefrektomiarotille keskivaikea munuaisten vajaatoiminta, minkä osoituksena 5/6-nefrektomiaryhmissä veren urea- ja kreatiniinipitoisuudet nousivat korkeammiksi kuin verrokkiryhmissä. Lisäksi 12-viikkoisessa kokeellisen munuaisten vajaatoiminnan mallissa nähtiin, että Sham+Oxo-ryhmässä oli korkeampi uraattipitoisuus kuin Sham-ryhmässä, mikä osoittaa oksonihapon nostaneen uraattitasoja.

Lyhyemmässä tutkimusmallissa jako ryhmiin tapahtui 3 viikon kuluttua 5/6-nefrektomia- tai sham-leikkauksesta. Pidemmässä tutkimusmallissa rottien jako ryhmiin tapahtui vasta 15 viikon kuluttua operatiosta. Tässä mallissa ensimmäiset verenpainemittaukset on tehty 15 viikkoa leikkauksesta. Tässä ajassa 5/6-nefrektomiarottien munuaisten vajaatoiminta on ehtinyt kehittyä, mikä näkyy siinä, että jo ensimmäiset mitatut verenpaineet erosivat Sham-ryhmän verenpaineista.

Tutkimuksessa havaittiin, että ETA-reseptorin määrä on kokeellisessa munuaisten vajaatoiminnan mallissa koholla proteiinitasolla sekä korteksissa että medullassa. Tilastollinen



ero ei tullut esiin 27-viikkoisen kokeellisen munuaisten vajaatoiminnan mallin NX- ja Sham-ryhmien välillä medullassa ( $p=0,106$ ). Kaksitoistaviikkoisessa mallissa tilastollisesti merkitsevä ero ETA-reseptorimäärissä NX- ja Sham-ryhmien välillä tuli kuitenkin esiin myös medullatasolla.

Munuaisten vajaatoiminta ei muuttanut ETB-reseptorien määrää kummassakaan mallissa. Ainoastaan 12-viikkoisessa mallissa korteksin ETB-reseptoreiden määrä oli NX+Oxo-ryhmässä suurentunut NX-ryhmään verrattuna.

ETA-reseptorin lähetti-RNA-määrien suhteen saadut tulokset eivät ole täysin yhteneviä, sillä 27-viikkoisessa vajaatoiminnan mallissa vajaatoimintaryhmien ETA-mRNA-määrät olivat suuremmat kuin verrokkiryhmässä, mikä viittaisi siihen, että ETA-reseptorien määrä on suurentunut sekä proteiini- että mRNA-tasolla. Kuitenkin 12-viikkoisessa tutkimuksessa havaittiin, että ETA-mRNA-määrä oli vajaatoimintaryhmissä matalampi kuin verrokkiryhmissä. Tämä viittaisi puolestaan siihen, että ETA-reseptorin geenin luenta mRNA:ksi ei olisi vilkastunut, vaan geeniekspressio olisi pikemminkin vähentynyt. Suurentuneet ETA-tasot voisi mahdollisesti selittää valmiiden mRNA-ketjujen koodaamisen lisääntyminen tai reseptorien hajoamisnopeuden hidastuminen.

Kaksikymmentäseitsemäviikkoisessa vajaatoiminnan mallissa nefrektomiaryhmien ETB-reseptorin mRNA-tasot olivat verrokkiryhmää korkeampia, mutta eroa ei havaittu proteiinitasolla. Tämä viittaisi siihen, että myös ETB-reseptorin mRNA-tuotto on kasvanut, mutta sitä ei käytetä proteiinisynteesiin sen enempää kuin terveissäkään munuaisissa. Kuitenkin 12-viikkoisessa mallissa ETB-reseptorin mRNA-määrä oli suurin verrokkiryhmässä ja nefrektomiaryhmien tasot olivat matalimpia. Proteiinitasolla eroa oli ainoastaan NX- ja NX+Oxo-ryhmien välillä, joiden välillä taas ei havaittu minkäänlaista merkitsevää eroa mRNA-määrissä. ETB-reseptorin mRNA:n ilmentymisen vähentyminen 5/6-nefrektomiarotilla on todettu myös toisessa tutkimuksessa (Shimizu ym. 1999).

Molemmista malleissa havaittiin vajaatoiminnan aiheuttama muutos ETB-mRNA-määrissä, vaikka proteiinitasolla ETB-määrät eivät muuttuneet. Solun mRNA-määrän muutos ei siis ole vaikuttanut valmiiden reseptoreiden määrään. Sekä ETA- että ETB-reseptorien mRNA-määristä saadut tulokset kuvaavat sitä, että solun proteiinituotanto on useiden säätelyprosessien alainen, eikä mRNA:n ja valmiin proteiinin välinen yhteys ole suoraviivainen.

Tutkimusten heikkoutena ovat pienet otoskoot, joita mortaliteetti ja näytteenotto-ongelmat ovat edelleen pienentäneet. Kun aineisto on jaettu ryhmiin, jää yhden ryhmän otoskoko siinä määrin pieneksi että se voi häiritä tilastollisen käsittelyn luotettavuutta. Tuloksista kuitenkin näkyy, että näinkin pienellä aineistolla on saatu selkeästi tilastollisesti merkitseviä tuloksia.

Pienessä aineistossa voimakkaat muutokset yksittäisten rottien metaboliassa vaikuttavat voimakkaammin koko alaryhmän keskiarvoihin kuin suuremmissa aineistoissa. Tämä on nähtävissä 27-viikkoisen tutkimuksen parikalsitoliryhmän kohdalla. Ryhmässä oli kaksi erittäin huonovointista rottaa, joiden vajaatoiminnan astetta kuvaavat veriarvot (urea 88,9 mmol/l ja 76,1 mmol/l sekä kreatiniini 402  $\mu\text{mol/l}$  ja 375  $\mu\text{mol/l}$ ) poikkesivat huomattavasti muiden saman ryhmän rottien arvoista. Tämä näkyy suurena keskihajontana. Analyysissa saatiin esille parikalsitoliryhmän ja kalsiumryhmän välille ero urea- ja kreatiniinipitoisuuksissa, mutta jos kaksi parikalsitoliryhmän sairasta rottaa poistetaan analyysistä, ryhmän ureapitoisuuden keskiarvo laskee arvosta  $33,8 \pm 29,3$  (mmol/l) arvoon  $19,8 \pm 10,5$  (mmol/l) eikä tilastollisesti merkitsevää eroa enää ole. Ryhmän kreatiniinin keskiarvo laskee arvosta  $209 \pm 125$  ( $\mu\text{mol/l}$ ) arvoon  $158 \pm 84$  ( $\mu\text{mol/l}$ ), kun kaksi sairainta rottaa on suljettu pois. Molemmista tapauksissa tilastollinen ero Sham-ryhmään kuitenkin säilyy. Kun nämä kaksi rottaa jätetään analyysin ulkopuolelle, havaitaan ero parikalsitoliryhmän ja kalsiumryhmän välillä rottien loppupainoissa (parikalsitoliryhmän painot keskimäärin suurempia). Sen sijaan ryhmien välillä ei tule esiin merkitsevää eroa virtsan natriumpitoisuuksien suhteen. Tämän tutkimuksen varsinaiseen analyysiin on kuitenkin laskettu mukaan kaikki rotat, joiden tiedot olivat käytettävissä, jotta välttyttäisiin jo valmiiksi pienten alaryhmien liialliselta supistumiselta. Mainittakoon, että parikalsitoliryhmän kaksi sairainta rottaa eivät olleet mukana endoteliinireseptorimäärityksissä tietojen puutteen vuoksi. Lähetä-RNA-määrityksissä kyseiset rotat ovat mukana.

Munuaisten vajaatoiminnan asteella ja vajaatoiminnan kestolla on merkitystä tulosten kannalta, mutta molemmissa malleissa ETA-reseptoreiden määrä oli lisääntynyt riippumatta taudin kestosta tai vajaatoiminnan asteesta. Kaksitoistaviikkoisessa mallissa rotat saivat ryhmien mukaista ravintoa 9 viikkoa ja 27-viikkoisessa mallissa viimeiset 12 viikkoa toteutettiin ryhmiin jaettuina. Ravinto vaikuttaa vajaatoiminnan asteeseen, mutta tutkimuksen kaikki 5/6-nefrektomiarottien endoteliinireseptorimäärät erosivat selvästi Sham-rotista. Tämä viittaa siihen, että muutos endoteliinireseptoreiden ilmentymisessä ei ole riippuvainen kalsium-, fosfaatti-, D-vitamiini- tai uraattipitoisuuksista.

Tutkimus osoittaa, että ETA-reseptoreiden määrä munuaiskudoksessa lisääntyy kokeellisessa keskipitkässä munuaisten vajaatoiminnan mallissa sekä korteksissa että medullassa. Muutos on nähtävissä vajaatoiminnan kestosta tai vaikeusasteesta riippumatta. ETB-reseptoreiden määrä ei muutu merkitsevästi korteksissa eikä medullassa. Kokeellisessa keskipitkässä munuaisten vajaatoiminnan mallissa ETA-reseptoritasot olivat koholla vähentyneestä geeniekspressiosta huolimatta, kun taas pidempiaikaisessa vajaatoiminnassa sekä ETA-geeniekspressio että valmiin proteiinin määrät olivat selvästi lisääntyneet terveeseen kontrolliin verrattuna.

## 6 LÄHTEET

- Amann K, Tyralla K, Gross ML, Eifert T, Adameczak M ja Ritz E. Special characteristics of atherosclerosis in chronic renal failure. *Clin Nephrol* 2003;60:S13-21.
- Barton M. Reversal of proteinuric renal disease and the emerging role of endothelin. *Nat clin pract nephrol* [verkkolehti] 2008;4:490-501:Sep.
- Barton M. Therapeutic potential of endothelin receptor antagonists for chronic proteinuric renal disease in humans. *Biochim Biophys Acta* 2010;1802:1203-13.
- Bohm F ja Pernow J. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2007;76:8-18.
- Braun J, Oldendorf M, Moshage W, Heidler R, Zeitler E ja Luft FC. Electron beam computed tomography in the evaluation of cardiac calcification in chronic dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1996;27:394-401.
- Dean R, Zhuo J, Alcorn D, Casley D ja Mendelsohn FA. Cellular localization of endothelin receptor subtypes in the rat kidney following in vitro labelling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996;23:524-31.
- Dhaun N, Goddard J, Kohan DE, Pollock DM, Schiffrin EL ja Webb DJ. Role of Endothelin-1 in Clinical Hypertension: 20 Years On. *Hypertension* 2008;52:452-9.
- Epstein BJ ja Anderson S. Endothelin receptor antagonists as antihypertensives: the next frontier. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 2009;7:675-87.
- Fukagawa M, Nii-Kono T ja Kazama JJ. Role of fibroblast growth factor 23 in health and in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005;14:325-9.
- Jokihaara J, Pörsti I, Pajamaki I, ym. Paricalcitol [19-nor-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>] in the treatment of experimental renal bone disease. *J Bone Miner Res* 2006;21:745-51.
- Jono S, Shioi A, Ikari Y ja Nishizawa Y. Vascular calcification in chronic kidney disease. *J Bone Miner Metab* 2006;24:176-81.
- Kohan DE. Biology of endothelin receptors in the collecting duct. *Kidney Int* [verkkolehti] 2009;76:481-6:Sep.
- Kohan DE. Endothelin, hypertension and chronic kidney disease: new insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens* [verkkolehti] 2010;19:134-9:Mar.
- Kööbi P, Kalliovalkama J, Jolma P, ym. AT1 receptor blockade improves vasorelaxation in experimental renal failure. *Hypertension* [verkkolehti] 2003;41:1364-71:Jun.

Lariviere R ja Lebel M. Endothelin-1 in chronic renal failure and hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:607-21.

Luke RG. Chronic renal failure--a vasculopathic state. *N Engl J Med* 1998;339:841-3.

Mizobuchi M, Towler D ja Slatopolsky E. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol [verkkolehti]* 2009;20:1453-64:Jul.

Moe SM ja Chen NX. Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Circ Res [verkkolehti]* 2004;95:560-7:Sep 17.

Nakagami H, Osako MK ja Morishita R. New concept of vascular calcification and metabolism. *Curr Vasc Pharmacol [verkkolehti]* 2011;9:124-7:Jan.

Neuhof W ja Pittrow D. Endothelin receptor selectivity in chronic kidney disease: rationale and review of recent evidence. *Eur J Clin Invest [verkkolehti]* 2009;39:50-67:Jun.

Peltonen T, Taskinen P, Napankangas J, ym. Increase in tissue endothelin-1 and ETA receptor levels in human aortic valve stenosis. *Eur Heart J [verkkolehti]* 2009;30:242-9:Jan.

Pörsti I, Fan M, Kööbi P, ym. High calcium diet down-regulates kidney angiotensin-converting enzyme in experimental renal failure. *Kidney Int* 2004;66:2155-66.

Rostand SG ja Drueke TB. Parathyroid hormone, vitamin D, and cardiovascular disease in chronic renal failure. *Kidney Int* 1999;56:383-92.

Saliba, Wissam E ja Boutros. Secondary Hyperparathyroidism: Pathophysiology and Treatment. *Journal of the American Board of Family Medicine* 2009;22:574-81.

Shimizu T, Hata S, Kuroda T, Mihara S ja Fujimoto M. Different roles of two types of endothelin receptors in partial ablation-induced chronic renal failure in rats. *Eur J Pharmacol* 1999;381:39-49.

Stenvinkel P. Chronic kidney disease: a public health priority and harbinger of premature cardiovascular disease. *J Intern Med* 2010;268:456-67.

Suomen munuaistautirekisterin vuosiraportti 2010. Munuais- ja maksaliitto ry.  
[http://www.musili.fi/munuais-\\_ja\\_maksaliitto/munuaistautirekisteri/vanhat\\_vuosiraportit](http://www.musili.fi/munuais-_ja_maksaliitto/munuaistautirekisteri/vanhat_vuosiraportit).  
Päivitetty 1.6.2012, viitattu 25.1.2013.

Wu SY, Zhang BH, Pan CS, ym. Endothelin-1 is a potent regulator in vivo in vascular calcification and in vitro in calcification of vascular smooth muscle cells. *Peptides* 2003;24:1149-56.