

XXXII. OTDK Biológia Szekció

A dohányzás károsító hatásainak molekuláris vizsgálata dohányzó és nem dohányzó édesanyáktól született újszülöttek köldökzsínór mintáiban

Zahorán Szabolcs

Biológus MSc. II. évfolyam

2014.



Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar

Témavezető: Dr. Hermes Edit, egyetemi docens

SZTE-TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Tartalomjegyzék

2. Bevezető	3
2.1 A dohányfüst és a szabadgyökök	3
2.2 A dohányzás és az oxidatív stressz	4
2.3 Fémek és a dohányzás	5
2.3.1 A dohányfüstben előforduló fémek	6
2.3.2 A kadmium toxicitás, kinetika és metabolizmus	9
2.3.3 A króm toxicitás, kinetika és metabolizmus	10
2.4 A károsító hatások elleni védekezés lehetőségei	11
2.4.1 A méhlepény felépítése és szerepei a fejlődő magzat védelmében	11
2.4.2 A fejlődő magzat antioxidáns védelmi rendszerének szerepe és érése	14
2.5 A köldökzsín felépítése és funkciói	16
3. Célkitűzés	20
4. Anyagok és módszerek	20
4.1 A beteganyag	20
4.2 A vizsgálati csoportok kialakítása	20
4.3 A minták feldolgozása	21
4.4 A minták fémtartalmának meghatározása	21
4.5 Hisztológia: metszetek készítése és Schiff-festés	22
4.6 Immunhisztokémia	23
4.7 PCR vizsgálatok	23
4.8 Géli dokumentáció	24
5. Eredmények és megbeszélésük	25
5.1 Születési paraméterek alapján történő csoportosítások	25
5.2 A fémmérések	26
5.3 Hisztológia	28
5.4 Immunhisztokémia	31
5.5 A PCR amplifikációk eredményei	33
5.6 Összegzés	34

2. Bevezető

A dohányzással összefüggésbe hozható betegségek világszerte a vezető halálokok közé sorolhatóak. Annak ellenére, hogy az emberek ismerik a velejáró lehetséges következményeket, még mindig nagyon magas a dohányzók/nem dohányzók aránya [1]. A dohányzással összefüggésbe hozható halálesetek száma, hozzávetőlegesen 5 millió embert jelent évente, világszerte, amelyből számos haláleset a felnőtt kor elérése előtt történik [2], [3]. Mindemellett, becslések szerint 600.000 ember hal meg a passzív dohányzás hatásai miatt [2], [4]. A dohányzás több embert öl meg, mint a TBC, a HIV/AIDS és a malária megbetegedések összesen. A következő két évtizedben a becsült éves halálozások száma 8 millióra nőhet [2], [3]. Magyarországon évente 28 ezer ember veszti életét valamilyen, a dohányzással összefüggésbe hozható betegség következtében, ami világviszonylatban is magasnak számít. Mivel maga a dohányzás csupán egy életmódbeli tényező, ezáltal a leginkább kivédhető halálokok között tartják számon. A dohányzással összefüggő patológiás állapotok leírása egészen az 1920-as évekig nyúlik vissza, melyek száma napjainkban is egyre bővül [1].

A dohányfüst nagy mennyiségben tartalmaz oxidáns tulajdonságú vegyületeket. Ezek különböző biológiai struktúrákat károsíthatnak, mely hátrányosan érinti a szövetek és sejtek normál működését, ezáltal a szervezet egészét is. Ezen felül a dohányzással összefüggésbe hozható gyulladásos állapotok és immunsejtek aktivációja is hozzájárul prooxidánsok termeléséhez, melyek tovább fokozhatják az oxidatív károsodás mértékét [5]. A makromolekulák károsodásának legklasszikusabb példái között megemlíthető a lipid peroxidáció (LP) [6], fehérje oxidáció [7] és DNS károsodás [8]. Mindezek mellett a dohányzás közvetett hatásaként kiemelhető, hogy számos anyagcsere rendellenesség és táplálkozási zavar kialakulásának rizikófaktoraként tartják számon [9], [10].

2.1 A dohányfüst és a szabadgyökök

A dohányfüst alapvetően két különböző fázisra osztható, a kátrány és a gáz fázisra [11]. Mindkettő egyaránt tartalmaz az adott fázisra jellemző szabadgyököket és oxidáns tulajdonságú molekulákat. Ezek lehetnek szerves és szervetlen molekulák, úgymint epoxidok, peroxidok, NO₂ (nitrogén-dioxid), ONOO⁻ (peroxinitrit), NO (nitrogén-monoxid) és egyéb

gyökös vegyületek [13]. Ezen vegyületek jelenléte kedvezőtlenül hat a szervezet pro- és antioxidáns egyensúlyára, ezáltal növelik az oxidatív károsodás veszélyét. A kátrány fázisban előforduló gyökök közül a legjelentősebb a kátrányos mátrixba ágyazott kinon/hidrokinon (Q/QH₂) komplex. A Q/QH₂ polimerek aktív redox rendszerként képzelhetők el. Ennek megfelelően képesek a molekuláris oxigén (O₂) szuperoxid anionná (O₂⁻), történő redukciójára, mely végül hidrogén-peroxid (H₂O₂) és hidroxilgyök (OH•) képződéséhez vezet. Ezen folyamatok fémek által katalizált felgyorsulását Fenton-reakciónak nevezzük, mely a folyamat ciklikusságát idézi elő. A gáz fázis oxigén és szén központú szerves gyökei rendkívül reaktívak. Ezek közül legmagasabb koncentrációban a NO, reaktív olefinek és a diének vannak jelen [12]. A NO képes NO₂-dá alakulni, mely aztán reakcióba lép a füst más összetevőivel, mint például az izoprén vegyületekkel, így alakítanak ki szén központú szerves gyököket. Miután kialakultak, a szerves gyökök (R•) gyorsan reakcióba lépnek a füstben jelenlévő molekuláris oxigénnel, így peroxil gyökök (ROO•) keletkeznek. A ROO•-k pedig a NO által katalizált reakció során deoxigenálódnak, így alkoxil gyökök (RO•) alakulnak ki. Az RO• mellett keletkező NO₂ egy újabb láncreakciót képes inicializálni [11]. A láncreakció terminációja során peroxinitrátok (ROONO₂), alkil-nitrátok (RONO₂) és alkil-nitritek (RONO) keletkeznek.

2.2 A dohányzás és az oxidatív stressz

Oxidatív stresszről akkor beszélünk, ha felborul a szervezet pro- és antioxidáns egyensúlya a szabadgyök képződés irányába. Ezt egyaránt okozhatja a belső és külső forrásból származó prooxidánsok megnövekedett koncentrációja.

A dohányfüst több mint 4700 kémiai vegyületet, magas koncentrációban szabadgyököket és prooxidáns tulajdonságú vegyületeket tartalmaz [14]. Hosszú évek során világossá vált, hogy ezen prooxidáns vegyületek degradálják a szövetek aszkorbinsav tartalmát, károsítják a fehérjék szulfhidril-csoportjait, végső soron pedig károsítják a fehérje, lipid és DNS makromolekulák összességét [15-17]. A közvetlen szöveti károsító hatások mellett, a szabad gyökök módosíthatják a gyulladásos immunválasz néhány résztvevőjét, azzal, hogy fokozzák a proinflammatorikus citokinek expresszióját [18]. Az általuk kiváltott gyulladásos állapot pedig fokozza az oxidatív stressz kialakulásának lehetőségét és mértékét [19]. A fentiekből következően ezzel elindul egy olyan folyamat, melyben öngerjesztő körök erősítik egymás hatását. A kialakult túlzott válaszreakciók szöveti károsodásokhoz vezetnek

[20]. A dohányzás miatt a szervezetbe kerülő vagy ott képződő szabadgyökök így közvetlenül járulnak hozzá különféle patológiás állapotok kialakításához [21]. Közvetlenül kiváltott ROS termelésen felül a polimorfonukleáris (PMN) sejtek is lehetnek oxigén szabadgyökök forrásai [22]. A PMN sejtek összefoglaló néven a neutrofil, eozinofil, bazofil granulocitákat jelenti. A dohányfüst képes ezen sejteket aktiválni a komplement rendszer C5 aktivációja által. A PMN sejtek a patogének elleni immunreakcióban vesznek részt. Ezen sejtek és általában az oxigén szabadgyökök citotoxikus hatásukat a membránlipidekre gyakorolt peroxidációs aktivitásukon keresztül fejtik ki. Ennek hatására megváltozik a membránok fluiditása, nő a permeabilitás és csökken az integritás [23], [24]. Ezen jelenségekre alapozva megfigyelhető, hogy a dohányosok vérében a PMN leukociták aktivitása a kétszeresére növekszik. Ezzel párhuzamosan pedig megnő a MDA (malondialdehid), LP-s végtermék koncentrációja nem dohányzó kontroll egyedekhez viszonyítva.

Ezek mellett fontos megemlíteni, hogy a dohány és az abból keletkező füst számos fém/nehézfém is tartalmaz. Ezek egészségre gyakorolt hatása szintén nem hanyagolható el.

2.3 Fémek és a dohányzás

A fémek esszenciális fontossággal bírnak a szervezet normál működésében. Számos biológiai folyamat lezajlásához nélkülözhetetlenek. Azonban, ha a koncentrációjuk meghaladja a fiziológiás határértéket, akkor előtérbe kerül az egészséget károsító hatásuk. Ennek egyik lehetséges rizikófaktor a dohányzás, hiszen a szervezetbe kerülő füst megzavarja a szervezet finoman szabályozott fém egyensúlyát. A dohánynövények fém tartalma, illetve az ezek elégetésével szervezetbe jutó füst fém tartalma egyaránt hatással van a keringési rendszerre és más szervekre is. A dohánynövény (*Nicotiana tabacum*) azon növények közé tartozik, amely a talaj esszenciális elemeinek felvételére szolgáló mechanizmusa mellett képes felvenni és akkumulálni annak fémtartalmát is. Így aztán a dohányzás egészséget károsító hatását tovább növeli, hogy olyan toxikus fémek, mint az alumínium (Al), kadmium (Cd), króm (Cr), réz (Cu), ólom (Pb), higany (Hg), nikkel (Ni), vanádium (V) és cink (Zn) egyaránt megtalálhatóak a dohányban, a filterben, így magában a dohányfüstben is. Ezen fémek egyes patomechanizmusokban betöltött pontos szerepe még kevésbé tisztázott [25]. Újabb adatok szerint a dohányzás útján bekerülő fémek kulcsfontosságúak lehetnek olyan folyamatokban is, melyek az erek endotéliumának

károsodásához vezetnek, ami az érlemeszesedés felé vezető elváltozások első lépcsőfoka [26].

2.3.1 A dohányfüstben előforduló fémek

A dohányzás miatt megváltozott fém homeosztázis számos betegség kialakulásában vagy kiteljesedésében játszhat fontos szerepet [25]. Az egyes fémek mennyiségének eloszlása a cigarettákban rendkívül változó, és számos faktor által befolyásolt. Az ezekről rendelkezésre álló adatokat néhány fontosabb képviselőt figyelembe véve tekinthetünk át a továbbiakban.

Kadmium (Cd): A dohányfüstben található fémek közül a legjobban tanulmányozott, mivel ez a tevékenység a Cd bevitel fő forrása. Mennyisége változó, általában cigarettánként 0,5 és 1,5 µg-os mennyiségben van jelen. Mivel dohányzás közben a Cd oxidálódik, kadmium-oxid formájában kerül belégzésre. Tanulmányok szerint az így belélegzett Cd 10%-a rakódik le a tüdőben, és 20-50%-a kerül be a keringési rendszerbe [27]. Kutatások alapján a vérből kimérhető átlagos Cd tartalom dohányosok esetén 1,9-szeres értéket mutat a nem dohányzókhoz viszonyítva 30 éves átlagéletkor esetén. A 16 éves átlagéletkorú dohányosoknál pedig ez az érték még drasztikusabb 3,1-szeres eltérést mutat nem dohányzó társaikhoz viszonyítva. A Cd nem csak a keringési rendszerben, hanem a vesékben is felhalmozódhat. Azon belül is a kéregállományban, ahol metallothioneinek (MT) kelátolják és immobilizálják ezeket. Ennek a jelentősége abban rejlik, hogy számos tanulmányban számolnak be arról, hogy a Cd felhalmozódás kiválasztó szervrendszeri problémákhoz, végül pedig veseelégtelenséghez vezet. Ezzel szemben az is bizonyítható, hogy a dohányzás során a szervezetbe kerülő kadmium mennyisége túl alacsony az akut veseelégtelenség kiváltásához [28-30]. Ez a mennyiség, viszont éppen elegendő ahhoz, hogy ezzel összefüggésben csökkenjen az újszülöttek testtömege. Bár a méhlepény jelentős védettséget nyújt a fejlődő magzat számára az anyai eredetű Cd-től, a születést követően mégis, rövid időn belül megnő az újszülött terheltsége, amely az anyatejjel történő táplálás következménye [31]. Általánosságban elmondható, hogy a Cd egy rendkívül toxikus nehézfém.

Króóm (Cr): A Cr mennyisége cigarettánként 0,2-0,5 ng-nyi mennyiségek között változik [34], képes felhalmozódni a szövetekben, különösképp a tüdőben; dohányosok esetében 4,3 mg/kg száraztömeg mennyiségben van jelen, míg nem dohányzók esetében ez a szám csak 1,3 mg/kg. Ez az arány az életkor előrehaladtával növekszik és nagyban függ attól, hogy a vizsgált illető milyen régóta dohányzik [35]. A Cr-ot az IARC (*International Agency for Research Cancer*) a karcinogén anyagok I.-es csoportjába sorolja. Ezen vegyületek főként

OH•-kel képzett komplex formájában léteznek, amelyek potenciális DNS károsító (egyes szálú törés) hatással rendelkeznek [36]. A karcinogén hatások mellett ismeretes a krónikus légzőszervi megbetegedések kialakulásában játszott szerepük is, amely lehet például fekély kialakulása, gyulladás, a tüdő károsodása és tüdőtágulat [37].

Ólom (Pb): Habár maga a dohányzás nem tartozik a fő Pb beviteli források közé, napjainkra egyre inkább fontos tényezője a szervezet teljes ólom terheltségének. Ennek oka, hogy manapság szinte teljes mértékben háttérbe szorult az ólmozott üzemanyagok használata. Megközelítőleg a szervezetbe kerülő Pb 50%-a származik valamilyen üzemanyagból, de nem elhanyagolhatóak a táplálkozással bejutó mennyiségek sem [30]. Egyetlen cigaretta Pb tartalma hozzávetőlegesen 1,2 µg, és körülbelül 6%-a halad keresztül a közvetlenül belélegzett fő füstön [38]. Az Pb főként a vörösvértestekhez kötötten van jelen a keringésben [30]. A nem dohányzó alanyok esetében a vér teljes Pb szintje $101,6 \pm 30,9$ µg/l, ez a dohányosok esetében $143,7 \pm 33,8$ µg/l [28]. Az Pb képes kiválasztódni, majd a vizelettel együtt távozni a szervezetből, a fél-életideje azonban magas, ezért megfigyelhető a vázrendszerben történő felhalmozódása is. Annak ellenére, hogy a vér-agy gát hozzávetőlegesen impermeabilis Pb tekintetében, mégis ismertek neurotoxikus hatásai. Különös tekintettel a gyerekek vannak veszélyben, mivel a korai Pb kitettség neurodegeneratív betegségeket és szellemi visszamaradottságot okoz [39]. Más lehetséges hatásai között tartják számon a szürkehályog [32] és a perifériás arteriális betegségek kialakulását [33].

Cink (Zn): A cigaretta átlagban 24 µg/g-os koncentrációban tartalmaz Zn-et, melynek a 70%-a be is kerül a füstbe [38]. Ennek ellenére a szérum Zn tartalma nem mutat korrelációt a dohányzási szokásokkal [40]. Speciális esetekben, mint például a terhesség, a mononukleáris immunsejtek és egyéb sejttípusok redukált Zn tartalommal rendelkezhetnek [38]. A redukált Zn szintek hatással lehetnek az immunrendszeri funkciókra [41]. Az a folyamat, melynek során a dohányzás következtében csökken a Zn tartalom, összefüggésbe hozható a vér megemelkedett Cd szintjével. Ugyanis a Cd indukálja a metallothioneinek expresszióját, melyek nem csak a Cd-ot, hanem a Zn-et is megkötik [25].

	Jelenlét a cigarettaiban/füstben	Dohányzás hatására a keringésben mérhető szintje	Betegségekkel kapcsolatos relevancia	Kiváltott betegség
Alumínium (Al)	Igen	Nem változik	Nincs	Nincs
Kadmium (Cd)	Igen	Nő	Igen	Végstádiumú veseelégtelenség, csonttritkulás, stb.
Króm (Cr)	Igen	Nő	Igen	Karcinogén
Réz (Cu)	Igen	?	?	Oxidatív stressz
Mangán (Mn)	Igen	Nem változik	Nincs	Nincs
Nikkel (Ni)	Igen	Nem változik	Nincs	Nincs
Ólom (Pb)	Igen	Növekszik	Igen	Idegrendszeri rendellenességek (gyerekek!)
Szelén (Se)	Igen	Csökken	Igen	Karcinogén, szív- és érrendszeri betegségek
Higany (Hg)	Elenyésző	Nem változik	Nincs	Nincs
Vanádium (V)	Igen	?	Nincs	Nincs
Cink (Zn)	Igen	Általában nem változik, Speciális körülmények között: csökken	?	Immunrendszeri diszfunkciók, karcinogenezis

1. táblázat: Különböző fémek jelenléte a dohányfüstben és szerepük egyes betegségek kialakulásában [25]

A fenti adatok alapján (1. táblázat) látható, hogy a dohányfüstben megtalálható fémek fontos szerepet játszhatnak minden olyan betegség patomechanizmusában, melyeket a dohányzással összefüggésbe hozhatunk.

Összességében elmondható, hogy a cigaretta füstben található fémek katalizátor szereppel bírnak. Ezért képesek felgyorsítani olyan fiziológiás folyamatokat, melyek oxidatív stresszhez vezetnek (lásd Cu és Fenton-reakció). Végezetül makromolekula károsodást és gyulladást váltanak ki, melyek fokozzák a szív és érrendszeri, rákos és degeneratív megbetegedések kialakulásának kockázatát.

Ahogy azt a fenti táblázatból is láthatjuk, nem minden fém járul hozzá egyenlő mértékben a patológiás folyamatok kialakításához. Munkánk során leginkább a szervezetben jelentősebb mértékben felhalmozódó fémek (Cd, Cr, Pb) és az As voltak érdeklődésünk középpontjában. Mivel azonban irodalmi adatok nem egyforma mértékben állnak rendelkezésünkre ezen elemekről, így a dohányzással összefüggésben leginkább vizsgált két fém, a Cd és a Cr példáján mutatjuk be a szervezetre gyakorolt hatásukat.

2.3.2 A kadmium toxicitás, kinetika és metabolizmus

A Cd környezetünk széles körben elterjedt fémjei közé tartozik. Tudjuk, hogy hatékonyabban szívódik fel a tüdőből (25-60%), mint a gasztrointesztinális rendszerből (5-10%). A kadmium belégzés útján történő felvehetősége függ az oldhatóságától, a részecske méretétől, és így a légzőtraktuson belüli lerakódás helyétől. A gasztrointesztinális rendszeren keresztül történő felvétel telítődést mutató folyamat, mivel a felvett mennyiségek csökkennek a dózisok növekedésével. A kadmium felszívódást azonban csökkentheti egyes kétértékű és háromértékű kationok (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cr^{3+}) jelenléte, továbbá növelhetik a Fe (vas) és Ca (kalcium) deficienciák [49].

A Cd széles körben elterjedhet a testben főként a vörösvértestekhez vagy nagy molekula tömegű plazmafehérjékhez kötődve. A vesék és a máj képesek akkumulálni a fémeket, ami a test terheltségének hozzávetőlegesen 50-70%-át teszi ki. Ezen szervekben a Cd felhalmozódás indukálja a MT-k (metallothioneinek) termelését, amelyek megkötik a test Cd tartalmának közel 80-90%-át [47]. Azon egyéneknél, akik krónikus mértékben voltak kitéve a környezeti Cd szennyezettségnek mind táplálkozás, mind dohányzás következtében, a legmagasabb Cd koncentráció a vesék kéregállományában volt mérhető. A születés pillanatában a vesék Cd tartalma alacsony, de ha a kitettség folyamatos marad, a test terheltsége lineárisan növekszik a korrallal, majd hozzávetőlegesen 50 vagy 60 évvel később elér egy plató fázist vagy hanyatlani kezd [48]. A májban szintén alacsony koncentrációban van jelen születéskor, és megközelítőleg 1-2 $\mu\text{g/g}$ -ra növekszik 20-25 éves korra, majd ettől fogva csak lassan növekszik tovább [47].

Klasszikus értelemben vett metabolizmus nem vagy csak kis mértékben történik Cd esetében. Ennek ellenére számos makromolekulához és fehérjéhez képes kötődni [49]. A MT-k például nagy affinitással kötik, ezzel csökkentve toxikus hatásukat. A májban ezek termelése elegendő az összes akkumulálódott Cd megkötésére. A MT-kötött Cd ezt követően a májból kikerül a véráramba. A vese glomerulus filtrációja megtisztítja tőlük a vért, majd a vese tubulusok felveszik azokat, itt a Cd felszabadul. A vesék MT szintézise alacsonyabb, és nem elegendő ahhoz, hogy megkösse az összes szabad Cd-ot. Ez a ROS fokozott termelődéséhez vezet, mely a tubulus károsodással vagy sejtmembrán pusztulással jár [48]. A szájon át bekerülő Cd-nak csak kis része szívódik fel a gasztrointesztinális traktusból, így a dózis nagy része a széklettel együtt kiürül a szervezetből. A belélegzett mennyiségek kiválasztása a vizelettel és széklettel közel azonos mértékű. A Cd-nak folyamatosan kitett

egyének vizeletében kiválasztott mennyiségek a test terheltségével arányosan, fokozatosan növekednek. Azonban a kiválasztott mennyiség csak kis töredéke a szervezet teljes terhének, kivéve akkor, ha nefrotoxicitás következik be, melynek során a vizelet Cd tartalma lényegesen megnő [50], [51].

Patkányokon végzett állatkísérletek során vizsgálták a magzati fejlődésre gyakorolt hatásait is. Azokban az állatokban, amelyek a vemhességet megelőzően és az alatt Cd kitettség alatt álltak, megfigyelhető volt az utódok vázrendszerének abnormalitása, de nem voltak súlyos teratogén hatások [48], [50]. Azon felnőtt hímeknél, amelyek Cd kezelésnek lettek alávetve, csökkent a reprodukciós képesség, amely a spermiumok számának, motilitásának és a herecsatornák sorvadásának tudható be [50]. Néhány adat szerint lehetséges embereknél is, hogy a Cd befolyásolja a magzati fejlődést, de ezek az eredmények nem egyértelműek. Így például a születési testtömegek alacsonyabbak az anya Cd kitettségét követően, de nem fedezhetőek fel az utódokban veleszületett abnormalitások [47], [52].

2.3.3 A króm toxicitás, kinetika és metabolizmus

Az átlagos populációk krómmal szembeni kitettsége a környező levegő belégzésével és az elfogyasztott étel, ital útján valósul meg. Ezeken felül a dohányzás is felelhet a króm szervezetbe kerüléséért [25]. A táplálkozással bekerülő napi normál érték becsült mennyisége körülbelül 0,1 mg. A kedvezőtlen hatásokkal nem járó napi mennyiség felső határértéke 0,15 mg/kg, amely általánosságban 10 mg-ot jelent személyenként [42].

Emlősökben a Cr egy esszenciális nyomelem, ami részt vesz a lipid és glükóz anyagcserében. A vérben a Cr 95%-a nagy molekulású fehérjéhez kötött (pl.: transferrin), míg kisebb arányban a kis molekulású oligopeptidekkel asszociáltan található meg [43]. Ezáltal a Cr vegyületek széles körben szétterjedhetnek a test minden szövetébe. Emberek esetében elsődlegesen a vizelettel választódik ki, kisebb mértékben a széklettel távozik a szervezetből. A szervezet Cr (króm) eliminálásának félféltideje kálium-kromát esetében megközelítőleg 35-40 órára [44].

Akut kitettséget követően a belélegzett Cr elsődleges célpontja a légzőszervrendszer, bár a vesékre, májra és az emésztőszervrendszerre gyakorolt hatásai is ismertek. Akut, magas dózisú Cr bevitel megnyilvánulhat heveny, esetleg halálos kimenetelű légzőszervi, szív és érrendszeri, gasztrointesztinális, májra, vesékre és idegrendszerre gyakorolt hatásban [44-46].

Patkányok és egerek esetében vizsgálták a Cr magzati fejlődésre gyakorolt hatását is.

Nőstény patkányokkal és egerekkel naponta itattak kálium-dikromát tartalmú vizet (37-87 mg/kg és 52-169 mg/kg) 20 vagy 90 napon keresztül a párzást követően. A hosszabb kezelési idővel több generációt is meg tudtak vizsgálni. A hím patkányok és egerek nem voltak Cr-mal kezelve. Az eredmény megnövekedett magzati mortalitást mutatott, mely beágyazódást követő vetélésben, felszívódásban és a csökkent számú életképes magzatban nyilvánult meg. A világra jött utódok fejlettsége pedig nem volt megfelelő fokú. A fejlődésbeli visszamaradás csökkent magzati testtömeggel, csökkent testhosszal, csökkent csontképződéssel, bőr alatti bevérzésekkel és abnormális farokkal járt együtt. Ha a Cr(VI)-t belelegeztették az állatokkal, akkor a több generáción keresztül tartó vizsgálatok sem mutattak semmilyen fejlődésre gyakorolt hatást [44].

2.4 A károsító hatások elleni védekezés lehetőségei

Az előző fejezetekben tárgyalt károsító folyamatok, mint láthattuk a szervezet egészére kiterjedhetnek. Ez alól nem képezhet kivételt az anyaméhben fejlődő magzat sem, hiszen a fejlődő szervezetekre nézve a dohányfüst károsító hatásai sokkal markánsabban képesek érvényesülni. A terhes nők dohányzása tehát egy plusz rizikófaktort jelent a születendő gyermekük egészségi és fejlettségi állapotára való tekintettel. Ezért a fejlődő magzatok védelme érdekében komplex védekező stratégiák alakultak ki. Ennek szerveződése egyfelől igyekszik biztosítani a méhen belüli fejlődés zavartalan lefolyását, másfelől felkészíti, és segíti a megszületendő magzatot a megváltozott körülményekhez való alkalmazkodáshoz. Ez a védelem egyfelől magában foglal egy fizikai védelmet, a méhlepény alkotta szöveti barrier formájában. Továbbá nagyon fontos szerepet játszanak a placenta által szabályozott detoxifikáló rendszerek és antioxidánsok, illetve a terhesség előrehaladtával a magzatban kifejlődő önálló antioxidáns védelmi rendszer is.

2.4.1 A méhlepény felépítése és szerepei a fejlődő magzat védelmében

A méhlepény alapvetően elfogadott szerepe, hogy védőgátat képezzen kezdetben az embrió, később a magzat számára. Képes megakadályozni számos káros anyag áthaladását, és a méhen belül fejlődő szervezet toxikus anyagokkal szembeni kitettségét. Ezen felül a placenta sejtjei által termelt fehérjék részt vesznek a fejlődő magzat számára nem kívánatos anyagok anyai vérkeringésbe történő visszajuttatásában, valamint a méreganyagok visszatartásában és detoxifikálásában is. Azonban előfordul, hogy a méhlepény nem képes

maradéktalanul ellátni ezeket a feladatokat. Napjainkban számos olyan mérgeanyagot és gyógyszerkészítményt ismerünk, amelyek képesek a placentán keresztül eljutni a magzathoz. Sok esetben ennek köszönhető számos vegyület teratogén hatása is [53-55].

A humán méhlepény kialakulását tekintve, az extraembrionális membránok és az anyaméh endometriumának kapcsolatából jön létre. Ebből következően két részre osztható: a magzati és az anyai rész [56].

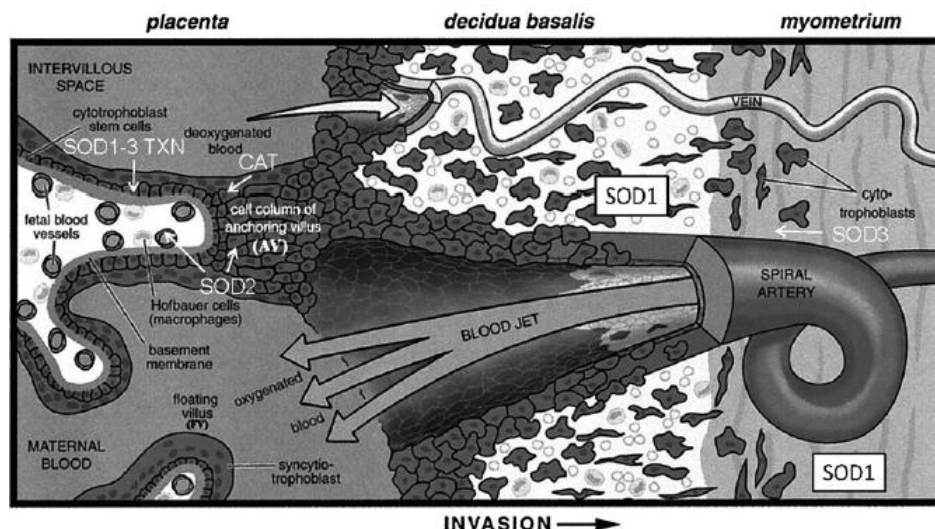
A kémiai anyagok különböző mechanizmusokkal léphetnek át a méhlepényen. Azon mechanizmusokról, amelyek egyes mérgező fémek (Hg, Pb, Cd) méhlepényen belüli toxokinetikáját magyarázzák, igen keveset tudunk. Az Pb esetében a placentába jutás feltételezetten passzív diffúzióval történik [57]. Ismeretes, hogy a béltraktus esetében az Pb és Cd felvételben a divalens fém transzporter 1 (DMT1) játszik szerepet, mely vélhetően a placenta esetében is kulcsfontosságú lehet [58]. A DMT1 fő szerepe a vas felvétel, és nagymértékben expresszálódik a humán méhlepényben a terhesség egésze során [59], [60].

A MT-ek fontos szerepet töltenek be a fémek homeosztázisának szabályozásában. Ezt a tulajdonságukat szokatlanul magas cisztein tartalmuk biztosítja [61]. A humán placenta metallothioneinjei jelen vannak a szinciciotrofoblaszt és a korion bolyhok közötti sejtekben, ahogyan a magzat amniotikus és az anya deciduális sejtjeiben is [62]. A Cd esetében kimutatták, hogy a méhlepényben mérhető szintje korrelál a MT expresszióval [63]. A Cd-nak kitett bolyhok rétege és a magzati endotél sejtek több MT-t expresszálnak, mint a trofoblaszt sejtek, amelyek ezáltal sokkal érzékenyebbek. [64]. Ennélfogva a méhlepény metallothioneinjeinek Cd kötése lényegesen lecsökkenti a magzatba való bekerülés lehetőségét. Nem teljesen tisztázott, hogy milyen módon valósulhat meg a fémek méhlepényből történő kiáramlása. Kísérletes bizonyítékok azt az elméletet támasztják alá, miszerint a fémek lehetőség szerint a glutationhoz (GSH) kötnek. Az így kialakult komplexek aztán kijuthatnak a sejtekből az ABC transzporter család képviselőin keresztül [66]. Emellett számos olyan fehérjét azonosítottak patkány méhlepényben, például szerves anionokat transzportáló polipeptideket, szerves anion transzportereket, és cink-transzportereket, amelyek akár részt vehetnek a humán placenta fém forgalmában is [67]. Az első trimeszter során a fejlődő magzat csak annyi oxigénnel kerülhet kapcsolatba, amennyi elengedhetetlenül szükséges a fejlődéséhez. Ez azt vonja magával, hogy a terhesség korai szakaszában még nincs szükség teljes mértékben fejlett antioxidáns védekező rendszerre. Így a terhesség első hónapjaiban az antioxidáns enzimek alacsony aktivitásúak, és a GSH koncentráció is

alacsony, különösen a szinciciotrofoblasztban. A terhesség 8. hetétől kezdődően az antioxidáns enzimek aktivitása (CAT, GPx, Mn-SOD, Cu/Zn-SOD) megnő a méhlepény szöveteiben.

A MT-ek nem csak a fém homeosztázis szabályozásában vesznek részt, hanem antioxidáns tulajdonságokkal is rendelkeznek. A MT-ek nem javítják ki az oxidatív stressz okozta zavarokat, de expressziójuk kritikus szereppel bír a súlyos oxidatív stressz indukálta apoptózis kivédésében. Ezáltal a MT-ek egyfajta antiapoptotikus antioxidánsként foghatók fel [68]. A rendelkezésre álló adatok azt mutatják, hogy a méhlepény valószínűsíthetően csak részleges védelmet nyújt a Cd szemben, annak ellenére, hogy ez a fém igen hatékonyan képes indukálni a placenta MT fehérjéit. Habár a magzat így védettebb lehet a közvetlen kitettséggel szemben, a Cd tárolása a méhlepényben önmagában sem előnyös, mivel ez a fém kedvezőtlen módon befolyásolja a méhlepény funkcióit. Jelenlegi ismereteinkben nagy hiányosság, hogy nem ismerjük a fémek placentális transzfer mechanizmusait, annak ellenére, hogy vannak fémek (pl. Cd, Hg), amelyek átkerülhetnek a magzati oldalra. Ezen felül az ebben résztvevő transzporter és enzim fehérjék placentán belüli elhelyezkedéséről is keveset tudunk egyelőre.

Az antioxidáns rendszer fejlődésének magába kell foglalnia a terhesség karbantartásában szerepet játszó redox jelátvitelt is méh-méhlepény-magzat kapcsolatokon keresztül, mivel a méhlepény a gázcsere magzati szerve [69]. Ahogy más szervrendszerekben is, itt is van bizonyíték az antioxidáns enzimek térbeli és időbeli szabályozására. Ez összefüggésben van a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) általi lokális NO termeléssel, illetve a placenta *downstream* NO-függő jelátvitelével, mely kritikus mértékben fontos az erek normál fejlődését tekintve. Az antioxidáns enzimek expressziója általában növekszik a fejlődő magzatokban a terhesség előrehaladtával [70].



1. ábra: A méhlepény antioxidánsainak térbeli és időbeli expressziója

A Cu/Zn-SOD, Mn-SOD és EC-SOD egyaránt expresszálódik a citotrofoblasztban, a tioredoxinnal (TXN) együtt. A terhesség végére a Cu/Zn-SOD bőségesen előfordul a miometriumban, ahogy a szinciotrofoblasztban és a decidua basalis-ban is. A Mn-SOD kifejeződése is hasonló, kivéve, hogy a magzati korionbolyhok endotéliumában magasabb szinten figyelhető meg. A kezdetben intracellulárisan expresszálódó EC-SOD bőségesen fordul elő a bolyhok trofoblasztjában az első trimeszter idején, de a 17. hetet követően visszahelyeződik a bolyhokon belüli extracelluláris mátrixba. Mivel a SOD expresszió támogatja a nitrogén-monoxid biológiai hozzáférhetőséget és az érképzés szignálját, lehetséges, hogy a kezdetben intracellulárisan expresszálódó EC-SOD is fontos a méhlepény korai érfejlődésében. A CAT pedig a trofoblasztban található meg, és a terhesség előrehaladtával mennyisége fokozatosan nő [71].

2.4.2 A fejlődő magzat antioxidáns védelmi rendszerének szerepe és érése

Normál körülmények között, létezik egy finoman szabályozott egyensúly a ROS termelés és az antioxidáns védekező rendszer között, amely a sejtek védelmét biztosítja *in vivo* körülmények között. A ROS megnövekedett szintje származhat számos olyan körülményből, amely érintheti az újszülött gyermekeket, úgymint hiperoxia, reperfüzió, gyulladások vagy nem megfelelő antioxidáns védelem.

Mivel a terhesség időtartama és a születési súly kritikus mérőszámai a túlélésnek és a gyermek későbbi fejlődésének, tekintettel a növekedésre, morbiditásra, az intellektuális képességekre, így az újszülött antropometria és a nehézfémekkel szembeni kitettség közötti kapcsolatok különleges odafigyelést érdemelnek [65]. A koraszülött gyermekek különösen érzékenyek a ROS indukálta károsodásokra mivel az antioxidáns védelmi rendszer a terhesség 3. trimeszterében éri el a megfelelő szintet, illetve a képességük a fokozott antioxidáns szintézisre hiperoxias és más oxidáns hatásokra hiányos [72].

A születés magában is jelentős oxidatív stresszt jelent, de a terhesség körülményei és a

születés módja is hatással van az oxidatív terheltségre [73], [74]. Az érett magzatokat világra hozó anyák esetében a vörösvértestek GSH tartalma emelkedett, míg a magzatok vörösvértesti GSH fogyasztása jelentősen alacsonyabb mértékű volt. Ezzel szemben az éretlen magzatokban felhasználásra kerültek a plazma antioxidánsok, amint azt a magzati nem-enzimatis tartalék fogyasztásának megduplázódása is mutatta. Ez a jelenség leginkább a köldök artériák alacsony totál gyökfogó antioxidáns képességének tudható be, ha ezt összevetjük érett és éretlen magzatok között. Továbbá rendelkezésre állnak olyan irodalmi adatok, melyek vizsgálták a teljes ROS produkciót és a totál antioxidáns potenciált (antioxidáns enzimek és nem-enzimatis antioxidánsok) éretlen csecsemőkben, összevetve érett kontrollokkal [74]. Ahogyan az várható volt, az éretlen csecsemők jelentősen kisebb antioxidáns potenciállal rendelkeznek az érett csecsemőkhöz képest.

A humán területeken végzett tanulmányok következetesen azt mutatják, hogy megnövekedett ROS produkció következik be az éretlen csecsemők esetében, és ez összefüggésben áll az antioxidáns enzimek alacsony koncentrációjával és az aktivitásuk relatív hiányával. Például a vizeletben található 8-hidroxi-20-dezoxiguanozin, amely érzékeny markere az oxidatív stressznek, jelentősen magasabb volt éretlen csecsemőkben az érettekhez viszonyítva [75]. A SOD és GPx aktivitások esetében is jelentős csökkenés volt tapasztalható éretlen újszülöttek esetében. Habár a szelén szintek mindkét csoportban összehasonlíthatóak voltak (és a Se pótlás nem csökkentette a ROS-indukálta tüdőszérelést), a plazma Cu és Zn koncentrációi szignifikánsan alulmaradtak azon értékekhez képest, melyek az érett csecsemők esetén voltak tapasztalhatóak [76].

Az adatok azt jelzik, hogy a keringő antioxidáns enzimek aktivitásai és a velük összefüggésben lévő elemek (Se, Cu, Zn) koncentrációi alacsonyak az éretlen újszülöttekben. Ez megfigyelés összhangban áll a megnövekedett ROS képződéssel. A fejlődő magzat minden sejttípusában megfigyelhető a Mn-SOD expressziója, legintenzívebb mértékben a hörgőcskék epitéliumában és a korai II-es típusú pneumocitákban. A koncepció, miszerint az éretlen újszülöttek Mn-SOD indukáló képessége jelentősen hiányos, magyarázhatja a megnövekedett érzékenységet a ROS-indukálta tüdőszérelésekkel szemben [77].

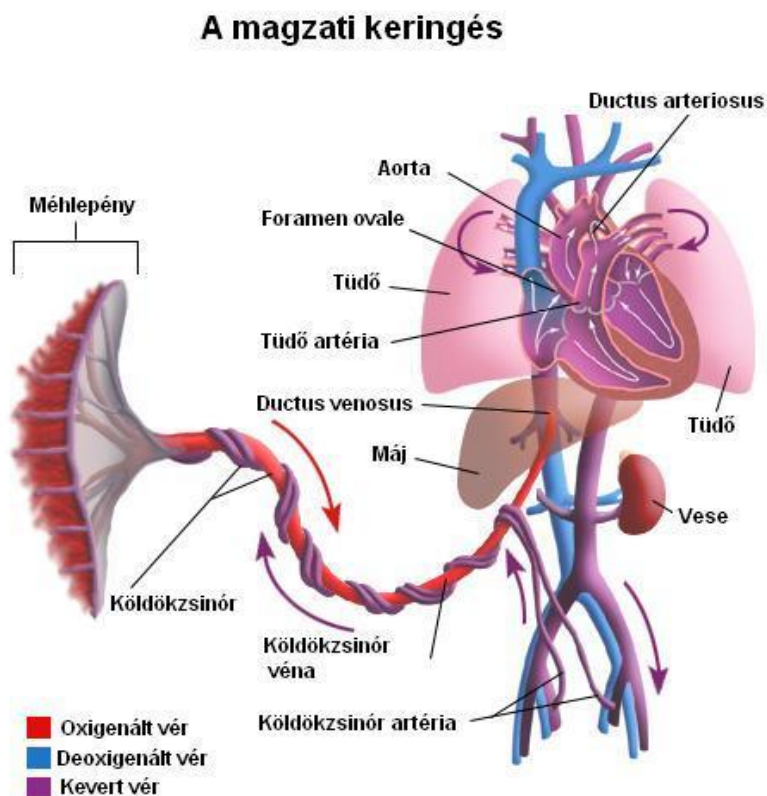
Mindezek felül az oxidatív stresszel szembeni ellenállás nem-enzimatis útvonalakra is támaszkodik. Ezt a funkciót számos biológiai vegyület foglalja magába, úgymint GSH, TXN, A-, C- és E-vitamin, polifenolok, bizonyos nyomelemek és így tovább. Az A-, C- és E-vitaminok fontos faktorai a fiziológiás körülményeknek és az antioxidáns

védekezésnek egyaránt [78]. Az A-vitamin szerepe inkább közvetett a retinol-kötő fehérjére és a retinsav receptorra gyakorolt hatása miatt, mintsem direkt antioxidáns szereppel bírna. Éretlen újszülöttek esetén a szérumban A-vitamin szintek következetesen redukáltnak mutatkoznak [79]. Az A- és E-vitaminok szintje a köldökvérben jelentősen alacsonyabb az anyai értékekhez képest. Ezzel ellentétben a vízoldékony C-vitamin koncentráció magasabbnak mutatkozik a köldök vértében ($P < 0.05$). Szignifikánsan magasabb A-, E- és C-vitamin szinteket találtak érett újszülöttekben az éretlenekhez viszonyítva, pozitív korrelációval az anyai és a köldök vértében A és E-vitamin szintjei között. Ez megerősíti azokat a tanulmányokat, amelyek azt mondják, hogy az éretlen csecsemők szérumban kisebb mértékben tartalmaz antioxidáns vitaminokat, az érett kontrollokhoz viszonyítva [80]. A peroxiredoxin (Prx) szintén fontos antioxidáns enzim, amely redukálja a H_2O_2 -t molekuláris oxigénné redukált tioredoxinon keresztül. Ez párhuzamosan működik a GSH újrahasznosítással, a GR-on keresztül [77]. Ez összefügg azzal a megfigyeléssel, hogy a tüdő Prx mRNS szintje specifikusan megnövekszik oxigén kitétség hatására [81]. Bárányokon végzett kísérletekkel kimutatták, hogy az oxidált glutation (GSSG) szintjei erősen korrelálnak az oxigén parciális nyomásával (PaO_2), vértében. A GSH/GSSG arány pedig nőtt az oxigénnek való kitétség csökkenésével. Az éretlen alanyok nagymértékű oxigén kitétség hatására jelentősen megnövekedett lipid hidroxid és mieloperoxidáz aktivitást mutattak, de jelentősen kisebb volt a SOD, CAT, GPx aktivitás a tüdejükben. Az antioxidáns enzimaktivitások pedig fordítottan korreláltak alveoláris PaO_2 -sal [82]. Ezen adatok alapján látható, hogy az éretlen magzatok valószínűleg nem képesek a hirtelen fellépő hiperoxiára egy megfelelő antioxidáns enzim indukcióval reagálni, mely így ROS termeléshez és tüdőszűréshez vezet [77].

2.5 A köldökzsinór felépítése és funkciói

A köldökzsinór a fejlődő magzatot a placentához köti a tápanyag felvétel, salakanyag leadás és gázcseré érdekében [83]. Ez a helikális struktúra felelős az anya és magzata közötti véráramlásért. A teljes hossza átlagosan 50 – 60 cm, átmérője 1,5 – 2 cm, spirális lefutású. A harmadik trimeszter végén a benne áramló vér sebessége 500 – 700 ml/perc között változik [83-85]. A köldökzsinór tartalmaz két artériát, egy vénát és a Wharton-kocsonyát, mindezt az amnionnal, azaz a magzati végen többrétegű keratinizált epitéliumba burkolva [86]. A két köldök artéria oxigénben szegény vért szállít a magzat felől a méhlepénybe, miközben

oxigénben dús vér áramlik vissza a nagyobb méretű köldök vénán keresztül [83].



2. ábra: A humán magzati keringés vázlata

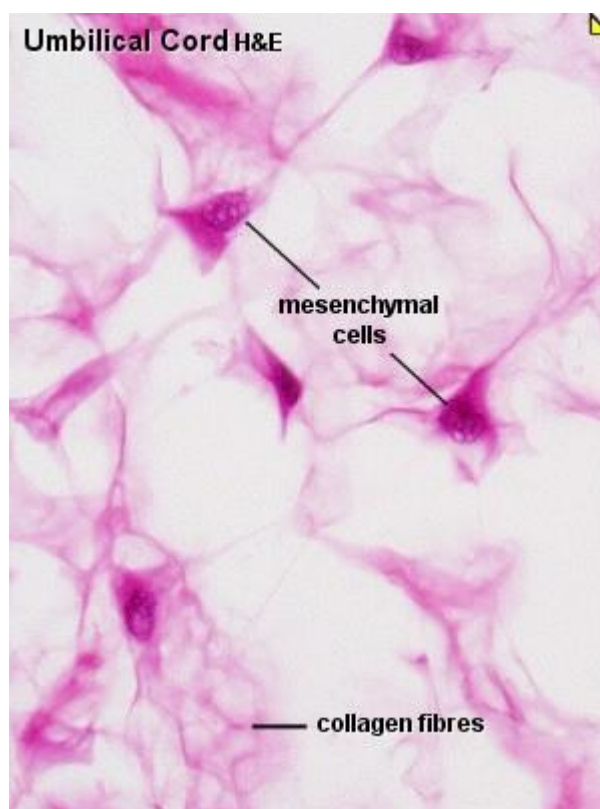
A köldökvéna a máj előtt két ágra oszlik. Egyik ága közvetlenül a májba szállít oxigénben dús vért, kevert vért juttat a jobb pitvarba, a foramen ovalen keresztül a bal pitvarba és kamrába, ahonnan aztán különböző mértékben oszlik el a kevert vér a test szövetei között. Az elhasznált vér a két köldökartérián keresztül hagyja el a magzatot, mely a köldökszinóron át a méhlepénybe jut, ahol ismételt felfrissül.

Forrás: <http://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?ContentTypeID=90&ContentID=P02362>

A Wharton-kocsonya egy specializálódott kötőszövet, ami miofibroblasztokat tartalmaz, beágyazva egy extracelluláris mátrixba. Ez a mátrix egymásba fűződő kollagén rostokból és összefonódott rostnyalábokból áll, ami magába foglalja a köldökszinór ereket, így megvédve őket a csavarodástól, összenyomódástól a terhesség és a szülés során [87-89]. A kötőszövet alapja főként hialuronsavból (70%), valamint szulfatált glükózaminoglikánból és proteoglikánból (30%) tevődik össze, sók, metabolitok és plazmafehérjék vizes oldatában [90]. A hialuronsav nagy mennyiségben képes vizet megkötni, ezért lényeges szerepe van a szövetek közötti transzport folyamatok dinamikájában és az ozmotikus nyomás kialakításában [91]. A miofibroblasztok funkciója többretn. Egyrészt felelősek a fibrogenézisért, másrészt pedig biztosítják a kontraktilitást, valamint a terhesség során növekvő mértékben termelnek I-

es, II-es és V-ös típusú kollagén rostszálakat. A Wharton-kocsonya ezáltal elasztikus és kontraktilis tulajdonságokra tesz szert [84], [92].

Fénymikroszkópos képen (3. ábra) látható, hogy a Wharton-kocsonya fibroblaszt szerű sejtekből áll, amelyek orsó vagy csillag alakúak, hosszú citoplazmatikus nyúlványokkal. Ezek a sejtek, az alapként szolgáló hullámos kollagén rostok alkotta hálózatba vannak ágyazódva. A sejtek körülveszik a köldökzsinór ereit is. Az ér körüli területeken sűrűn, míg az amniotikus epitélium környékén lazábban helyezkednek el. A sejteket határoló membránok ugyan nehezen elkülöníthetőek, viszont a megnyúlt vagy ovális sejtmagok jól láthatóan kiemelkednek az acidofil citoplazmából [93].



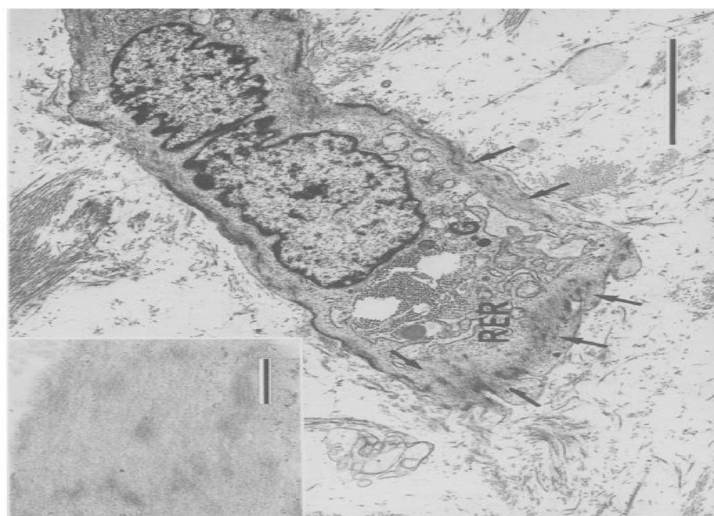
3. ábra: Hematoxilin és eozin festett fénymikroszkópos kép a Wharton kocsonyáról

A fibroblaszt szerű sejteket (mesenchymal cells) bőségesen körbeveszik a kollagén rostok (collagen fibres).

Forrás: <http://lecanabiculteur.free.fr/SITES/UNIV%20W.AUSTRALIA/mb140/CorePages/Connective/Images/umb41he.jpg>

A sejtek az erek körül bőségesen, míg a periféria felé haladva ritkábban fordulnak elő. A periférián elhelyezkedő sejtek hosszabb és több citoplazmatikus nyúlvánnyal rendelkeznek a perivaszkuláris sejtekhez képest. A szintetikus aktivitásukat bizonyítja az elektron mikroszkópos képeken látható jól fejlett durva felszínű endoplazmatikus retikulum, a számos

mitokondrium és Golgi apparátus megléte (4. ábra) [93].



4. ábra: A Wharton-kocsonya elektron mikroszkópos képe

A nagy ábrán, nyilakkal jelölve láthatóak a különböző denzitású mikrofilamentum kötegek a sejtek periferiáján. Az extracelluláris terek kollagén fibrillumokból és amorf glükózaminoglikán mátrixból állnak (7000x nagyítás, lépték=5 μm). A bal alsó kis képen a mikrofilamentum állomány részletei láthatóak, benne az amorf, denz állományokkal (30000x nagyítás, lépték= 0,5 μm) [93].

Néhány olyan esetben, mint például a dohányzás [94], koraszülés és a születés miatti magzati stressz [95], megfigyelték a Wharton-kocsonya mennyiségének megváltozásait. A Wharton-kocsonya köldökzsínér erek körüli hiányát írták le perinatális elhalálásokkal összefüggésben [96], míg a Wharton-kocsonya megnövekedett mennyisége volt megfigyelhető diabétesz esetében [97]. A vékony köldökzsínér jelenléte a terhesség folyamán, a fejlődő magzatot kiteszi a korlátozott növekedés, alacsony testtömeg és a gesztációs időhöz viszonyított alacsony percentilis értékek hordozta kockázatoknak [98].

Mindezen felül kísérletes és klinikai bizonyítékok azt mutatják, hogy a Wharton-kocsonya metabolikusan aktív szereppel bír a terhesség során. A módosulások a mennyiségében és az összetételében számos, terhesség során bekövetkező patológiás állapottal hozhatóak összefüggésbe, mint például magas vérnyomás [99] vagy gesztációs diabétesz [97]. Az ilyen jellegű kutatások rámutattak arra, hogy a Wharton-kocsonya és annak állapota az egyik legfontosabb köldökzsínér paraméter a terhesség második és harmadik trimeszterében [98].

3. Célkitűzés

Vizsgálataink célja elsőként arra irányult, hogy a dohányzás és az újszülöttek születési paraméterei között összefüggést találjunk. Ezt követően kíváncsiak voltunk arra, hogy van-e a köldökzsinórban kimutatható fém felhalmozódás, és ha igen, akkor találunk-e valamilyen különbséget a köldökzsinór erei (artériák, véna) között, esetlegesen a Wharton-kocsonya és az erek között. Végül pedig megvizsgáltuk, hogy a fentiek tükrében milyen összefüggések állapíthatóak meg a dohányzás és a kiváltott károsodás, valamint az újszülöttek antioxidáns státusza között.

4. Anyagok és módszerek

4.1 A beteganyag

A munkánk során az SZTE Szülészeti- és Nőgyógyászati Klinikáján 2013. november és 2014. szeptember között, 52 dohányos anyától született újszülöttből származó köldökzsinórt vizsgáltunk. Az összehasonlításaink alapjaként nem dohányzó anyáktól származó normál újszülöttek köldökzsinórait használtuk kontrollként (n=24). Vizsgálatainkat a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Regionális Humán Orvosbiológiai Kutatásetikai Bizottságának engedélyével (149/2012.) végeztük. A kapott köldökzsinór mintákat azonnal, vagy nem sokkal a szülést követően hűtve a laboratóriumba szállítottuk, ahol azokat rövid időn belül feldolgoztuk, illetve a felhasználásig -80°C-on tároltuk.

4.2 A vizsgálati csoportok kialakítása

A mintákkal egyidőben megkaptuk az újszülöttek születési paramétereit is. Ezek alapján a dohányos mintákból különböző vizsgálati csoportokat hoztunk létre. Elsőként a gesztációs idő alapján alakítottunk ki két csoportot. Az egyik csoportba tartoztak azon újszülöttek, akik a 37. gesztációs hetet megelőzően jöttek a világra, tehát koraszülöttek voltak. A másik csoportba pedig azok kerültek, akik a 37. gesztációs hetet követően jöttek világra, azaz érett újszülöttek voltak. A másik szempont, amely alapján csoportosításra kerültek az a korukhoz mért születési súlyuk. Ezt az állapotot az úgynevezett percentilis táblázat segítségével tudtuk meghatározni, amely nyomon követi az adott életkorhoz tartozó „normál”

testsúly változásait. Ez alapján az újszülötteket ismételtén két csoportba soroltuk. Az első kategóriába azok az újszülöttek kerültek, akiknek a születési súlya 50 percentilis alatti, azaz alacsonyabb, mint az azonos gesztációs időre született újszülöttek 50%-áé. A másik csoportba azon újszülötteket soroltuk, akiknek születési súlya az 50 percentilis értéket meghaladta. A dohányos mintákon azon újszülöttek köldökzsinór mintáit értjük, akiknek az édesanyja saját bevallása szerint is napi fél doboz vagy több cigarettát szívott el a terhesség során. A kontroll csoportból és így a további vizsgálatokból automatikusan kizárásra kerültek azon minták, ahol az anyák dohányzási szokásai nem voltak pontosan megítélhetőek saját bevallásuk alapján.

4.3 A minták feldolgozása

A mintákat hűtött (4°C-os) PBS-el mostuk, a vért eltávolítottuk az erekből injekciós tű segítségével. Ezt követően egy hozzávetőleg 1 cm hosszú darabot 24-48 óráig 4%-os paraformaldehidben (PFA) fixáltunk. Ezeket később a hisztológiai és immunhisztokémiai metszetek készítéséhez használtuk fel. A metszetkészítéseket megelőzően, krioprotekció céljából a mintákat 30%-os, azidos szukróz oldatban tartottuk két napon keresztül (naponta cserélve az oldatot) 4°C-on. A köldökzsinór minták egy másik darabjából kipreparáltuk az ereket (artériák, véna), valamint eltávolítottunk belőlük annyi Wharton-kocsonyát, amennyit tudtunk. Ezeknek egy részét elküldtük fémmérésre, a másik részéből pedig megtörtént az RNS preparálás, melyet később a PCR és qPCR reakciókhoz használtunk fel.

4.4 A minták fémtartalmának meghatározása

Az előkészített köldökzsinór mintáinkból hozzávetőlegesen 0,6 g-nyi mennyiséget küldtünk el fémmérésre. A mérést az SZTE Növénybiológiai Tanszékén végezték. Az egy-egy mintában jelen lévő fémek mennyiségi meghatározását induktív csatolású plazma atomemissziós spektrometria módszerével (ICP-AES) végezték el. A detektáláshoz Jobin-Yvon 24 típusú argon spektrométert használtak, Teflon V-groove párologtatóval és Gilson Minipuls 3 perisztaltikus pumpával. Ennek a vizsgálatnak a lényege, hogy hő hatására gerjesztődnek a fém ionok, és mikor visszatérnek nyugalmi, stabil állapotba, akkor egy meghatározott, csak az adott ionra jellemző hullámhosszúságú fotonsugárzást bocsátanak ki. Ez a technika tehát alkalmas az ionok nagy érzékenységgű minőségi és mennyiségi meghatározására is. Mivel a detektált hullámhossz a fémion fajtáját mutatja meg, a fotonok mennyisége pedig arányos a fémionok mennyiségével. Tehát röviden összefoglalva ez a

berendezés a befecskendezett mintát gerjesztési állapotig felhevíti, majd a gerjesztett ionok által kibocsátott hullámhosszt megfelelő detektorral érzékeli [100].

4.5 Hisztológia: metszetek készítése és Schiff-festés

A PFA-ban fixált, cukorral telített mintákból a SZTE – ÁOK Anatómiai, Szövet – és Fejlődéstani Intézetében fagyasztott metszeteket készítettünk. A fagyasztott metszetek Leica CM1850 típusú kriosztáttal készültek, OCT-be ágyazva, 10 és 25 μm vastagságban, -25°C -on. Minden tárgylemezre három-három metszet került. A további munkát megkönnyítendő speciális Superfrost ultra plus (Thermo Scientific) tárgylemezeket használtunk. A 10 μm -es metszeteket immunhisztokémiához, míg a 25 μm -es metszeteket egyszerű hisztológiai festésekhez használtuk fel. A metszeteket a további felhasználásig -20°C -on tároltuk.

A festéseket megelőzően a metszeteket hagytuk felengedni szobahőmérsékleten, majd ezt követően hideg desztillált vízzel mostuk őket néhány pillanatig. A rövid mosást a minták rendkívül magas hialuronsav tartalma indokolja, amely sok vizet képes megkötni, ami megnehezíti a további munkát. Szárítást követően Schiff-reagenssel 30 percig inkubáltuk őket szobahőmérsékleten, sötétben. A Schiff-reagenst Lillie R. D. protokolla szerint készítettük [101]. A 30 perces inkubációt követően a mintákat 5 percen keresztül ismételtén mostuk hideg desztillált vízzel, majd szobahőmérsékleten szárítottuk. A száraz metszeten ezután sejtmagi/kontúrfestést hajtottunk végre általunk készített Mayer-féle timsós hematoxilinnal (Sigma-Aldrich) 1 percen keresztül vagy 100x-ra hígított 50%-os toluidin kék oldattal 30 másodpercig (Sigma-Aldrich). A festés működésének hátterében az áll, hogy a LP során az egyes sejtkomponensek glikol tartalmának egy része aldehiddé oxidálódik. A pararosanilin (fukszin) tartalmú Schiff-reagenssel való reakciót követően megjelenik egy pararosanilin addukt, amely ezen komponenseket megfesti. Ennek eredményeként a LP-ra utaló részek a metszeten, azaz a Schiff-pozitív összetevők rózsaszín-vörös árnyalatúak lesznek. A kontúrfestés eredményeként a sejtmagok kékre festődnek [102].

A metszeteket Nikon Eclipse 80i mikroszkóppal vizsgáltuk 10x-es és 20x-os objektív alatt. A képeket QImaging RETIGA 4000R kamerán keresztül, Capture Pro 6.0 szoftverrel készítettük. Az elkészített képeket ImageJ program segítségével elemeztük.

4.6 Immunhisztokémia

A -80°C-on tárolt metszetek immunhisztokémiai kezelését nedves kamrában végeztük. A folyamat 2 napot vett igénybe. Az első napon a metszeteket 2-szer 5 percen át mostuk 0,05 M-os PB-ben. Ezek követően előinkubációt végeztünk Tritonos PAV (normál szérum hígító) jelenlétében 30 percig. Az előinkubációra használt oldat 5 ml-e tartalmazott 5 mg BSA-t, 500 µl normál kecske szérumot (goat serum), 4,5 ml 0,05 M-os PB-t, valamint 0,1%-nyi Triton X-100-at.

A CASP3 elsődleges ellenanyagot (rabbit) 1:100-szoros hígításban alkalmaztuk, és overnight inkubáltuk (Cell Signaling). A második napon a nem kötődött antitesteket 3-szor 10 percig tartó, 0,05M-os PB-vel történő mosással távolítottuk el a metszetekről. Ezek után hozzáadtuk az Alexa Flour 488 flouorórral konjugált, 1:200-szoros hígításban alkalmazott másodlagos ellenanyagot (anti-rabbit), majd 4 órán át inkubáltuk a mintáinkat (Life Technologies). Végül ismételten 3-szor 10 percig tartó 0,05M-os PB-vel való mosás után, glicerinnel fedtük le a lemezeket.

A metszeteket Nikon Eclipse 80i mikroszkóppal vizsgáltuk 20x-os és 40x-es objektív alatt. A fluoreszcens mikroszkópiához a fényforrást Nikon gyártmányú nagy nyomású higany lámpa biztosította. A képeket Qimaging RETIGA 4000R kamerán keresztül, Capture Pro 6.0 szoftverrel készítettük. Az elkészített képeket ImageJ program segítségével elemeztük.

4.7 PCR vizsgálatok

A fagyasztott köldökszínór mintáinkból származó artériákból, vénákból, Wharton-kocsonyából és teljes köldökszínór darabokból hozzávetőlegesen 100 mg-ot dörzsmozsárban folyékony nitrogénben összetörtünk, majd RNA Bee oldatban (Tel-Test Inc.) elhomogenizáltuk (~ 2 perc, 1500 rpm) és a gyártótól származó instrukciókat követve össz-RNS-t preparáltunk. A homogenizátumokat 2-3-szor kloroformmal extraháltuk és centrifugáltuk (15 perc, 13500 rpm, 4°C), majd a vizes fázisból 0,75 térfogatnyi jéghideg izopropanollal kicsaptuk az RNS-t. A csapadékot centrifugálással gyűjtöttük össze (5 perc, 15000 rpm, 4°C), 75%-os etil-alkoholban mostuk (-20°C, éjszakán át), majd DEPC-vel (dietil-pirokarbonát) kezelt desztillált vízben oldottuk fel.

Az RNS koncentráció meghatározást a NanoDrop-1000 spektrofotométerrel végeztük. A számoláshoz azt az összefüggést használtuk, mely szerint $A_{260} = 1 = 40 \mu\text{g/ml}$ RNS. Akkor

tekintettük a mintát megfelelő tisztaságúnak, ha az A_{260}/A_{280} arány 1,8-nál nagyobb volt.

A kapott totál RNS-t további felhasználás céljából átírtuk cDNS-sé RT (reverz transzkripció) reakció során. A cDNS szintézis 5 μ g totál RNS-ből kiindulva 20 μ l végtérfogatban történt. A templát RNS-t 500 pmol random hexamer primer jelenlétében 90°C-on denaturáltuk, majd 200 unit Maxima H Minus reverz transzkriptáz, 200 pmol dNTP keverék és 1 x RT reakció puffer elegyében 10 percig 37°C-on, ezt követően 60 percig 52°C-on inkubáltuk, majd -20°C-on tároltuk.

A szemikvantitatív PCR amplifikálásokhoz templátként az RT reakció termékekből 1 μ l-t használtunk fel reakciónként 25 μ l-nyi 2 x DreamTaq Green PCR Master Mix-ben. Az amplifikációt PTC 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) készülékkel végeztük. Az amplifikáció ciklusszáma előzetes kísérletek alapján határoztuk meg. Az annealing hőmérséklet és az egyes ciklusok száma az adott primer pár függvénye volt, a szintézis lépésének idejét pedig az amplifikált termék várható hossza határozta meg.

Eredményeink megerősítéséhez kiválasztott mintákon valós idejű (Real-Time) qPCR-t végeztük. Az amplifikálásokhoz templátként az RT reakció termékekből 1 μ l-t használtunk fel reakciónként Luminaris Color HiGreen Low ROX qPCR Master Mix-ben, 20 μ l-nyi végtérfogatra számolva. Az Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies) készülék programja segítségével 40 ciklus során a következő reakció ment végbe: 10 perc 95°C-on, denaturálás 15 másodperc 95°C-on, *annealing* 60 másodperc 63°C-on, szintézis 60 másodperc 72°C-on, olvadási görbe szerkesztése 60-95°C között. A vizsgált mRNS mennyiségét a 18S rRNS-re normalizáltuk, és a számításokat $\Delta\Delta C_t$ módszer [103] alapján végeztük.

A dolgozatban bemutatott eredményekhez használt primereket ismert szekvenciák alapján terveztük. Az M55188 szekvencia alapján: RATMT: F: 5' ATG GAT CCC AAC TGC TCC TG 3', NM_175617.3 szekvencia alapján: HMT1: R: 5' GTT CCC ACA TCA GGC ACA GC 3', X97260.1 szekvencia alapján: HMT2: R: 5' CGG TCA CGG TCA GGG TTG TAC 3'. A 18S rRNS primereket az X03205.1 szekvencia alapján terveztük. 18S rRNS: F: 5' GAA ACG GCT ACC ACA TCC AAG G 3', R: 5' CCG CTC CCA AGA TCC AAC TAC G 3'.

4.8 Géldokumentáció

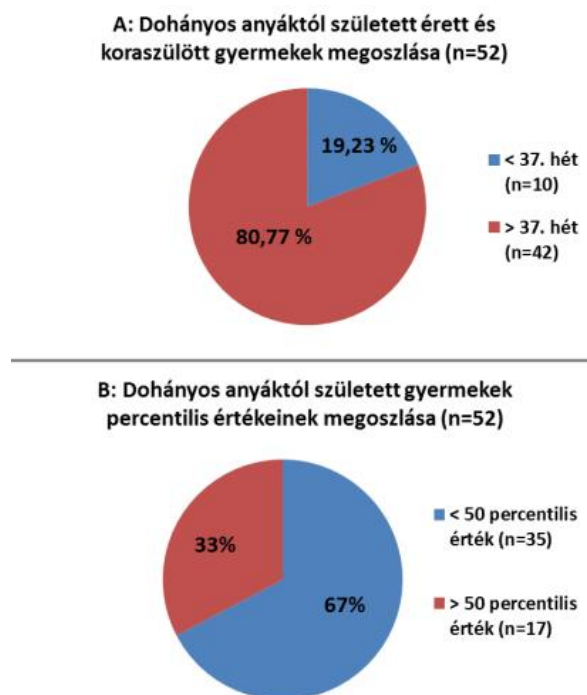
A szemikvantitatív PCR reakció termékeit 2%-os agaróz gélen (Sigma, USA) futtattuk meg. Az ethidium-bromiddal festett géleket UVP High Performance UV Transilluminator

GDS 7500 típusú gél dokumentációs rendszerrel digitalizáltuk és a GelBase/GelBlot™ Pro Gel Analysis szoftver (Ultra Violet Products Ltd.) segítségével kiértékeltek.

5. Eredmények és megbeszélésük

5.1 Születési paraméterek alapján történő csoportosítások

A dohányos édesanyáktól származó újszülötteket (n=52) a születési hét és születési súlyuk alapján két-két csoportba osztottuk. Így a születési hét alapján megkülönböztetünk érett (> 37. gesztációs hét) és koraszülött (< 37. gesztációs hét) gyermekeket, a születési súlyuk alapján pedig normál súlyú (> 50 percentilis érték) és a kissúlyú (< 50 percentilis érték) újszülötteket (5. A, B ábra).

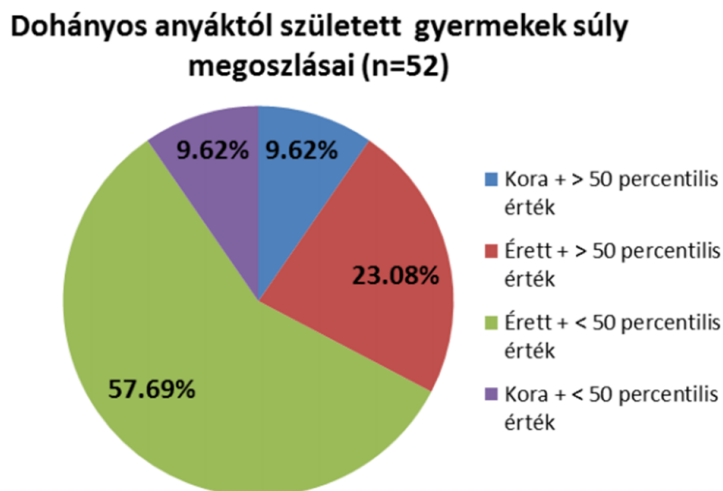


5. ábra: A dohányos anyáktól született gyermekek születési ideje (A), és az 50 percentilis értékekhez viszonyított megoszlásai (B)

A dohányos édesanyáktól született gyermekek nagy része (n=42) időre született. Ha figyelembe vesszük ezen újszülöttek súlyát is, láthatjuk, hogy a normál súlyú újszülöttek száma (n=17) alacsonyabb, mint az átlaghoz mérten kisebb súlyú gyermekek száma (n=35).

Ezen nagy különbségek miatt kíváncsiak voltunk arra is, hogy az érett újszülöttek és a

koraszülöttek számát milyen arányban osztja meg a koruknak megfelelő átlag fejlettség alakulása (6. ábra).



6. ábra: A dohányos anyáktól született gyermekek születési ideje és az ehhez tartozó 50 percentilis értékhez viszonyított súlyuk együttes alakulása

Ahogy az ábra is mutatja a koraszülöttek fele-fele arányban voltak normál és kis súlyúak. Ezzel szemben az időre született gyermekek körében hozzávetőlegesen kétszer olyan gyakran fordulnak elő az 50 percentilis alatti értékkel született gyermekek.

Ezek az adatok közvetve alátámasztják azon szakirodalmi megállapításokat, melyek szerint a terhesség alatti dohányzás negatívan befolyásolhatja a magzat fejlődését. Ez a károsító hatás függetlennek látszik attól, hogy a gyermekek világrajövele a 37. gesztációs hét előtt vagy után történik, azaz hogy koraszülött vagy érett újszülöttről beszélünk-e.

5.2 A fémmérések

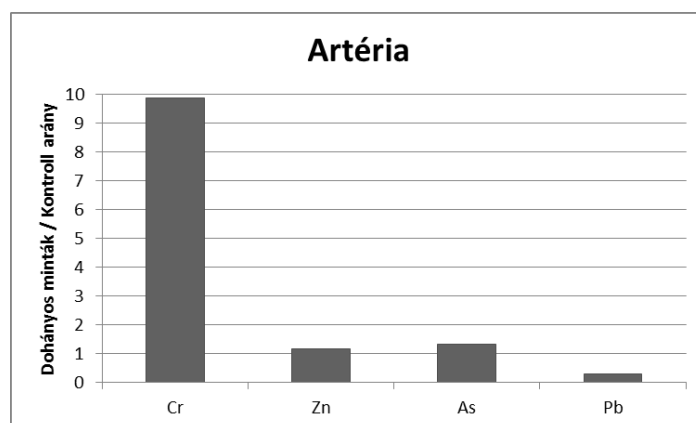
Méréseink során számos fém felhalmozódását vizsgáltuk (Mg, Mn, Fe, Cu, Cr, Cd, Zn, As, Se, Sn, Hg, Pb). A dolgozatban az irodalmi bevezetőben már említett fémekkel foglalkoztunk részletesebben. Az eredményeket $\mu\text{g/g}$ illetve ng/g száraztömegre vonatkoztatott mennyiségekben adjuk meg néhány kiválasztott mintára és fémre (2. táblázat).

Minta	Cr	Zn	As	Pb	Minta	Cr	Zn	As	Pb
	ng/g DW	µg/g DW	ng/g DW	ng/g DW		ng/g DW	µg/g DW	ng/g DW	ng/g DW
K17 artéria	157.1	74.61	1224	501.2	D19 artéria	2620	73.74	2525	229.1
K17 véna	326.3	80.82	2160	220.7	D19 véna	2135	46.55	2219	324.5
D2 artéria	345.8	77.69	1450	218.7	D21 artéria	411.9	92.74	1381	82.03
D2 véna	346.2	78.32	1142	914.6	D21 véna	608.7	84.86	1824	370.6
D5 artéria	106.2	51.89	840.9	68.54	D25 artéria	2585	93.42	1946	234.4
D5 véna	531	83.19	2519	361.5	D25 véna	774.5	58.07	1572	116.4
D6 artéria	2192	111.3	1252	130.4	D31 artéria	2593	118.6	2019	104
D6 véna	596.1	61.23	2002	304.1	D31 véna	1104	112.4	1391	319.5

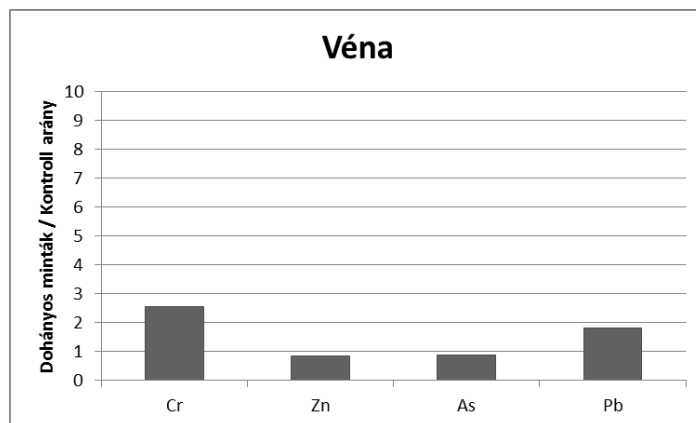
2. táblázat: A köldökszinór artériákban és vénában található fémek száraztömegre vonatkoztatott mennyiségei

A K17-es kontroll jól reprezentálja a nem dohányos mintákból származó mérések átlagát. A D jelű minták variabilitását 7 kiválasztott példán mutatjuk be.

Az adatok kiértékelése során összefüggést kerestünk a naponta elszívott cigaretta száma és az egyes fémek koncentrációi között, valamint az egyes fémek koncentrációinak esetleges egymással való összefüggésének tekintetében. A kapott eredmények alapján nem találtunk korrelációt ezen szempontok összefüggését tekintve. Ez valószínűsíthetően annak tudható be, hogy a különböző cigaretta fajták eltérő mértékben tartalmazzák a fémeket, valamint az eltérő dohányzási szokások is befolyásolhatták az eredményeket. Annak érdekében, hogy ezen hiba forrásokat kiküszöböljük és egy értékelhető képet kapjunk a mintáink fémtartalmát illetően, a kontroll mintáinkra normalizáltuk azokat. Ennek eredményeként végül megkaptuk az egyes fémekre vonatkoztatható arányossági összefüggéseket (dohányos/kontroll) (7. és 8. ábra).



7. ábra: A köldökszinór artériákban található fémek kontroll mintákhoz viszonyított arányai



8. ábra: A köldökszinór vénában található fémek kontroll mintákhoz viszonyított arányai

Ahogy az a grafikonokon látható mind a köldökszinór artériákban, mind pedig a köldökszinór vénákban megnövekedett a vizsgált fémek mennyisége a kontroll mintánkhöz képest. Továbbá az is jól látható, hogy az artériák falában sokkal nagyobb mennyiségben fordultak elő ezen fémek, mint vénában, az Pb kivételével. Ebből levonhatjuk azt a következtetést, hogy a méhlepény valójában nem képes a toxikus fémek teljes mértékű visszatartására, jelentős mennyiségben kerülnek át köldökszinór ereken keringő vérbe és halmozódnak fel az artériákban és a vénában. Az erek közti megoszlás mutatja, hogy a fémek „keresztülhaladnak” a fejlődő szervezeten, és nagy mennyiségben rakódnak le az artériák falában is.

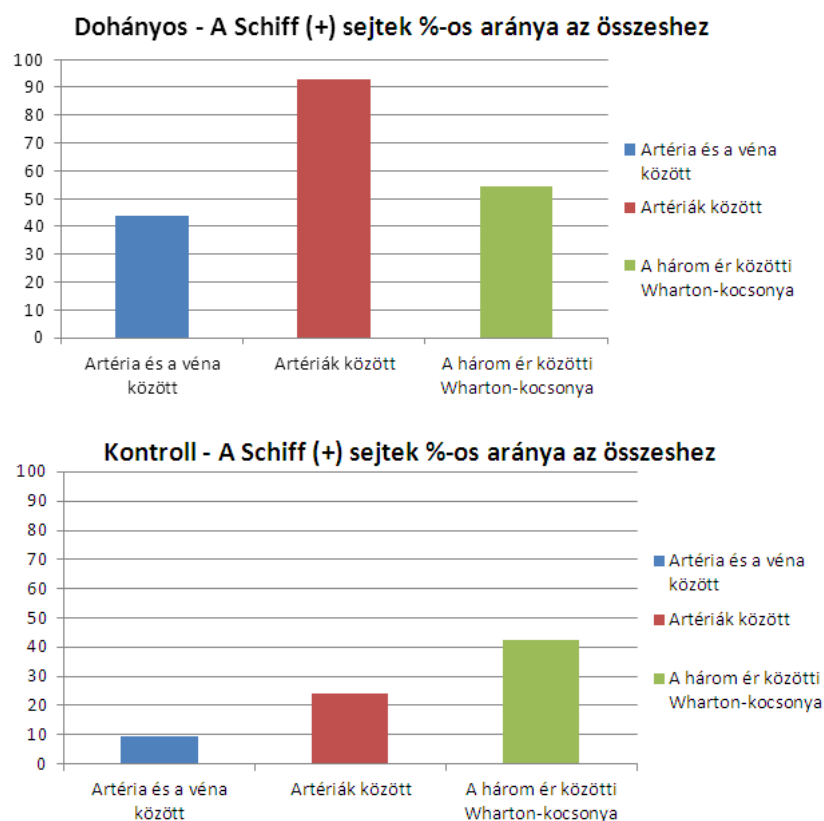
5.3 Hisztológia

Különböző festési eljárásokkal vizsgáltuk a köldökszinór kocsonyás állományában található sejtek mennyiségét és azok esetleges károsodását. A Schiff és hematoxin vagy toluidin kék festett metszeteken megszámolt sejteket táblázatba foglaltuk. A mintákat mind külön kezeltük a kiértékelés során, és minden esetben hasonló eredményeket kaptunk. A nagyszámú minta miatt, ezekből egy reprezentatív esetet szeretnénk bemutatni, melynek eredményei a 3. táblázatban láthatóak:

Dohányos minta				
A számolás helye	Normál sejtek	Schiff (+) sejtek	Összesen	A Schiff (+) sejtek %-os aránya az összeshez
Artéria és véna között	591	464	1055	43.98
Artériák között	41	540	581	92.94
A három ér közötti Wharton-kocsonya	680	809	1489	54.33
Összesítve	1312	1813	3125	58.02
Kontroll minta				
A számolás helye	Normál sejtek	Schiff (+) sejtek	Összesen	A Schiff (+) sejtek %-os aránya az összeshez
Artéria és véna között	681	70	751	9.32
Artériák között	582	186	768	24.22
A három ér közötti Wharton-kocsonya	252	186	438	42.47
Összesítve	1515	442	1957	22.59

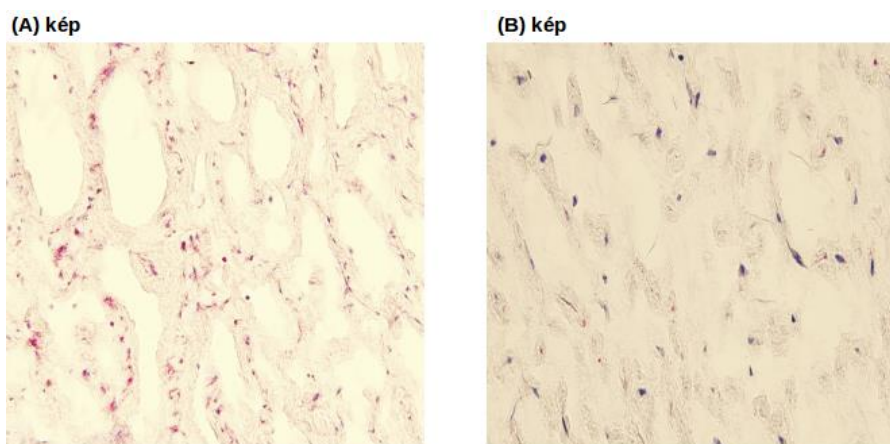
3. táblázat: A Schiff-festésre pozitív sejtek száma és százalékos megoszlása a normál sejtekhez és az összes sejthez képest dohányos és kontroll minták különböző területein

A táblázatok alapján számolt százalékos megoszlás adatait a 9. ábra szemlélteti.

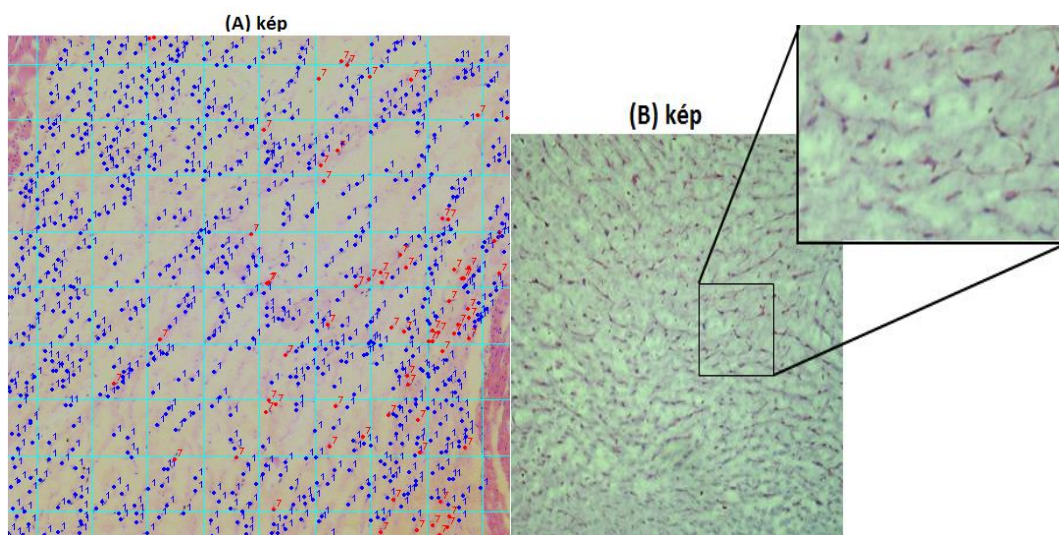


9. ábra: Schiff pozitív sejtek százalékos aránya az összes sejthez képest dohányos és kontroll anyáktól született gyermekek köldökzsinór mintáinak különböző területein

Lényeges különbségeket tapasztaltunk a sejtszámba és a sejtek károsodásában a dohányos és kontroll mintáink között. A kiragadott példa is mutatja, hogy mind a három, egymástól különböző területen megszámlolt Schiff-pozitív sejtek száma növekedett a dohányos minták esetében a kontrollhoz viszonyítva. Továbbá az is látható, hogy az artériák közvetlen közelében és a két artéria között lévő területek halmozottan mutatják a Schiff-pozitív sejteket, mely LP-re utal, mind a vénához, mind pedig a kontrollhoz viszonyítva. Figyelemre méltó hasonlóság volt tapasztalható a Wharton-kocsonya mind a három értől egyaránt távol lévő szegmensében.



10. ábra: Dohányos (A) és kontroll (B) mintákból származó köldökzsinór Wharton-kocsonya Schiff és hematoxin festése (A) 10x-es objektív alatti nagyításban (B) 20x-os objektív alatti nagyításban.



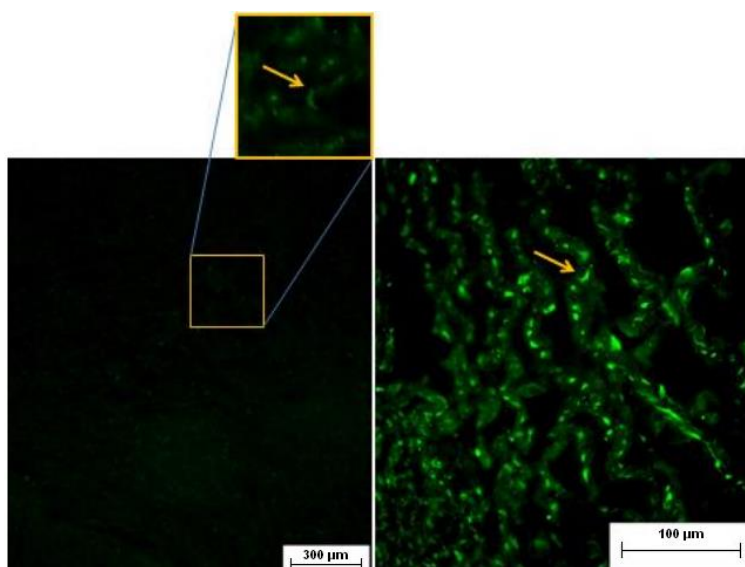
11. ábra: (A) kép: Schiff (+) piros és normál (kék) sejtek lokalizálása
Véna (jobb felső sarok) és artéria (bal alsó sarok) közötti leszámolt terület kontroll köldökzsinór mintából. A kék pontok jelölik a normál sejteket, a piros pontok a Schiff (+) sejteket.
(B) kép: A két artéria és a véna közötti terület, a Wharton-kocsonya, fénymikroszkópos képe (10x)
A kép jobb felső sarkában kinagyítva, vörös/bíbor színnel láthatóak a károsodott Schiff (+) sejtek.

Mindezen megfigyelések összhangban vannak az erek falában mért fém koncentrációk megoszlásával, ami egy lehetséges magyarázata az artériák közelében tapasztalt magasabb fokú LP-nek. A LP következtében valószínűsíthetően különböző mértékben károsodó érfalak átjárhatóbbá válnak különböző fémek, illetve akár más gyökös tulajdonságú károsító ágensekkel szemben is. Ezáltal jól láthatóan károsodnak az ér mentén elhelyezkedő fibroblaszt-szerű sejtek is. A károsodás középvonal irányba történő látszólagos halmozódásának hátterében valószínűsíthetően az áll, hogy a Wharton-kocsonya sejteinek osztódása és megújulása az erek körüli sejtektől kezdődik. Az újonnan keletkezett sejtek pedig a metszet középvonala felé tolják a már károsodott idősebb sejtpopulációkat.

5.4 Immunhisztokémia

A Casp3 az úgynevezett kivégző kaszpázok közé tartozik, melyeket a kaszpáz-9 aktivál, feladatuk a sejtek bizonyos fehérjéinek proteolízise. A Casp3 aktív jelenléte egy előrehaladott apoptotikus állapotot jelez [104]. Mivel kizárólagosan egy általános állapot felmérést kívántunk elvégezni, nem használtunk kvantifikálásra alkalmazható sejtmagi festéket. A kapott képeken a Casp3 pozitív sejteket jelöltük.

A kapott eredmények jól szemléltetik a dohányos és kontroll mintákban elindult apoptotikus folyamatok közti különbségeket (12. ábra).

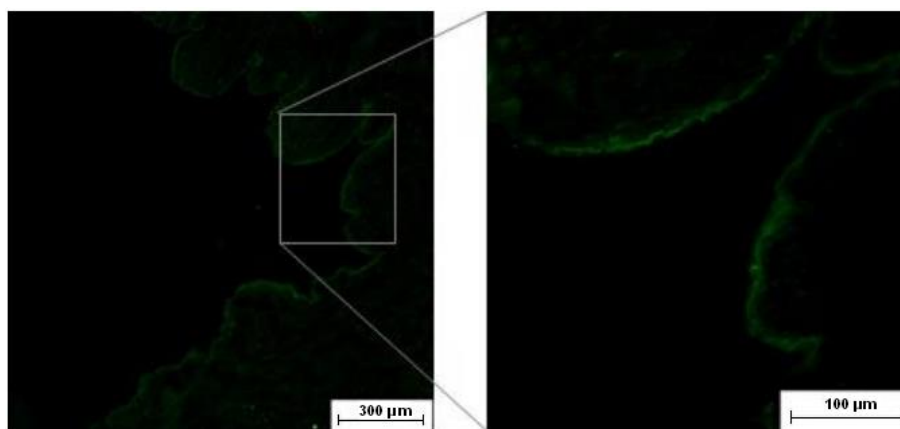


12. ábra: Kontroll (bal oldali kép) és dohányos (jobb oldali kép) köldökszínór mintából származó metszetek Wharton-kocsonyája Casp3 specifikus immunhisztokémia eljárást követően

A bal oldali ábrán egy 10x-es nagyítású területet láthatunk, amelynek egy kitüntetett részét a dohányos mintáéval megegyező nagyításban (40x) is vizsgáltunk. A nyilak szemléltetik, hogy ugyanazon két sejttípus fluoreszcens intenzitásai mennyiben eltérőek.

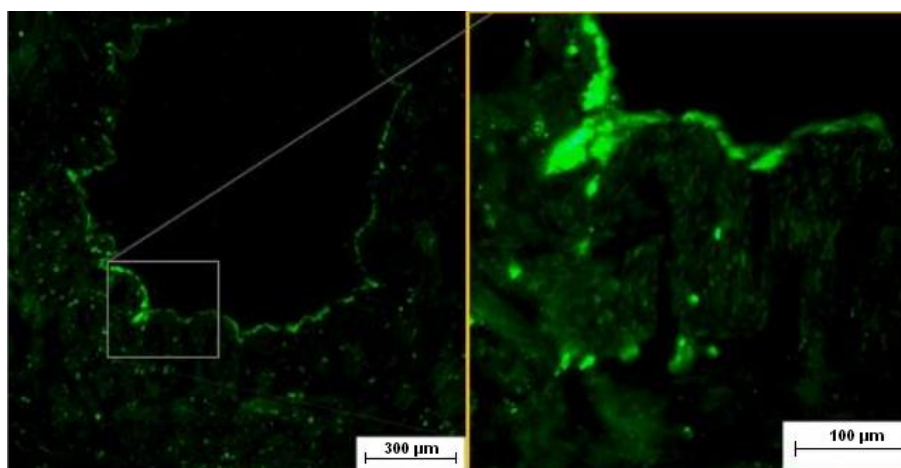
A dohányos és kontroll Wharton-kocsonya összevetésével egy sokkal intenzívebb fluoreszcencia látható a dohányos minták esetében, mely valószínűsíthetően túllép a természetesen bekövetkező sejthalál mértékén

Hasonló különbségek szintén megfigyelhetők a kontroll (13. ábra) és dohányos vénákról készített képeken is (14. ábra). Ez utóbbiak esetében még érdemes megjegyezni, hogy a Casp3 marker intenzívebben jelen van az erek lumenét közvetlenül körbevevő epiteliális rétegben. Ez nagy valószínűséggel arra utal, hogy az intenzív károsító hatás, ami akár az érfal sejteinek apoptózisához is vezethet, az erek lumenének irányából származik.



13. ábra: Kontroll mintából származó köldökszínór metszet Casp3-ra specifikus immunhisztokémiai eljárást követően

A fluoreszcens mikroszkóppal készített felvételek (baloldalon 10x-es és jobb oldalon 40x-es nagyításban) a köldökszínór vénára fókuszálnak. A zöld fluoreszcencia alacsony intenzitása, illetve hiánya figyelhető meg.

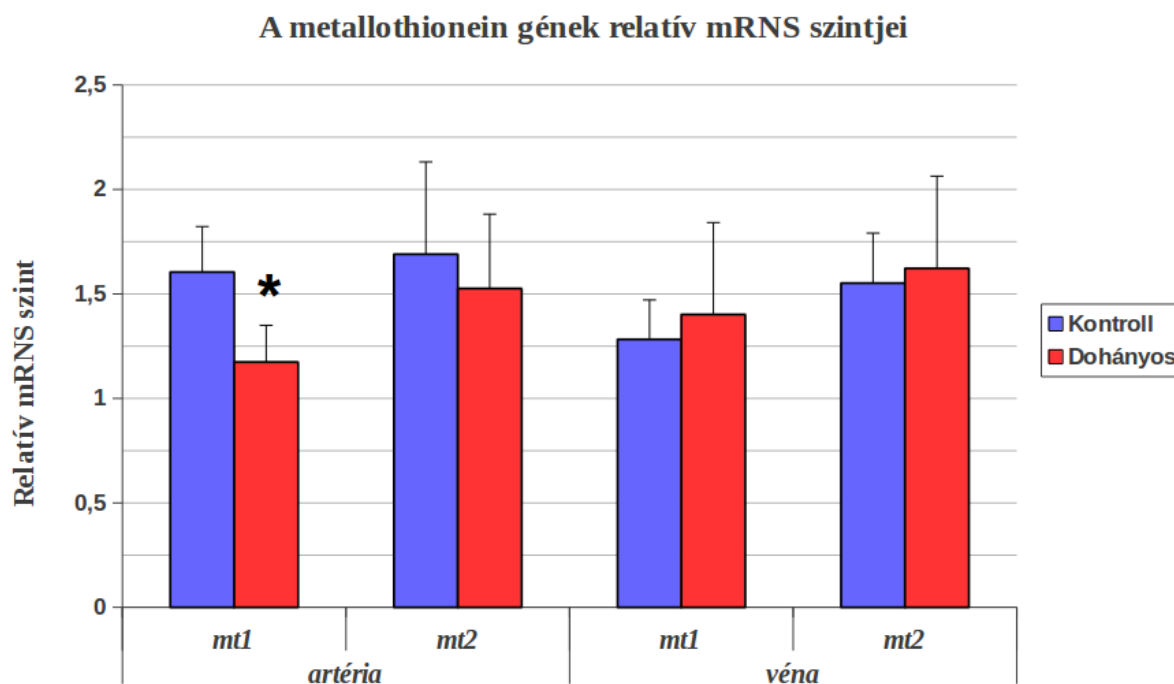


14. ábra: Dohányos mintából származó köldökszínór metszet Casp3 specifikus immunhisztokémiai eljárást követően

A fluoreszcens mikroszkóppal készített felvételek (baloldalon 10x-es, jobb oldalon 40x-es nagyításban) a köldökszínór vénára fókuszálnak. A fluoreszcens jel mennyiségének és intenzitásának különbsége jól megfigyelhető az előző ábrához viszonyítva.

5.5 A PCR amplifikációk eredményei

Nagyszámú mintán végeztünk szemikvantitatív RT-PCR reakciót az *mt1* és *mt2* gének expressziójának követésére. A dohányos mintákból származó artériákban és vénákban található *mt1* és *mt2* mRNS szinteket hasonlítottuk a kontroll mintáinkhoz (15. ábra).



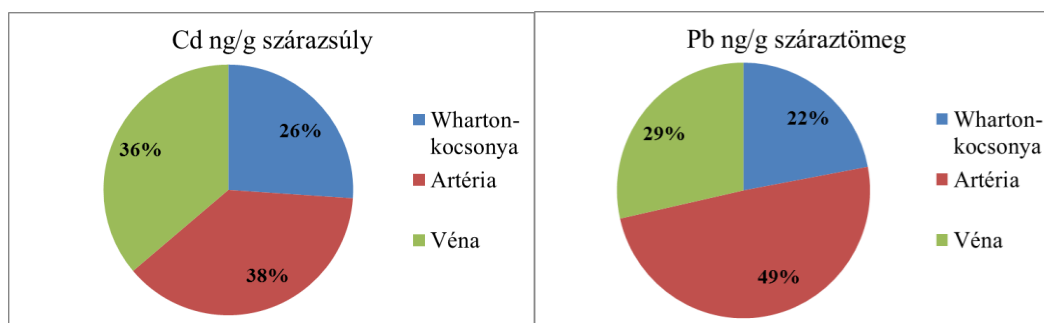
15. ábra: Az *mt1* és *mt2* mRNS szintjeinek alakulása dohányos és kontroll artériában és vénában

A PCR amplifikációkkal vizsgáltuk a nagy fémkötő kapacitással rendelkező fehérjéket, a MT-eket. Jelenlegi vizsgálataink alapján az *mt1* és *mt2* gének mRNS szintjei izoforma specifikusan és köldökszínór ér specifikusan alakultak. Szignifikáns változást kizárólag az artériákból származó minták *mt1* expressziója esetében találtunk. A qPCR eredményei a szemikvantitatív reakciókhoz hasonló eredményeket adtak. Mivel ezen méréseket eddig csak kis számú mintán végeztük el, így annak eredményei ezen dolgozatban nem kerülnek további tárgyalásra.

5.6 Összegzés

A fenti eredmények közül a Schiff-festés és a fémmérés eredményei világossá tették számunkra, hogy a köldökzsinórban található artériák és véna mellett a kocsonyás állományba ágyazott mezenhimális sejtek is jelentős mértékben károsodtak. Ezen eredményeinket a Casp3 specifikus immunhisztokémiai vizsgálatok is alátámasztották. Mivel az első fémmérés során kizárólag az erekre koncentráltunk, néhány kiválasztott minta esetében a köldökzsinór artériából, vénából és a Wharton-kocsonyából megismételtük a méréseket. Az eredményeket ng/g száraztömegre vonatkoztatott mennyiségekben adjuk meg.

Az eredményekből levonható következtetéseket két fém, a Cd és Pb példáján mutatjuk be.



16. ábra: A D25 köldökzsinór artéria, véna és Wharton-kocsonya Cd és Pb tartalmának megoszlása

Mind a két fém esetében jól látszik, hogy a fémek jelentős mennyiségben jelen vannak a Wharton-kocsonyában is. A kocsonyába feltételezhetően kétféle mechanizmus útján is kerülhetnek ki fémek. Egyfelől egy eddig nem vizsgált transzport folyamat részeként, másfelől elképzelhető, hogy a nagymértékben károsodott ereknek megnő az áteresztő képessége, és ezáltal kerülhetnek ki a fémek a Wharton-kocsonyába.

Az eredményeket összefoglalva elmondható, hogy a cigarettafüstben is megtalálható fémek nagy mennyiségben képesek eljutni a fejlődő magzathoz. Feltételezhető, hogy a méhlepény nem képes teljes mértékben kivédeni ezen fémek keringéssel történő tovább haladását, főleg ha azok vörösvértestekhez kötötten vannak jelen (például Cr). A fémek magzati szempontból történő nyomon követésére legalkalmasabb a köldökzsinórok elemzése. Az elvégzett vizsgálatok pedig alátámasztani látszanak azon megállapításokat, melyek szerint a fémek placentán való átjutása után már „szabad az út” a magzat felé. Az artériákban

jelenl  , a vénákhoz viszonyítva is rendkívül magas fém felhalmozódás pontos magy  razat  t egyelőre nem ismerjük. Ezeket a megfigyeléseket támasztják alá a Schiff-festések eredményei és a sejthalált jelző Casp3 feldúsulása is.

Jövőbeni kísérleteink között szerepel, az immunhisztokémiai vizsgálatokba további markerek, mint a például az apoptózist szabályozó Bcl-2-asszociált X protein (BAX), hemoxigen  zok (HO-1, HO-2), endoteliális NO-szintáz (eNOS) bevonása. Terveink közé tartozik olyan markerek vizsgálata is, mint például az humán keratin 18 és az oktamer kötő transzkripciós faktor 3, melyek lehetőséget adnak a mezenhimális   ssejtek esetleges nehézfém-stressz indukált differenciálódásának követésére. Folyamatban vannak antioxidáns feherj  ket kódoló gének (*Mn-sod*, *Cu/Zn-sod*, *cat*, *ho1/2*, *enos*) expressziójának vizsgálata RT-PCR/qPCR alkalmazásával.