



1949

A cink homeosztázis vizsgálata a hüvelyszövetben

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

A szerző neve: Csikós Anett

Témavezető neve: Gálné Dr. Miklós Ida

Témavezető neve: Prof. Dr. Takács Péter

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2022

A doktori értekezés betétlapja

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács a **Juhász-Nagy Pál** Doktori Iskola **Fermentációs Biotechnológiai és Biomérnöki** programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2022.

.....
a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy **Csikós Anett** doktorjelölt **2021-2022** között a fent megnevezett Doktori Iskola **Fermentációs Biotechnológiai és Biomérnöki** doktori programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2022.

.....
a témavezető aláírása

Tanúsítom, hogy **Csikós Anett** doktorjelölt **2021-2022** között a fent megnevezett Doktori Iskola **Fermentációs Biotechnológiai és Biomérnöki** doktori programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2022.

.....
a témavezető aláírása

A cink homeosztázis vizsgálata a hüvelyszövetben

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a **Biológia** tudományágban

Írta: **Csikós Anett** okleveles **Biomérnök**

Készült a Debreceni Egyetem **Juhász-Nagy Pál** doktori iskolája
(**Fermentációs Biotechnológiai és Biomérnöki** programja) keretében

Témavezető: Gálné Dr. Miklós Ida
Tanszékvezető egyetemi docens
Témavezető: Prof. Dr. Takács Péter
Egyetemi tanár

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 20...

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés és célkitűzés	1
2. Irodalmi áttekintés.....	3
2.1. A cink homeosztázisa és szerepe.....	3
2.1.1. Cink deficiencia.....	7
2.2. A cink szerepe a jelátviteli folyamatokban	10
2.3. Cink transzporter fehérjék	11
2.3.1. A ZnT és ZIP szállító fehérjék molekuláris és biokémiai tulajdonságai.....	12
2.3.1.1. ZnT transzporter fehérjék lokalizációja és felépítése.....	12
2.3.1.2. ZIP transzporter fehérjék felépítése	14
2.3.1.3. Szállító fehérjék szerepe a betegségek patogenezisében.....	16
2.3.1.4. A cink transzporterek mutációi, genetikai változások	17
2.4. A női genitális traktus felépítése	18
2.4.1. A hüvely felépítése.....	19
2.4.2. Menopauza	22
2.5. A cink szerepe a hüvelyben.....	25
3. Anyag és módszer	27
3.1. A résztvevők kiválasztása és a mintagyűjtés.....	27
3.2. Minták laboratóriumi feldolgozása	29
3.2.1. Cinkszint meghatározása teljes vérben és hüvelyi szövetmintákban ICP-OES módszerrel	29
3.2.1.1. A minta előkezelése	29
3.2.1.2. Minősített referencia anyagok	30

3.2.1.3. Elemanalízis	31
3.2.2. Génexpressziós vizsgálatok a hüvelyi szövetmintákban.....	31
3.2.2.1. mRNS extrakció, cDNS átírás.....	32
3.2.2.2. Valós idejű PCR elemzés	33
3.2.3. Cink transzport fehérjék meghatározása a hüvelyi szövetmintákban IHC módszerrel	36
3.2.3.1. Az immunhisztokémiai reakciók standardizálása	37
3.2.4. Cink transzport fehérjék egyedi nukleotid polimorfizmusainak meghatározása	40
3.2.4.1. DNS extrakció teljes vérből	40
3.2.4.2. A gDNS mennyiségi meghatározása.....	41
3.2.4.3. Új primer párok tervezése polimeráz láncreakciókhoz	42
3.2.4.4. PCR amplifikáció	42
3.2.4.5. PCR termékek ellenőrzése gélelektroforézissel	47
3.2.4.6. Szekvenciaelemzés.....	47
3.3. Statisztikai analízis	48
3.3.1. Cinkkoncentráció elemzése.....	48
3.3.2. Génexpressziós és immunhisztokémiai eredmények elemzése....	49
3.3.3. Egyedi nukleotid polimorfizmusok elemzése	50
4. Eredmények.....	51
4.1. Atomabszorpciós eredmények	51
4.2. Génexpresszió analízis eredményei.....	53
4.3. Az immunreakció standardizálásának eredményei	57
4.4. Immunhisztokémiai elemzés eredményei	61

4.5. Szekvenciaelemzés eredményei	65
4.5.1. Azonosított változatok magasabb allél frekvenciával	65
4.5.2. Öt új azonosított SNP	77
5. Diskusszió.....	83
6. Összefoglalás.....	93
7. Summary	96
8. Irodalomjegyzék.....	99
9. Köszönetnyilvánítás	123
10. Publikációs lista.....	124

Rövidítések jegyzéke

AE	acrodermatitis enteropathica
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNS	komplementer DNS
Ct	áttörési pont
ECM	extracelluláris mátrix
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz
ICP-OES	induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometria
IHC	immunhisztokémia
MMP	metalloproteináz
MT	metallothionein
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	polimeráz láncreakció
qPCR	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció
SLC	Solute Carrier
SLC30A/ZnT	cink transzporter
SLC39A/ZIP	cink transzporter
SNP	egyedi nukleotid polimorfizmus
Zn	cink
Zn²⁺	cinkion

1. Bevezetés és célkitűzés

A cink (Zn) az emberi test alapvető nyomeleme. Biológiai funkciója három kategóriába sorolható: strukturális, szabályozó és katalitikus. Hozzájárul a fehérjeszerkezethez, szabályozza a génexpressziót és katalizálja az enzimaktivitást. A sejtek szintjén, a cink alapvető szerepet játszik a proliferációban, a differenciálódásban és az apoptózisban.

Az elmúlt évtizedben felfedezték a fehérjék homeosztatisz rendszerét, amelyek a celluláris cinket koordinálják; a cink importja, exportja és elosztása által. A fehérjék mutációi a homeosztatisz szabályozást jelentősen képesek befolyásolni. E rendszer részét képezik regulátorok és olyan transzmembrán transzporter fehérjék, melyek a cinkionokat a membránokon keresztül szállítják. Két fő cink transzporter családot azonosítottak: az SLC30A (más néven Zn transzporter, ZnT) és SLC39A (más néven Zrt-, Irt-kapcsolt fehérjék, ZIP). Emberben tíz *SLC30A/ZnT* gént és 14 *SLC39A/ZIP* gént azonosítottak.

A nők élete folyamán az egyik leglátványosabb biológiai adaptáció a kismencede és a hüvely átalakulása a szülésre való felkészülésre, illetve a terhesség után a normális állapot visszanyerése. A menopauza még jelentősebb változásokat hoz, ugyanis számos kóros folyamat indulhat meg és ezek a negatív folyamatok kihatással vannak a nők szervezetének egészére.

Ezek a változások a hüvelyfalat jelentősen érintik az említett időszakokban. Ezért is fontos, hogy megértsük azokat a folyamatokat, amelyek lassíthatják, vagy akár javíthatják a hüvelyben kialakuló káros hatásokat. A menopauza után a nyomelemek metabolizmusában bekövetkező rendellenességek kockázata magas. A nyomelemek koncentrációját több tényező is befolyásolhatja, mint például az étrend, az elemek pótlása, illetve a cink transzport működése. Mivel jelenleg a hüvelyszövet cinkszintjéről, a cink

transzporter gének működéséről, a közöttük lévő összefüggésekről viszonylag keveset tudunk, így a disszertációban ezek megismerésére törekedtünk.

Feltételeztük, hogy a hüvelyszövet és a teljes vér cinkszintje korrelál, és hogy a nyomelemek koncentrációja összefüggést mutat az öregedéssel vagy a menopauzával. Hipotézisünk az volt, hogy a hüvelyi szövet cinkszintje az öregedéssel csökken. További hipotézisünk volt, hogy a cink transzporterek különböző módon expresszálódnak a hüvelyi szövetekben, és a menopauza után az expresszió szintje csökken, ami hozzájárulhat a posztmenopauzás nőknél fellépő megváltozott hüvelyfal összetételhez. Hipotézisünk teszteléséhez, pre- és posztmenopauzás nők teljes vastagságú hüvelyfal mintáinak vizsgálatát indítottuk el.

Célul tűztük ki, hogy

1. induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometria (ICP-OES) módszerrel meghatározzuk a vér és a hüvelyi szövet cinkszintjét, és megállapítjuk, hogy van-e összefüggés a teljes vér és a hüvelyi szövetminták cinkszintjei között, és hogy a kapott értékek összefüggenek-e a beteg életkorával vagy a menopauza állapotával.
2. meghatározzuk a ZnT1-10 és ZIP1-14 transzporterek génexpressziós profilját valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR) módszerrel és immunhisztokémiai (IHC) vizsgálattal az egyes gének által kódolt fehérjék termelődését a hüvelyszövetben.
3. bővítsük ismereteinket az SLC30A és SLC39A családokhoz tartozó cink transzporter gének egyedi nukleotid polimorfizmusairól (SNP-k) és megtudjuk, hogy van-e összefüggés ezen SNP-k és a teljes vér, valamint a hüvelyszövet cinkszintje között.

2. Irodalmi áttekintés

Szervezetünk fontos építőkövei az ásványi anyagok. A biológiai szövetek ásványi alkotórészei koncentrációjuktól függően két kategóriába sorolhatók. Az egyik csoport, a makroelemek, ezek a táplálkozás szempontjából fontos ásványok. Napi beviteli követelmény egy felnőtt embernél magasabb, mint 100 mg/nap. Ebbe a csoportba tartozó elemek a nátrium, kálium, klór, kalcium, foszfor, magnézium [1, 2].

A másik csoport pedig a nyom- vagy mikroelemek, amelyek kis mennyiségben találhatók meg, viszont elengedhetetlenek szervezetünk megfelelő működéséhez. A nyomelemek különböző metabolikus jellemzőkkel és funkciókkal rendelkeznek. Részt vesznek a szöveti, sejtes és szubcelluláris működésben; ezek közé tartozik a humorális és sejtes mechanizmusok általi immunszabályozás, idegvezetés, izomösszehúzódások, membránpotenciál szabályozások, mitokondriális aktivitás és enzimreakciók. A nyomelemek közé tartozik a vas, a cink, a réz, a kobalt, a króm, a jód, a fluor, a szelén, a mangán és a molibdén [2, 3].

2.1. A cink homeosztázisa és szerepe

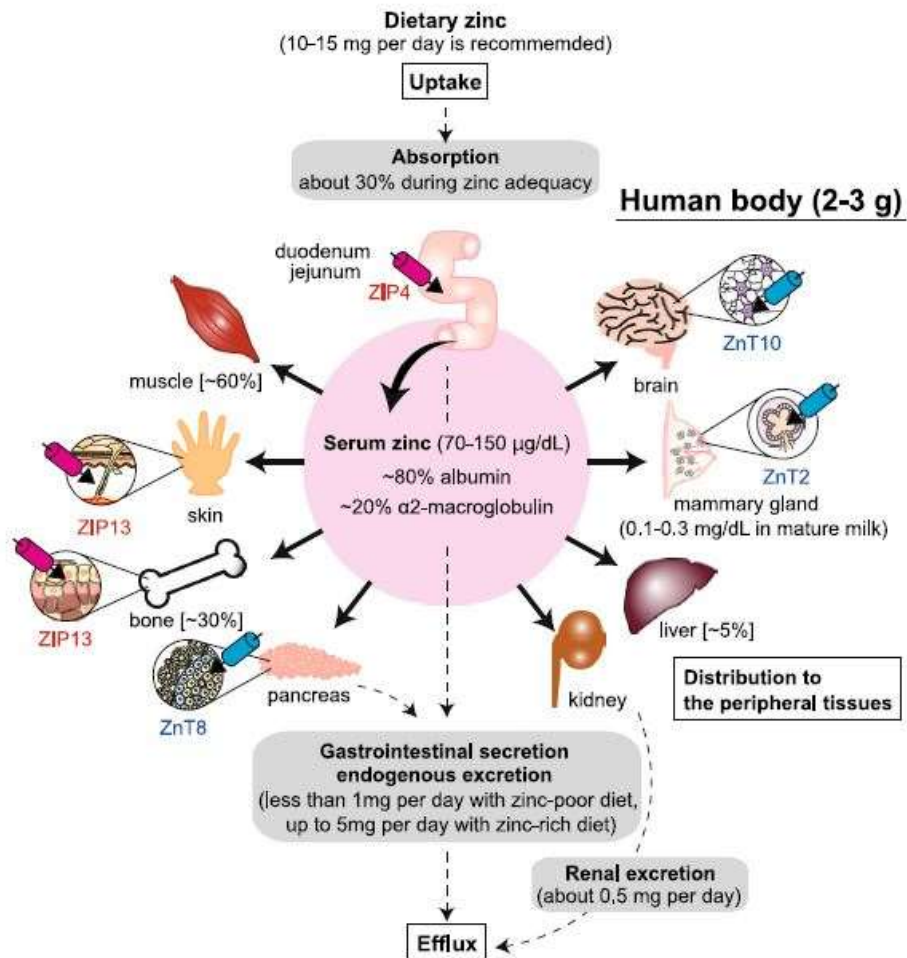
A cink az emberi szervezetben a második leggyakoribb nyomelem a vas után. Két vegyértékű kation (Zn^{2+}), amely fiziológiás körülmények között nem redukálódik [4].

A cink az élethez feltétlenül szükséges nyomelem. Ezt először 1869-ben bizonyították *Aspergillus niger*-ben [5], majd a későbbiekben növények [6], madarak [7] és patkányok [8] vizsgálata is igazolta elengedhetlen szerepét. 1961-ben emberben is azonosították esszenciális mikrotápanyagként.

A cink elengedhetetlen nyomelem és katalitikus kofaktor, amely részt vesz a sejtek növekedésében és fejlődésében [9]. Szerepet játszik a szénhidrátok, a zsírsavak, és a makrotápanyagok anyagcseréjében. Hozzájárul a sejtek oxidatív stresszel szembeni védelméhez [10]. Sejtszinten a proliferációban, a differenciációban és az apoptózisban egyaránt szerepe van [11]. További cinkigényes funkciók: a nukleinsav (DNS) metabolizmus és helyreállítás, az immunitás, a reprodukció, a látás, az ízlelés, a kognitív funkciók és az intermedier anyagcsere [12-15]. Ezeken felül a cink elengedhetetlen a neurogenesishez, a szinaptogenesishez, az idegsejtek növekedéséhez és a neurotransmisszió folyamatához [16-18]. Glutamáterg neuronok specifikus vezikulumaiban tárolódik és aktivitás-függő módon szabadul fel, mint neuromodulátor [19].

A felnőtt emberi szervezet hozzávetőleg 2-3 g cinket tartalmaz [20]. Ennek körülbelül 60%-a a vázizomzatban, nagyjából 30%-a a csontokban, 5%-a a májban és a bőrben, a maradék 2-3%-a pedig egyéb szövetekben például agyban, emlő mirigyben, hasnyálmirigyben és a vesében található [20]. A szérumban csupán a test cink tartalmának 0,1%-a fordul elő, ennek 80%-a albuminhoz kötött formában, 20%-a pedig α 2-makroglobulinhoz kötötten (1.ábra) [21- 23].

Naponta csupán 0,1%-a kerül pótlásra az étkezéssel. A cink felszívódása a patkóbélből (duodenum) és az éhbélből (jejunum) szigorúan szabályozott. Amikor a táplálkozással bevitt cink mennyisége limitált [24], akkor a felszívódás mértéke jelentősen megnő, többlet esetén pedig a felesleges mennyiség a gasztrointesztinális traktuson keresztüli szekrécióval, illetve a vesén át történő kiválasztódással ürül ki a szervezetből [25, 26] (1. ábra). Általánosan több mint 30 fehérje vesz részt szigorú szabályozás alatt, a cink homeosztázisában.



1. ábra: A cink eloszlása a szervezetben. Piros és kék betűszín jelöli azokat a ZIP és ZnT transzportereket, melyek génjeiben található mutációk szerepet játszanak az adott szerv örökletes betegségeiben vagy a betegségek fokozott kockázatában [21].

A cink sejteken belüli eloszlása eltérő, 50% a citoplazmában, 30-40% a sejtmagban, további 10% pedig a membránban található meg [27]. A citoszólban megtalálható, szabad cink mennyiség nagyon alacsony, mindössze a pikomól és a nanomól közötti tartományban kifejezhető a koncentrációja [28, 29]. A citoszólban található cink egy része (5-15%) metallothioneinhez (MT) kötött állapotban fordul elő. Az MT molekulákból emberben 12 félé

azonosítottak [30]. A metallothioneinek 61-68 aminosavból állnak és 7 cink atom, illetve más kétértékű kation megkötésére képesek. A cinkkötő domén rész két alegységből áll: egy stabilabb α részből, és egy reaktívabb β részből. Az MT molekulák nem csak a cink szállításában nagyon fontosak, hanem cink akceptor és donor molekulaként is funkcionálnak [4].

A cinknek kelátképző és mobilizálható volta folytán megvan az a képessége, hogy felhalmozódik a különböző sejtekben és szövetekben. Erre jó példa a glutamáterg neuronok a hippokampusz és az agykéreg területe, ahol a nagyobb mennyiségű cink található szinaptikus vezikulákba csomagolva [31]. A prosztatában is jelentős mennyiség halmozódik fel, érdekes, hogy prosztatákban drámaian csökken a cinkszint [32], ami jól jelzi, hogy a prosztata metabolizmusában milyen fontos szerepe van ennek a nyomelemnek [33, 34]. A hasnyálmirigy (pancreas) β -sejtjeiben szintén sok cink tud akkumulálódni [35], aminek fontos szerepe van az inzulin kristályosodásának folyamatában. Ezeken túl számos sejt működésében létfontosságú a megfelelő cinkszint, például a nyálmirigyek hám (epiteliális) és mioepiteliális sejtrétegében [36], a spermiumokban [37], a retina pigmentsejtjeiben [33, 38] vagy a hízósejtben [39].

A cink körülbelül 300 enzim aktív centrumában található meg, ahol többféle szereppel rendelkezik. A mátrix metalloproteinázok (MMP) és a prokollagén C-proteináz alapvető kofaktora [40]. Az MMP-k a cink-függő endopeptidázok egyik családját alkotják, amelyek lényegében az extracelluláris mátrix (ECM) összes összetevőjét képesek lebontani [41]. A cink szerkezeti szerepet játszhat a fehérjékben. A cinkion főleg a fehérje terciér struktúráját diszulfidkötésekkel analóg módon stabilizálja, és általában négy aminosav oldallánccal tetraédes geometriában koordinálódik. Tehát a cink nemcsak az enzimkatalízisben játszott szerepe szempontjából fontos, hanem a fehérje stabilitásánál is. Négy cinkkötő helyet találtak a kollagén és a

prokollagén molekulákban [42]. A prokollagén C-proteináz esszenciális kofaktoraként elengedhetetlen szerepet játszik a szervezet kollagén metabolizmusában [40, 43]. Korábbi tanulmányok adatai azt sugallják, hogy a különböző kétértékű kationok különböző affinitás-konstansokkal rendelkeznek a kollagénhez. A cink a MMP-k versenyképes gátlójaként tekinthető [42].

A cinknek nagyon fontos szerepe van, mint szerkezeti, katalitikus és jelátviteli elem. Azaz, számos regulátor fehérjéhez kötődhet. Ilyen a transzkripció faktorok egy csoportja, ahol a cink-ujj DNS-kötő motívumban a fehérje működőképes szerkezetének kialakításában vesz részt, s melyek más fehérjékkel, lipidekkel és nukleinsavakkal léphetnek interakcióba [44-46]. Katalitikus funkciójában a cink, enzimek szubsztrátjaként szerepel, például oxireduktázok (alkohol-dehidrogenáz, szorbitol-dehidrogenáz), transzferázok, hidrolázok (karboxipeptidáz, alkalikus foszfatáz, angiotenzin konvertáló enzim), liázok (karbonikus anhidráz, δ -aminolevulinsav-dehidratáz), izomerázok (foszfomannóz izomeráz), ligázok [47, 48] esetében. A fehérjékben a cink nitrogénnel, oxigénnel és kénnel koordinálódhat [49, 50]. Emberben a fehérjék körülbelül 10%-ában található meg a cink [4].

2.1.1. Cink deficiencia

A cink esszenciális mikrotápanyagként hozzájárul a szervezet normális működéséhez, mivel hiányában súlyos anémia, növekedésbeli elmaradás, hipogonadizmus, bőrelváltozások alakulhatnak ki [51]. Ezt követően számos, cinkhiány által okozott tünetet írtak le, mint például visszatérő hasmenés, kopaszodás, ízérzékelési zavarok, immunhiány, agyfunkció zavarai, sebgyógyulás zavara, étvágytalanság, krónikus gyulladás, májelégtelenség és neurofiziológiai problémák, mint érzelmi labilitás, ingerlékenység, depresszió [11, 52-55].

A cinkhiány napjainkban is globális egészségügyi probléma [53, 56]. A fejlődő országokban a becslések szerint a gyermekhalálozások 4%-a bizonyítottan az elégtelen cinkszint miatt következik be [57]. A fejlett országokban pedig az idősebb korosztályt érinti jelentős mértékben a cink deficiencia. Az elsődleges cinkhiány körülbelül a Föld lakosságának 40%-át érinti, oka a nem megfelelő cinkbevitel [58]. A másodlagos cinkhiányt az okozza, hogy a nyomelem vagy nem szívódik fel megfelelően a bélrendszerből, vagy valamilyen okból kifolyólag fokozott a cinkvesztés, például acrodermatitis enteropathica, cisztás fibrózis [59], gyulladásos bélbetegségek esetén [60]. Késői jel általában a dermatitisz, amely jellemzően az arcon, nemiszerveken jelenik meg [61]. Fokozott szőrvesztés, kopaszság, illetve rossz sebgyógyulás is gyakori tünet lehet [62, 63]. A cinkhiány az idegrendszer működését is érinti: csökken az idegek ingerületvezető képessége [64], ataxia, dezorientáltság [65], károsodott neurofiziológiai teljesítmény jellemző [66]. A szaporító szervrendszerre is hatással van a cinkhiányos állapot: elmaradt genitális fejlődés, hipogonadizmus [67-69], nehezített teherbeesés, illetve gyakori vetélés jelentkezik [70-72]. Fontos megjegyezni, hogy a cinkhiány általában nem önmagában, hanem más nyomelemek deficienciájával együttesen jelentkezik, legtöbbször társul hozzá vashiány is [11].

A cinkhiány igazolására leggyakrabban a szérum vagy a plazma cink mennyiségét használják [73-75]. Az érték diurnális ritmus szerint változik, étkezések után csökken és befolyásolja a nem és az életkor. A referencia tartomány alsó határa, reggeli, éhgyomorral történő vérvételt követően 700 mg/l, de menopauza előtt álló nőknél valószínűleg megbízhatóbb a státusz megítélésben, ha a referencia tartomány alsó határát 750 mg/l mennyiségben állapítják meg a plazmában [11]. A plazma cink tartalma vélhetően nem mutatja meg a sejtek cink tartalmát, ezért nem a legjobb jelző a cink státusz

meghatározásában. A leukociták és limfociták cink mennyisége jobban reflektál a cink státuszra, mint a plazmából mért cink koncentrációja [76]. A cinkhiány megállapítása különböző biológiai tesztrendszerek (bioassay) segítségével lehetséges, például fehérvérsejtekben a cinkfüggő gének (pl.: *hZip1*) működésének vizsgálatával vagy a CD4⁺/CD8⁺ T-sejtek arányának meghatározásával. Az emberi vörösvérsejtek metallothionein tartalma reagál mind a cinkpótlásra, mind a cinkhiányra, ami mérhető [77].

A cink bevitelre vonatkozó ajánlásokat a különböző országokban jellemző bevitel alapján számolják ki. Átlagosan a napi étrendi cinkfogyasztás értéke 4,7 mg és 18,6 mg között alakul [78]. A cinkpótlás képes a gyermekek körében a perzisztáló hasmenés mortalitásának csökkentésére, az infekciók megelőzésére és az immunrendszer erősítésére [57, 79, 80]. Továbbá a cinkpótlás javítja az általános egészségi állapotot is; metaanalízis vizsgálatokban azt találták, hogy a gyermekeknél a testsúly és hossz növekedését egyaránt segíti [81], időseknél csökkenti a vakság és korrall összefüggésben álló macula degeneráció gyakoriságát [82]. Mivel a cinknek számos nélkülözhetetlen biológiai funkciója van az emberi szervezetben, így többlete esetén különböző mellékhatásokat is okozhat [11]. A cink alacsony toxicitású, biztonságosnak tartott nyomelem, habár nagy mennyiségek fogyasztása mérgező lehet, valamint csökkenti a réz felszívódását a szervezetben [83]. A szervezet cinkhiányra és cinkpótlásra adott válasza eltér a különböző szövetekben [84, 85].

A cink összes biológiai funkciójának klinikai értékelésére jelenleg nem áll rendelkezésre egyetlen megbízható teszt sem. A cink betegségekben játszott szerepe több figyelmet érdemelne, mivel a cinkhiányos állapot egyrészt betegségeket okozhat, másrészt egyes kórképek progresszióját eredményezheti.

2.2. A cink szerepe a jelátviteli folyamatokban

Különböző ingerek hatására következik be a cink koncentrációjának a növekedése vagy csökkenése. A sejtek közötti és a sejten belüli cink homeosztázis egy finoman hangolt rendszer eredménye, mely magába foglalja a cink felvételét, elosztását, tárolását és effluxát [4]. A Zn^{2+} egyrészt extracelluláris szignálként, másrészt a sejten belül másodlagos hírvivőként vesz részt a szignáltranszdukcióban.

A cink által mediált jelátvitel fontos patofiziológiás folyamatokhoz kapcsolódik [86, 87], így terápiás potenciállal is rendelkezik. Az extracellulárisan felszabaduló cink különböző felszíni proteinekhez kötődik, a legfontosabb cink receptor a G-fehérje kapcsolt receptor 39 (GPR39) [88, 89]. A citoszólban a cink elengedhetetlen szerepet tölt be a másodlagos jelátvitelben [86, 87], ennek során az extracelluláris térből és az intracelluláris alkotóelemekből áramlik a cink a citoszólba. A jelátviteli folyamatokban jelentős az úgynevezett „cink hullám”, amely a cinknek a perinukleáris területről, illetve az endoplazmatikus retikulumból történő felszabadulása [90]. Ezeken túl a cink oxidatív stimulus hatására részt vesz az intracelluláris cink jelátvitelben is a citoszólban megtalálható, cinkkötő hellyel rendelkező fehérjékből, például MT-ből felszabadulva [91]. Többféle enzim lehet az intracelluláris cink jelátvitel célmolekulája: protein tirozin foszfatázok [92], foszfodiészterázok [93], calcineurin [94], kaszpázok [95] és kinázok, mint a mitogén-aktivált protein kináz és protein kináz C [96]. Az intracelluláris szabad cinkion koncentráció ezeknek az enzimeknek a regulátora.

Embereknél az extracellulárisan felszabaduló cink az endokrin, parakrin és autokrin rendszerben indít be különböző folyamatokat. A központi idegrendszerben a preszinaptikus neuronokból szabadul fel és a szinaptikus jelátvitelt különböző szállító molekulákhoz és receptorokhoz (csatornákhöz) kapcsolódva modulálja [19, 97]. A cukoranyagcserében is lényeges szerepe

van, glükóz hatására a hasnyálmirigy (pancreas) β -sejtjeiből inzulinnal együtt szabadul fel, és képes a máj inzulin clearance-ének, valamint a β -sejtek inzulin szekréciónak csökkentésére [98].

2.3. Cink transzporter fehérjék

Az elmúlt évtized fontos felfedezése volt a cink homeosztázisában részt vevő fehérjék azonosítása, melyek szerepet játszanak a nyomelem import és export folyamatainak koordinálásában, elosztásában a membránokon keresztül [4, 11, 99]. Mivel számos fehérjéről van szó, így ezek mutációi természetesen a cink háztartás alakulását is jelentősen befolyásolni képesek [100].

A Zn^{2+} sejtmembránon történő átjuttatásához többféle specifikus transzport mechanizmus szükséges. A cink hatásának kifejeződéséhez a cink transzport fehérjék elengedhetetlenek. A cinkionokat a membránon keresztül cink transzporterek szállítják, amelyek transzmembrán fehérjék. Az elmúlt két évtizedben számos cinkszállító fehérjét azonosítottak [101-103]. Ezek a fehérjék működésükhöz nem igényelnek ATP hidrolízist, ezért az SLC (Solute Carrier) fehérjecsaládba sorolták őket [4].

A cink transzporterek két fő családját különböztették meg: SLC (Solute Carrier) család 30A (SLC30A, más néven Zn transzporterek, ZnT) [104] és SLC (Solute Carrier) család 39A (SLC39A más néven Zrt-, Irt-szerű fehérjék, ZIP) [105]. Tíz ZnT és 14 ZIP szállító fehérjét azonosítottak [101-103].

A cinkszállító molekulák rendkívül fontosak a cink szervezetben játszott szerepében. A legfontosabb cink transzport fehérjék közé tartoznak a ZnT és ZIP proteinek, melyek sokféle sejt- és fiziológiai folyamathoz (pl.: az immunrendszerben, az endokrin rendszerben, a reprodukciós traktusban, a csontvázban és az idegrendszerben) járulnak hozzá azáltal, hogy szorosan ellenőrzik a cink homeosztázisát [4].

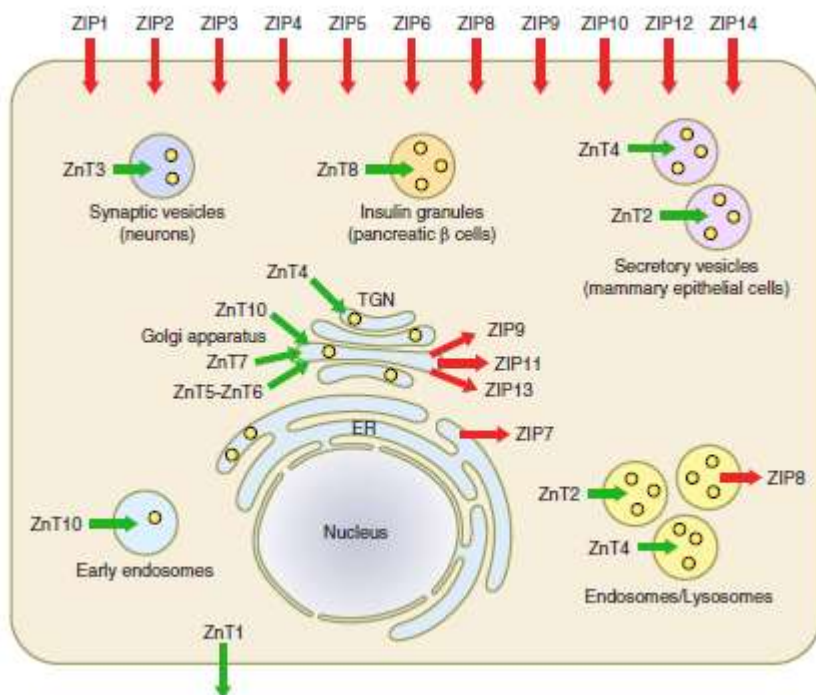
Az első cink transzporter fehérjét, a Zrc1 molekulát *Saccharomyces cerevisiae*-ből sikerült izolálni [106]. Emlősökben elsőként a ZnT1 transzportert azonosították [107], ezt pedig számos más ZnT fehérje felfedezése követte.

A ZIP transzporterek első jellemzett tagja az *Arabidopsis thaliana* vas által szabályozott transzporter 1 (Irt1) fehérjéje volt [108]. Ezután a cink által szabályozott transzporter 1-et (Zrt1) és Zrt2 transzportert fedezték fel *Saccharomyces cerevisiae*-ben az Irt1 szekvencia használatának segítségével [109, 110]. A ZIP (Zrt-, Irt-kapcsolt protein) elnevezést az eredeti tagok, Irt és Zrt nevééről kapta [111, 112]. Röviddel ezután az emlős ZIP tagokat, a ZIP1 és a ZIP2 cink transzportereket jellemezték, amelyek megkönnyítik a cink felvételét a sejtekbe [113]. A teljes humán genom szekvenciájának meghatározása az összes ZIP tag azonosítását eredményezte az emlősökben [103, 114]. A ZIP transzporterek a legtöbb taxonómiai csoportban megtalálhatók [114, 115]. A ZIP transzporter család tagjainak elsődleges feladata a cink szállítása, de vasat [116], mangánt és kadmiumot [117] is mobilizálhatnak.

2.3.1. A ZnT és ZIP szállító fehérjék molekuláris és biokémiai tulajdonságai

2.3.1.1. ZnT transzporter fehérjék lokalizációja és felépítése

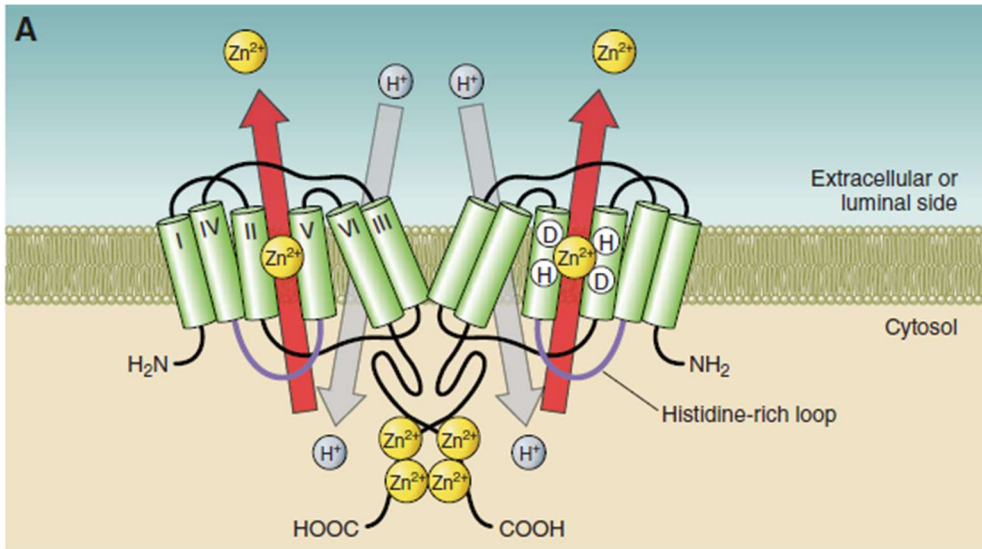
A ZnT fehérjék a cink szállítását végzik a citoszólból az extracelluláris térbe, illetve az intracelluláris tér lumenébe [103, 104, 118] (2. ábra).



2. ábra: A ZnT és a ZIP transzporterek szubcelluláris lokalizációja és a cink szállításának iránya. A ZnT (zöld nyilak) és a ZIP (piros nyilak) transzporterek elsődleges lokalizációja a sejtekben [4].

Egyelőre a szerkezetük még nem ismert, de feltételezések szerint a baktériumokban megtalálható, ZnT fehérjékkel homológ YiiP molekulához hasonló szerkezetük lehet [119] (3. ábra). A YiiP hat transzmembrán hélix-szel rendelkezik, és homodimerként funkcionál. A YiiP a cink effluxát végzi, egy proton pumpa működésének segítségével, ahol a proton:cink arány 1:1, a proton beáramlik a sejtbe, míg a cink kikerül a sejtől [120]. Valószínűsíthető, hogy a ZnT transzporterek ugyanígy működnek, a pumpa működése során a II-es és az V-ös transzmembrán hélix két aszparaginsav és két hisztidin molekulája alkotja a cinkkötő helyet [121]. A citoszólba benyúló hisztidinben gazdag hurok a IV-es és V-ös transzmembrán hélix között szintén fontos szerkezeti eleme a ZnT fehérjéknek (3. ábra). Valószínűleg ennek a szerepe a

citoplazma cink koncentrációjának észlelése [122], illetve „engedélyezi” a cink kötőhelyére való beépülését [123].

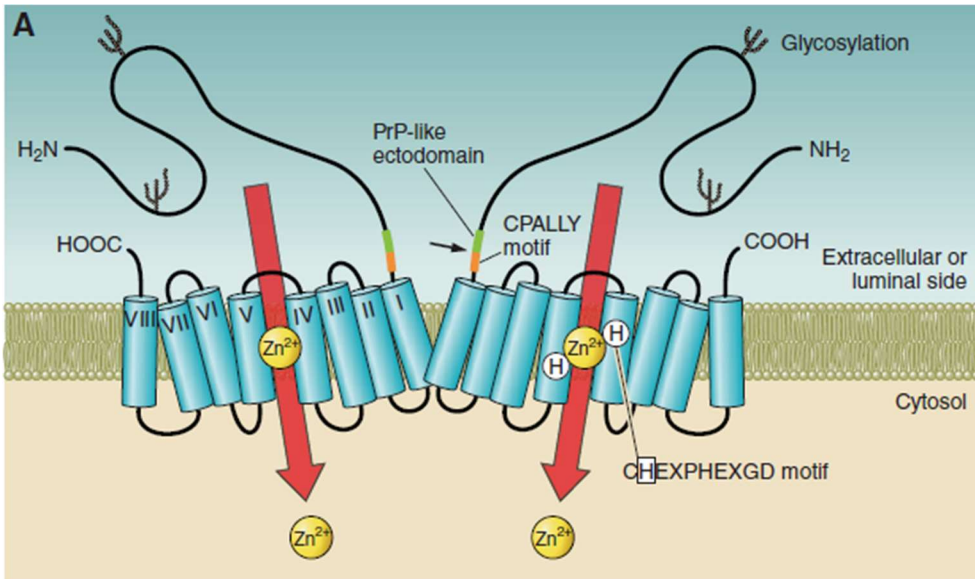


3. ábra: A humán ZnT transzporter fehérjék valószínűsített felépítése az ismert szerkezetű bakteriális homológ, a YiiP fehérje szerkezete alapján [4].

2.3.1.2. ZIP transzporter fehérjék felépítése

A ZIP szállító fehérjék szerepe a citoszól cink tartalmának pótlása az extracelluláris térből és a sejten belül pedig a membránnal határolt terekből [103, 124] (2. ábra). Jelenleg még a ZIP transzporterek cink szállítási mechanizmusát pontosan nem határozták meg. A ZIP transzporterek nagy része a plazmamembránban helyezkedik el, és cinkhiány esetén a sejt felszíni számuk megnő (kivéve ZIP5) [93, 113, 125, 126]. Cinktöbblet esetén azonban gyors degradációval csökken a mennyiségük [127, 128]. A ZnT fehérjékhez hasonlóan, a ZIP molekulák felépítéséről is csak feltételezések vannak. Jelenleg a ZIP transzportereknek és homológjaiknak nem ismertek a háromdimenziós struktúrái. A hidrofóbicitási ábrák azt sugallják, hogy ezeknek a transzportereknek nyolc transzmembrán hélix-ük van, az

extracelluláris / lúminális részen NH₂ és COOH terminális véggel [103, 124] (4. ábra). A ZIP transzporterek és homológjaik homodimereket alkotnak a cink szállításához [129].



4. ábra: A ZIP fehérjék valószínűsített felépítése [4].

A ZIP fehérjék nem csak a cink, hanem számos más fém, így vas, mangán, réz és kadmium transzportját is végzik. Egyelőre még nem tisztázott, hogy mi biztosítja a fémspecifitást, de valószínűleg az V-ös transzmembrán hélix konzervált hisztidin-maradék a lényeges szerepet tölt be, és feltételezik, hogy egy intramembrán cinkkötő helyet alkot, mikor a fehérje cinkszállító molekulaként működik. A ZIP8 és a ZIP14 fehérjében a hisztidint glutaminsav helyettesíti, habár ezek a transzporterek széles fémspecifitással rendelkeznek [117, 130].

A ZIP transzporterek a szekvencia hasonlóságuk alapján alcsaládokra oszthatók: I, II, LIV-1 és gufA [115, 131]. Az I-es és gufA alcsaládnak egy, a II-esnek három képviselője van, a többi ZIP fehérje pedig a LIV-1 alcsaládba tartozik [131].

2.3.1.3. Szállító fehérjék szerepe a betegségek patogenezisében

Egyre több tanulmány igazolja, hogy a ZnT és ZIP szállító fehérjék többféle betegség patogenezisében is szerepet játszanak.

Az immunsejtek funkciójának szabályozásában a ZnT és ZIP transzporterek szerepe döntő jelentőségű, a cink által közvetített jelátvitelnek köszönhetően. Amennyiben a szállító fehérjék nem működnek megfelelően vagy az expresszió szabályozása zavart, akkor az immunfunkciókban súlyos abnormalitás észlelhető [27, 132].

Amennyiben a cink homeosztázis krónikus zavart szenved az agyban, akkor különböző neurodegeneratív megbetegedések például Parkinson-kór, Alzheimer-kór, amiotrófiás laterális szklerózis (ALS) alakulhatnak ki [19, 133]. Ezeknek a betegeknek az agyában, illetve agy-gerincvelői (cerebrospinális) folyadékában a cink (és más kétértékű kationok) szintje jelentősen megváltozik [133, 134]. Magas koncentrációban a szabad cinkion (Zn^{2+}) a neuronokat elpusztítja [135]. Emellett a cinkhiány a SOD1 fehérjében egy olyan mutáns konformációt idéz elő, amely az ALS-ben jellemző [136]. A neurodegeneratív megbetegedésekben szenvedő páciensek agyában mind a ZnT, mind a ZIP fehérjék, valamint az mRNS expressziójának szintje is megváltozik a normális állapothoz képest [133, 137-139].

Mell- és prosztatatarák patogenezisében szintén szerepet játszik a megváltozott cink metabolizmus [34, 140]. Kutatások azt mutatják, hogy a

ZnT és ZIP transzporterek abnormalis expressziója a rák progresszióját, invazivitását, illetve áttétképző képességét egyaránt fokozza.

2.3.1.4. A cink transzporterek mutációi, genetikai változások

A cinknek fontos szerepe van a jelátviteli mechanizmusokban, a fehérjeszintézisben és a génexpresszió szabályozásában is [141, 142]. A bioinformatikai elemzések azt mutatták, hogy az ember genomjában lévő gének körülbelül 10%-a cinkkötő potenciállal rendelkező termékeket kódol [143].

Számos mutáció előfordulhat a ZIP és ZnT fehérjéket kódoló génekben, melyek genetikai elváltozásokat eredményezhetnek, és különböző tünetekben nyilvánulhatnak meg, valamint klinikailag is relevánsak (1. ábra).

Több tanulmány kimutatta, hogy a gyakori egyedi nukleotid polimorfizmusok (SNP) és a cink transzporter gének mutációi betegségekkel társulnak. Az *SLC30A/ZnT* és az *SLC39A/ZIP* transzporter gének mutációi felelősek az olyan örökletes betegségekért, mint például az átmeneti újszülöttkori cinkhiány, a májzsugordás (májcirrózis) vagy az Ehlers-Danlos-szindróma [4].

Az *SLC30A2/ZnT2* génmutációnak szintén van szerepe a tranziens újszülöttkori cink deficiencia kialakulásában, amit az anyatej alacsony cinkszintje okoz [144-146]. Egy további vizsgálat kimutatta, hogy az *SLC39A2/ZnT2*-ben található SNP (rs2234632) kapcsolatba hozható a nyaki verőérszűkület (arteria carotis) betegséggel [147]. Az *SLC30A3/ZnT3* gén több szakaszának (rs6547521, rs11126936, rs2083363, rs11126931) polimorfizmusa agyi és neurológiai elváltozások patomechanizmusában játszik fontos szerepet, például a skizofrénia kialakulásával áll kapcsolatban [148, 149]. Más tanulmányok szerint az rs11126936 memóriazavarok

kialakulásában szerepel [150]. Az *SLC30A8/ZnT8*-ban talált rs13266634 SNP növelheti a 2-es típusú cukorbetegség kialakulásának kockázatát [151, 152], míg az *SLC30A10/ZnT10* gén mutációja hozzájárul a parkinsonizmus, a disztónia, a policitémia, a májcirrózis kialakulásához, melyekhez a szervezet megnövekedett mangán szintje társul [153, 154].

Az *SLC39A3/ZIP3* gén rs4806874 nukleotid polimorfizmusa a bipoláris személyiségzavar kialakulásával van összefüggésben [155]. Számos tanulmány több mint 30 olyan mutációt talált az *SLC39A4/ZIP4* génben, amelyek acrodermatitis enteropathica-t (AE) okozhatnak [146, 156]. Az *SLC39A5/ZIP5* nonszensz és misszensz mutációi egy bizonyos típusú rövidlátással hozhatók kapcsolatba [157]. Az *SLC39A8/ZIP8* gén rs13107325 polimorfizmusa a szervezetben alacsonyabb HDL koleszterin mennyiségben nyilvánul meg [158], ezen kívül kapcsolatba hozható a megnövekedett testsúllyal [159] és a magas vérnyomással [160], továbbá a skizofrénia kockázatának növekedésével [161]. Az *SLC39A12/ZIP12* gén polimorfizmusa hozzájárulhat az autizmushoz [162], míg az *SLC39A13/ZIP13* szerepet játszhat az Ehlers-Danlos-szindróma patogenezisében [163, 164].

2.4. A női genitális traktus felépítése

A női reproduktív rendszer belső szervekből - a petefészkekből, a petevezetésekből, a méhből és a hüvelyből (5. ábra) - és a külső struktúrákból (külső nemi szervek) áll, amelyek magukban foglalják a nagy szeméremajkakat, a kis szeméremajkakat és a csiklót [165-167]. Az élet első 10-11 évében a reproduktív szervek éretlenek maradnak, és a növekedés általában párhuzamos a testtel. Az első menstruációt megelőző 2-3 évben a generatív szervek megnövekszenek, a mell megnagyobbodik, szemérem- és hónaljszőrzet jelenik meg. Az első menstruációt követően, majd az egész szaporodási időszak alatt a petefészkekben, a petevezetékekben, a méhben, a

hüvelyben és az emlőmirigyekben a menstruációs ciklushoz és a terhességhez kapcsolódó funkciók és struktúra ciklikus változásain mennek keresztül. A menopauza alatt a ciklusok megszűnnek; a posztmenopauzás időszakban a reproduktív szervek sorvadnak [165].



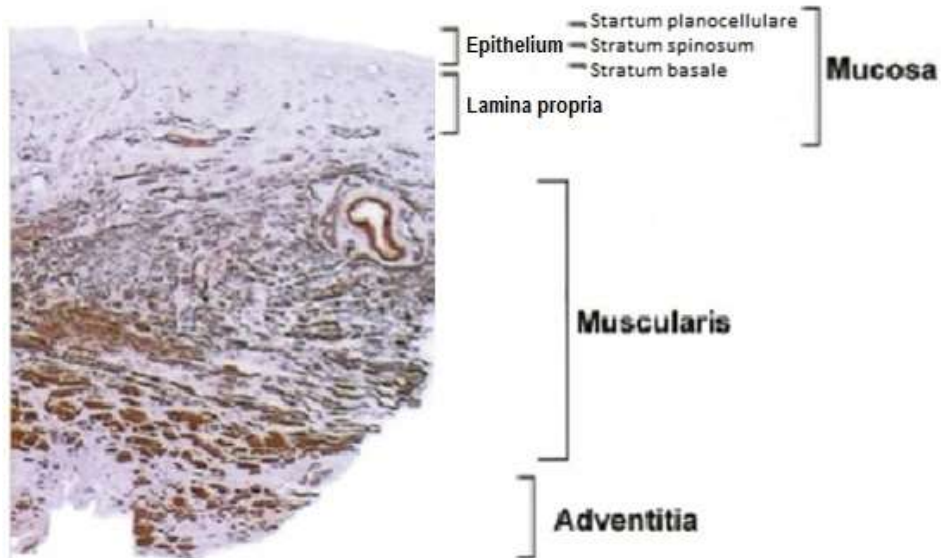
5. ábra: A belső női nemi szervek felépítése [11].

2.4.1. A hüvely felépítése

A hüvely (vagina) a női reproduktív traktus alsó része, egy izmos cső, amely összeköti a méhet a test külső részével [165]. Ez képezi a méh váladék és a menstruációs vér kiválasztó csatornáját. Ez a kopuláció szerve, illetve a szülés csatornája. A csatorna felfelé és hátrafelé irányul, 45°-os szöget zár be a vízszintes, egyenes testtartásban. A hüvely hosszú tengelye szinte párhuzamosan fekszik a medence belépésének síkjával és derékszögben a méhével. A csatorna átmérője kb. 2,5 cm, a felső részén a legszélesebb [166, 167]. A hüvelynek egy elülső, egy hátsó és két oldalfala van. Az elülső fal hossza körülbelül 7 cm, a hátsó falé pedig körülbelül 9 cm [166].

A hüvelyfalat felépítő sejtrétegeket három csoportra oszthatjuk (6. ábra):

- tunica mucosa
- tunica muscularis
- tunica adventitia



6. ábra: A hüvely simaizom α -aktinnal immunfestett szövettani képe [168].

A tunica mucosa a hüvely belső felszínét bélelő nyálkahártya, melynek kettő rétegét különböztetjük meg. Hámja (epitélium) vastag, többrétegű el nem szarusodó laphám, amely hosszanti redőket alkot [165, 169]. A hám alsó sejtsora henger alakú, viszonylag kis sejtekből áll (stratum basale), amelyek a felszínről leváló sejteket osztódásukkal pótolják. A menopauzát megelőzően kiváló regenerációs képességgel bír, amely a stratum basale sejteinek proliferációjával kezdődik és a felszíni sejtek leválásával fejeződik be. Felette több rétegben sokszögletű sejtek helyezkednek el (stratum spinosum). A hám felső egy-két sejtsora pedig ellapult sejtekből áll (stratum planocellulare). A tunica mucosa másik rétege a hám alatti kötőszövet (lamina propria), amely

proteoglikánokban, rugalmas rostokban, kollagénban gazdag laza rostos kötőszövetet tartalmaz. A hám és a kötőszövet határa erősen papillázott. A lamina propria táplálja a hüvelyi epitéliumot és nagyon fontos szerepe van a vagina szerkezetének fenntartásában. A rétegekre jellemző a magas víztartalom és a sejtek nagyfokú vízáteresztő képessége [166, 167, 170].

A tunica muscularis kettő simaizom réteget különböztetünk el, a belső körkörös simaizom réteget és a külső hosszanti lefutású simaizom réteget [165, 170]. A két réteg egymástól nehezen választható el, ugyanis kötőszöveti nyalábok alkotják [170].

A tunica adventitia a simaizomréteget körülvevő kötőszövet, amely a hüvelyt a határoló szervekhez kapcsolja. Sok rugalmas rostot, helyenként idegsejtcsoportokat tartalmaz és erekben gazdag [166, 170].

A hüvelyben található sejtek közötti tér, vagy extracelluláris mátrix szintén nagyon lényeges eleme a vagina felépítésének. Kötőszöveti rostok és makromolekulák, úgynevezett proteoglikánok alkotják [170], melyek speciális fehérjéken keresztül hosszú hialuronsav láncokhoz kapcsolódnak. A proteoglikánok nagy mennyiségű víz megkötésére képesek, vízfelvevő képességük határozza meg a lamina propria hidratáltságát. Az ECM magas víztartalmának, illetve a rendezett kollagén hálózatnak köszönhető, hogy a hüvelyi nyálkahártya feszsége fennmarad.

A hüvely öregedése pontosan nem ismert folyamat. A nők élete folyamán a hüvelynek és a kismedence szerveinek komoly változásokon kell átesnie. Az egyik leglátványosabb biológiai adaptáció a kismedence és a hüvely átalakulása a szülésre való felkészülésre, illetve a terhesség után a normális állapot visszanyerése. Hasonlóan komplex folyamaton mennek át a kismedence szervei menopauza során.

Szükséges megérteni azokat a folyamatokat, amelyek lassíthatják vagy akár javíthatják a hüvelyben kialakuló káros hatásokat, ugyanis a megnövekedett várható élettartam miatt, manapság már nem ritka, hogy egy nő 30-40 évet él menopauzában.

2.4.2. Menopauza

A változó kor idővel minden nő életében bekövetkezik, általában 45 és 55 éves életkor között. A spontán lezajló menopauza egy teljesen egészséges, normális folyamat, melynek során a havi rendszerességgel jelentkező menstruációs ciklusok először rendszertelenné válnak, majd teljesen megszűnnek. A menopauzát megelőző időszakot premenopauzának nevezik, perimenopauzának pedig a már megkezdődött változó kort tekintjük, amikor a menstruációs ciklusok rendszere megváltozik [166]. A természetesen lezajló változó kor mellett beszélhetünk még a korai menopauzáról, amely 40 éves kor alatt következik be és lehet indukált vagy spontán folyamat, melynek hátterében szintén a petefészkek csökkent ösztrogén termelése áll. Az indukált menopauza a petefészkek vagy petefészkek sebészi eltávolításának következtében, vagy a hormontermelés gyógyszerrel történő gátlásának következtében alakul ki.

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) definíciója szerint a menopauza befejezettnek tekinthető, hogyha egyéb ok hiányában a menstruáció 12 egymást követő hónapon keresztül nem jelentkezik. A folyamat során a petefészkek működése csökken, ami jelentősen csökkenti a szervezet ösztrogén termelését. Az ösztrogén szintjében bekövetkezett csökkenés következtében jelentős és progresszív változások kezdődnek az egész urogenitális rendszerben. A várható élettartam megnövekedése miatt, különösen a fejlett társadalmakban, az életidő körülbelül egyharmadát az

ösztrogén-nélkülözés szakaszában töltik a nők, hosszú távú tünetekkel és metabolikus szövődményekkel [166].

A menopauza vezető tünete az endokrin rendszerben zajló változásokhoz kapcsolódóan kialakuló csökkenés a menstruációs vérzés mennyiségében és gyakoriságában, ennek időszaka akár 4-8 éven keresztül is eltarthat. Az utolsó menstruációt követően legjellemzőbben a vasomotoros tünetek megjelenéséről számolnak be a változó korban lévő nők, mint a hőhullámok, éjszakai izzadás és ezekhez kapcsolódóan alvási rendellenességek, azonban ezek egy része vagy egésze a változó kor lezajlása után megszűnik. A hőhullámot hirtelen hőérzet jellemzi, amelyet erős izzadás követ. A szívdobogás, a fáradtság és a gyengeség is lehetnek tünetei. Normális esetben a csontképződés (oszteoblaszt aktivitás) és a csontreszorpció (oszteoklaszt aktivitás) egyensúlyban van sok tényezőtől (kor, táplálkozás és genetikai tényezők) függően. A menopauza után évente körülbelül 3-5%-kal csökken a csonttömeg. Ennek oka az ösztrogénhiány. A csontritkulás olyan állapot, amikor a csonttömeg csökken, de a csont ásványi anyag és a mátrix arány normális. A posztmenopauzás nőknél nagy a csonttörések kockázata a csontritkulás miatt. A menopauza után a bőr elvékonyodik, elveszíti rugalmasságát és ráncosodik. A bőr kollagéntartalma és vastagsága évente 1-2%-kal csökken. A szorongás, a fejfájás, az álmatlanság, az ingerlékenységi diszfázis és a depresszió is gyakoribb [166].

Az ösztrogén fontos szerepet játszik a hüvely, a húgyhólyag és a húgycső hámjának fenntartásában. Az ösztrogénhiány atrófiás hámváltozásokat eredményez ezekben a szervekben. Az ösztrogénhiány gyakran társul a csökkent szexuális vágyhoz. Ennek oka lehet pszichológiai változások (depressziós szorongás), valamint az urogenitális rendszer atrófiás változásai. A későbbi posztmenopauzás időszakban nagyon gyakori tünet az urogenitális rendszerben történő változásokhoz kötődő hüvelyi irritáció, melyet viszketés

és égető érzés kíséri, a vulvovaginális atrófia következtében kialakuló szárazság és diszpareunia, valamint a húgyutak sorvadása miatt fellépő vizeleti problémák, így sürgető vizelet inger, vizeletcsepegés, inkontinencia.

A hüvely keskenyebbé válik a rugalmasságának fokozatos elvesztése miatt. A hüvelyi hám elvékonyodik, a redők fokozatosan ellapulnak. A hüvely pH-értéke lúgos lesz [166].

A nyomelem háztartásban bekövetkezett zavarok gyakran előfordulnak [171], illetve a kóros anyagcseréjének kockázata viszonylag magas a menopauza lezajlását követően [172].

Ismeretes, hogy általában a nyomelemek bevitel csökken az életkor előrehaladtával; ezért nem meglepő, hogy az idősebb nőknél alacsonyabb cinkszintet találtak [173]. Egészséges idős egyének populációalapú vizsgálatában a Zn csökkenését figyelték meg a követésük 20 éve alatt [174]. Egy másik korábbi tanulmány arról számolt be, hogy az 50 évnél idősebb francia nőknél alacsony a cinkszint a plazmában, részben az étrendi cinkbevitel csökkenése miatt [175]. A nyomelemek státuszában kialakuló változások a menopauzához kapcsolódó legtöbb patológias állapotban fontos szerepet játszanak, például osteoporózis, kardiovaszkuláris megbetegedések, mellrák és glükóz intolerancia. A cink szintén nagyon fontos nyomelem a csont denzitásának megtartásában [176]. A nyomelemek több kedvező hatása abból fakad, hogy antioxidáns hatású enzimek kofaktorai. A nyomelemek befolyásolhatják a hormonok termelését és szabályozását, míg a női hormonok befolyásolják az ásványi anyagcserét [177].

Köztudott, hogy a hüvelyi extracelluláris mátrix összetétele egy nő életében folyamatosan változik, különösen a menopauza idején [178]. Ezen kívül egy nemrégiben megjelent publikáció feltárta, hogy a posztmenopauzás nőknél a hüvelyi cinkpótlás (új cinktartalmú hüvelygél formájában) jelentősen javította a hüvely atrófiájához kapcsolódó tüneteket [179]. Ezek az

eredmények arra utalnak, hogy a cink homeosztázis fontos a hüvelyi ECM összetételében.

2.5. A cink szerepe a hüvelyben

A cink lényeges szerepet tölt be a sejtosztódásban, a szövetregenerációban, ezáltal a különböző kötőszövetek bioszintézisében és homeosztázisában, valamint a sebgyógyulásában [180, 181]. Az alacsony cinkszintek szerepet játszhatnak az atrófiás változások kialakulásában, illetve a cink hiánya a különböző szervek gyulladásának károsodásához vezethet [182, 183].

Az ECM megváltozott anyagcseréje, lebontása jelentős szerepet játszik a patológiai folyamatokban. A folyamatos megújulását és átalakulását az MMP-k teszik lehetővé.

Korábbi állatkísérletek kimutatták, hogy a cink befolyásolja a hüvely extracelluláris mátrixát. Az öregedő egerekben és patkányokban a cink szöveti koncentrációja csökken [184-186]. A cinkhiányos étrendű egerek hüvelyének szövettani és hisztokémiai képei hasonlítanak a petefészek-eltávolított állatok szöveti mintáihoz. A bivalyokban a plazma cink koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb a fialás előtti hüvelyi süllyedésben szenvedő állatoknál, szemben az egészséges vemhes állatokéval. Ezen kívül a méh szöveti cinkszintje a legkisebb a menopauza idején [43, 187, 188]. A cink számos fiziológiai folyamatban vesz részt. A hüvelyi szövetek jelentős átalakuláson mennek keresztül egy nő életében. A hüvelyi extracelluláris mátrix összetételében változások következnek be a terhesség, a szülés után és a menopauza során [178].

A hüvelyben relatív cinkhiány alakul ki akkor, amikor a szöveteknek regenerálódniuk kell. A cink jótékony hatását korábbi kísérletekben igazolták. A kedvező eredmények mind makroszkópicusan, mikroszkóposan és molekuláris szinten is kimutathatók voltak. Vizsgálatok során az találták, hogy az emberi hüvelyi simaizomsejtekben a 20 μM cink szöveti szinten jótékony hatással van az ECM-komponensek termelésére azáltal, hogy növeli az elasztintermelés mennyiségét [43]. Hüvelyi cinkpótlással a hüvelyi ECM regenerálható volt, hasonló tulajdonságokkal, mint a fiatal patkányoké [189].

A cink transzporterek kifejeződése elengedhetetlen a cink homeosztázisának és a normális biológiai aktivitás fenntartásához [103, 190]. Az összes cink transzporter (ZnT1-10 és ZIP1-14) mRNS szintjét számos egészséges emberi szervben, köztük a méhben is vizsgálták [191]. Yang és mtsai. megállapították, hogy a cink transzporterek sajátos szöveti expressziós mintákkal rendelkeznek, és azt feltételezték, hogy ezek a transzporterek különböző szerepet játszhatnak a különböző szövetekben [191]. Megállapították, hogy a méhben a ZnT és a ZIP transzporterek expressziós szintje közepes vagy alacsony [191].

Az irodalomban azonban nem állnak rendelkezésre adatok a cink transzporterek hüvelyi expressziójáról. Továbbá a korábbi sejtenyésztési és állatkísérletek azt mutatták, hogy a cink transzporterek egy része ösztrogén szabályozott [192, 193].

3. Anyag és módszer

3.1. A résztvevők kiválasztása és a mintagyűjtés

A Debreceni Egyetem, Orvostudományi Kar Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján 2017.05.17. - 2018.04.20. között teljes vastagságú hüvelylal biopsziát, valamint vérvételt végeztünk 32 különböző jóindulatú nőgyógyászati okból (a hüvelyi szöveteket nem érintő) műtéten átesett nő esetében. A mintagyűjtés a Helsinki Nyilatkozat elveit figyelembe véve, a Magyar Nemzeti Intézményi Orvosi Kutatási Tanács jóváhagyásával történt (Etikai engedély száma: 7239-3/2017EIUG). Minden nő írásos formában hozzájárult a kutatásban való részvételhez. A résztvevők a beleegyezés után egyedi azonosítószámot kaptak.

A perifériás teljes vérminták gyűjtése a betegektől azonosító számmal ellátott 10 ml-es BD Vacutainer® K2E (EDTA, etilén-diamin-tetraecetsav) műanyag csövekbe történt. Minden mintát öt 2 ml-es eppendorf csőbe osztottunk szét és -20°C-on tároltuk a további elemzésig.

A szövetminták gyűjtése (hüvelylal biopszia) jóindulatú nőgyógyászati okokból történő hasi vagy hüvelyi hiszterektomia műtétek során történt. A műtétek alatt a hüvely falából három darab körülbelül 0.5 x 0.5 cm-es szövetdarabot távolítottak el. A hüvelyi szövetmintavétel a metszési sebből történt, így a beteg számára ez nem jelentett extra kockázatot és kellemetlenséget, hiszen a műtét során amúgy is eltávolításra került a szövet, és a műtét időtartamát sem növelte érdemi módon.

A mintavételezés standardizált volt, mivel a hüvelyfal összetétele változhat a hüvelyben. Az elülső hüvelyfal standardizált teljes vastagságú biopsziáit a boltozat középvonali területéről Metzenbaum ollóval vágták le [168]. Gondosan elkerülték a hüvelyfal biopsziájának helyszínén fellépő sérülést.

A szöveteket üres és RNA Later oldatot (Thermo Fisher Scientific) tartalmazó polipropilén csövekbe helyezték. A kódolt mintákat a laboratóriumba szállítottuk és legfeljebb egy évig -70°C -on tároltuk az analízisig. Felolvasztás után a mintákat azonnal feldolgoztuk. A mintákat a továbbiakban RNS vizsgálathoz, atomabszorpciós spektrometriai és immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatoknál használtuk fel.

A kiválasztott nőket premenopauzás és posztmenopauzás csoportokra osztottuk. Az összes premenopauzás mintát a menstruációs ciklus proliferációs szakaszában gyűjtötték. A posztmenopauzás nőknél legalább 12 egymást követő hónapos amenorrhéa-t határoztak meg, minden egyéb nyilvánvaló ok nélkül, és / vagy folyamatosan emelkedett a follikulus-stimuláló hormon (FSH) vérszintje 30 mIU/ml vagy annál magasabb értékre.

A kutatásból kizártuk azokat a nőket, akiknél csontritkulás, rák, cinkhiány, terhesség, endometriózis, immunológiai és kötőszöveti betegségek, hüvelyi vagy szisztémás hormonpótló terápia közelmúltban (6 hónapon belül) történő alkalmazása, valamint korábbi pesszárium vagy intrauterin eszköz (IntraUterine device, IUD) használat előfordult. A kizárási kritériumok közé tartoztak a cink étrend-kiegészítőket szedő, cukorbetegségben vagy autoimmun betegségben szenvedő nők is. A pánciensek egyike sem jelezte a cink étrend-kiegészítők alkalmazását. A betegek egyike sem használt nikotintartalmú termékeket, vagy nem fogyasztott felesleges mennyiségű alkoholt. Prospektívan gyűjtöttünk releváns demográfiai és klinikai adatokat egy előre meghatározott adatbázisba.

3.2. Minták laboratóriumi feldolgoása

3.2.1. Cinkszint meghatározása teljes vérben és hüvelyi szövetmintákban ICP-OES módszerrel

A szöveti cinkszintet atomabszorpciós spektrofotometriás vizsgálattal határoztuk meg. A biológiai mintákban a szervesanyag tartalom mellett kicsi a nyomelemek koncentrációja. A kémiai kötésekben előforduló nyomelemek atomabszorpciós spektrofotometriás meghatározásánál különböző előkészítési módszereket alkalmaznak a vizsgálathoz szükséges alak eléréséhez. Általában a szervesanyag teljes mennyiségét eltávolítják és vízben vagy savban oldható formára hozzák a mintában visszamaradó szervesetlen vegyületeket. A nyomelemek meghatározására induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometria (ICP-OES) analitikai módszert alkalmaztunk. A vizsgálat során az adott kémiai elemre jellemző hullámhosszúságú elektromágneses sugárzást bocsátanak ki, amelyet gerjesztett atomokkal és ionokkal hoznak létre induktív csatolású plazma segítségével. Az emittált sugárzás intenzitásából megállapítható a mintában előforduló elem koncentrációja.

A hüvelyszövet és a teljes vér atomabszorpciós vizsgálatának lépéseit korábbi tapasztalataink alapján állítottuk be.

3.2.1.1. A minta előkezelése

A hüvelyszövet mintákat validált analitikai mérlegen mértük le (Precisa ES225-SMDR, Precisa Gravimetrics AG). A laboratóriumi üvegeszközök minden darabját használat előtt 0,1 M salétromsavval (Sigma-Aldrich) és ultratiszta vízzel (MilliQ, Millipore System) átmostuk. A mintákat üveg főzőpoharakba majd szárítószekrénybe helyeztük, hogy állandó tömegig száradjanak. Az elemanalízis előtt a minták száraz tömegének meghatározása

után történt a nedves roncsolás. A mineralizációhoz 4 ml 65% (m/m) salétromsavat (Sigma-Aldrich) adtunk a mintákhoz, és a főzőpoharakat addig melegítettük, amíg a minta teljes feloldódása meg nem történt. Szobahőmérsékletre való visszahűtés után további 1 ml 30% (m/m) hidrogén-peroxidot (Sigma-Aldrich) adtunk hozzá, hogy a maradék szerves anyag oxidációját befejezzük. A minták melegítését a reakció megszűnéséig folytattuk. Az így kapott átlátszó oldatokat ultrahangos fürdő segítségével térfogat-kalibrált műanyag kémcsövekbe veszteségmentesen helyeztük át és 10 ml-re hígítottuk ultratiszta vízzel készített 0,1 M salétromsavval (Merck).

A teljes vérmintákat is nedves roncsolással atmoszférikus nyomáson kezeltük az analízis előtt. 1 ml vért üvegpoharakba mértünk át és elektromos főzőlapon melegítettük 5 ml 65% (m/m) salétromsavval (Sigma-Aldrich) és 1 ml 30% (m/m) hidrogén-peroxid (Sigma-Aldrich) hozzáadásával.

A hidrogén-peroxid hozzáadása előtt 1 ml ultratiszta (Merck) vizet pipettáztunk a savval emésztett száraz mintákra, hogy elkerüljük a túlzott reakciót. Amikor a peroxid által kiváltott intenzív reakció leállt és az oldat átlátszóvá vált, a mintákat műanyag csövekbe öntöttük át úgy, hogy a főzőpoharakat folyamatosan 0,1 M salétromsavval mostuk és 10 ml végtérfogatra hígítottuk. Az összes mintát a hígítás során használt polipropilén csövekben tartottuk és 4°C-on tároltuk a mérésig. A savak tisztaságát minták nélküli csak vegyi anyagokat tartalmazó vakminták emésztésével ellenőriztük.

3.2.1.2. Minősített referencia anyagok

Mesterséges klinikai kontroll tanúsított referencia anyagát (SerormTM, Sero AS) használtuk az elemanalitikai módszer validálásához. A fémeket a tanúsítványban megadott elfogadási tartományon belül mértük (relatív szórás, RSD < 5%).

3.2.1.3. Elemanalízis

Az előkezelt szövet és vérminták elemanalízisét induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometriával végeztük (ICP-OES 5100, Agilent Technologies).

A méréseket SVDV (Synchronous Vertical Dual View) módban hajtottuk végre, amellyel egyidejűleg az axiális és radiális nézet intenzitási adatait is megkaptuk. Automatikus minta bevezetést (SPS 4, Agilent Technologies) alkalmaztunk, illetve a mintákat véletlenszerűen választottuk ki.

A cink kvantitatív elemzése ötpontos kalibrációs görbe létrehozásával történt. A kalibrációs oldatok hígítását 1000 mg/l (ICP szabvány IV, Merck) többelemű standardból 0,1 M salétromsavval (ultratiszta vízben) végeztük.

A hüvelyi szövetek nyomelem koncentrációját milligramm/kilogramm (mg/kg), a teljes vérminták nyomelem koncentrációját pedig milligramm/liter (mg/l) mértékegységgel fejeztük ki.

3.2.2. Génexpressziós vizsgálatok a hüvelyi szövetmintákban

A cink hozzájárul a fehérjeszerkezethez és szabályozza a génexpressziót. A vizsgálatok során mind a hét premenopauzában lévő és a véletlenszerűen kiválasztott hét posztmenopauzában lévő nő teljes vastagságú hüvelyfal mintáiban határoztuk meg mind a ZnT1-10 és ZIP1-14 transzporterek génexpressziós profilját.

3.2.2.1. mRNS extrakció, cDNS átírás

Az RNS izolálásnál az elsődleges szempont, hogy megakadályozzuk az RN-ázok hozzáférését a mintáinkhoz. Az RNS izolálást nagyon tiszta körülmények között, gyorsan és alacsony hőfokon kell elvégezni.

A hüvelyi szövetekből a kísérletek során a minták mRNS izolálására, tisztítására a GenElute Direct mRNA Miniprep Kit-et (Sigma-Aldrich) alkalmaztuk. A kit segítségével közvetlenül a mintákból tudtuk a tiszta mRNS-t izolálni a gyártó utasításai alapján.

A mintákat Minilys Homogenizer készülékkel (Bertin Instruments) homogenizáltuk. A szövetmintákat kivettük az RNAlater Tissue: RNS stabilizáló oldatból (Thermo Fisher Scientific), és gyorsan felszeleteltük, lemértük a szövetdarabokat. Preparációnként 40 mg-ot vágunk le, és átvittük egy 2 ml-es eppendorf csőbe, amely 1,4 mm és 2,8 mm méretű kerámia (cirkónium-oxid) gyöngyök keverékét tartalmazta (szöveti homogenizáló CKMix, Bertin Instruments). 1 ml proteináz K-t tartalmazó Lysis oldatot adtunk hozzá, és azonnal homogenizáltuk, amíg már nem maradtak látható darabok. Megterveztük a hüvelyi szövetminták homogenizálási protokollját a Minilys készülék állati szövetminták feldolgozási lépéseinek javaslatai alapján [I2]. 5000x-es fordulatszámmal 3x20 másodpercig (mp) és 2x10 másodpercig homogenizáltuk a mintákat és minden lépést 15 mp-es szünetekkel szakítottunk meg. A homogenizálás után folytattuk a GenElute Direct mRNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) 3. lépését. Az mRNS kinyerésének maximalizálása érdekében, 100 µl előmelegített Elúciós oldatot pipettáztunk az izolálási végtérfogat eléréséhez. Az mRNS-koncentrációkat (5-10 ng/µl) Qubit[®] 3.0 fluorométerrel határoztuk meg Qubit[™] RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével.

Az RNS izolálást követően a kapott RNS ellenőrzése után tovább dolgoztunk a mintákkal. Ahhoz, hogy a további kísérletekben az RNS analizálható legyen, először át kellett írni komplementer DNS-re (cDNS) reverz transzkriptáz enzim segítségével. A kísérletek során az átíráshoz a Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit-et választottuk ki (Thermo Fisher Scientific). A cDNS mennyiségét Qubit™ ssDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével határoztuk meg a gyártó utasításai szerint. A cDNS mintákat azonnal -20°C-on tároltuk a későbbi valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR) elemzés céljából.

3.2.2.2. Valós idejű PCR elemzés

A valós idejű (real-time) kvantitatív PCR készülék lehetővé teszi az amplifikációs görbék, PCR-kinetikai görbék felvételét, így ciklusról ciklusra nyomon követhetjük a végtermék felszorzódását. Kvantitatív információt az áttörési pont (C_t) adott, amely minden ciklusban azt a ciklusszámot jelentette, ahol a detektált jel exponenciálisan növekedni kezdett. A reakció egy-egy fluoreszcens festékmolekulával (riporter festék) jelölt TaqMan próbával specifikusabbá tehető, amely a polimerizációban nem résztvevő, az egyik szállal komplementer, harmadik oligonukleotid. A TaqMan próbák a fluoreszcens rezonancia energia transzferen (FRET) alapulnak, ezekben az esetekben a riporter festéket és a „quencher” molekulát a szubsztrát oligonukleotidhoz kötik.

A transzporter gének (*SLC30A1-10/ZnT1-10*, *SLC39A1-14/ZIP1-14*) expresszióját a szövetmintákból történő mRNS izolálás után reverz transzkripció kuantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR) segítségével határoztuk meg. Az mRNS jelenléte útmutatást adhat a további célzott vizsgálatok elvégzéséhez. cDNS-sel végeztük az összehasonlító kuantitatív méréseket.

A cink transzporterek próbáit és a referencia gént [194] a Thermo Fisher Scientific-től szereztük be (TaqMan Gene Expression Assay). Minden génre egyedi Taqman próbát alkalmaztunk, a Best coverage assayt választottuk a megbízhatóság érdekében (TaqMan Gene Expression Assay). Az 1. táblázatban felsorolt TaqMan génexpressziós próbákat alkalmaztuk. A cink transzporter gének és a referencia gén (*gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz; GAPDH*) expressziós szintjét valós idejű kuantitatív PCR-rel mértük. Az összes próbát fluorescein (FAM) riporter festékkel és Minor Groove Binder (MGB) molekulával megjelölten kaptuk.

1. táblázat: Cink transzporterek (ZnT és ZIP) TaqMan génexpressziós vizsgálatainak próbái.

	Gén	Próba azonosítója	Festék / jelölés
SLC30A/ZnT géncsalád	<i>SLC30A1/ZnT1</i>	Hs00253602_m1	FAM-MGB
	<i>SLC30A2/ZnT2</i>	Hs00936934_m1	FAM-MGB
	<i>SLC30A3/ZnT3</i>	Hs00900701_g1	FAM-MGB
	<i>SLC30A4/ZnT4</i>	Hs00203308_m1	FAM-MGB
	<i>SLC30A5/ZnT5</i>	Hs00224708_m1	FAM-MGB
	<i>SLC30A6/ZnT6</i>	Hs00398659_m1	FAM-MGB
	<i>SLC30A7/ZnT7</i>	Hs00981941_m1	FAM-MGB
	<i>SLC30A8/ZnT8</i>	Hs00545183_m1	FAM-MGB
	<i>SLC30A9/ZnT9</i>	Hs00197118_m1	FAM-MGB
	<i>SLC30A10/ZnT10</i>	Hs00218883_m1	FAM-MGB
SLC39A/ZIP géncsalád	<i>SLC39A1/ZIP1</i>	Hs00205358_m1	FAM-MGB
	<i>SLC39A2/ZIP2</i>	Hs01113547_g1	FAM-MGB
	<i>SLC39A3/ZIP3</i>	Hs00292942_m1	FAM-MGB
	<i>SLC39A4/ZIP4</i>	Hs01559288_g1	FAM-MGB
	<i>SLC39A5/ZIP5</i>	Hs00379938_m1	FAM-MGB
	<i>SLC39A6/ZIP6</i>	Hs01086822_m1	FAM-MGB
	<i>SLC39A7/ZIP7</i>	Hs00199596_m1	FAM-MGB
	<i>SLC39A8/ZIP8</i>	Hs01061804_g1	FAM-MGB
	<i>SLC39A9/ZIP9</i>	Hs04276955_m1	FAM-MGB
	<i>SLC39A10/ZIP10</i>	Hs01547327_m1	FAM-MGB
	<i>SLC39A11/ZIP11</i>	Hs00911336_m1	FAM-MGB
	<i>SLC39A12/ZIP12</i>	Hs00398303_m1	FAM-MGB
	<i>SLC39A13/ZIP13</i>	Hs00378317_m1	FAM-MGB
	<i>SLC39A14/ZIP14</i>	Hs00299262_m1	FAM-MGB
	<i>GAPDH</i>	Hs02786624_g1	FAM-MGB

A qPCR-t 2 μ l (koncentrációtartomány: 10-15 ng/ μ l) cDNS-templáttal 20 μ L reakcióterfogóban hajtottuk végre, TaqMan Universal PCR Master Mix II no UNG (Thermo Fisher Scientific) mix leírása alapján. StepOnePlus valós idejű PCR készüléket (ABI, Thermo Fisher Scientific) használtunk. Valamennyi mintát triplikátumban amplifikáltuk, valamint negatív (templát nélküli) kontrollvizsgálatokat alkalmaztunk az egyes lemezekben. A PCR körülmények között a bevezető szakasz 50°C 2 perc és 95°C 10 perc volt, a ciklus szakasz pedig 95°C 15 másodperc és 60°C 1 perc volt. A teljes ciklusszám 40 db volt. A protokollt alapbeállításként tartalmazta a StepOne Software v2.3 program.

Az eredményeket a StepOne Software v2.3 segítségével elemeztük. Az egyes vizsgálatok amplifikációs hatékonyságát összehasonlító Ct ($\Delta\Delta$ Ct) módszerrel határoztuk meg. Összehasonlítottuk a célgének (*SLC30A1-10/ZnT1-10* és *SLC39A1-14/ZIP1-14*) és a referencia gén (*GAPDH*) áttörési pontjait (Ct).

3.2.3. Cink transzport fehérjék meghatározása a hüvelyi szövetmintákban IHC módszerrel

A szövetmintákból -70°C-on történő tárolásuk után, a cink transzport fehérjék meghatározására került sor, immunhisztokémiai módszerrel. Kutatásunk során a ZnT9, ZIP4, ZIP6 és ZIP11 fehérjéket határoztuk meg.

Az immunreakciókat 14 db hüvelyi szövetmintán végeztük. A mintafeldolgozás során minden mintából 5-5 db fagyasztott metszetet készítettünk későbbi vizsgálatokhoz, majd a maradék hüvelyszövetet formalinban fixáltuk és paraffinba ágyasztuk. A ZnT9, ZIP4, ZIP6 és ZIP11 immunhisztokémiai vizsgálatát minden esetben formalin fixált paraffinba ágyazott hüvelyi szövetmintán végeztük.

3.2.3.1. Az immunhisztokémiai reakciók standardizálása

Az optimális reakciókörülmények biztosítása érdekében az immunreakciók standardizálását a ZNT9, ZIP4, ZIP6 és ZIP11 antigéneket ismert módon expresszáló veseszöveten, mint pozitív kontroll szöveten végeztük. A pozitív kontroll szövetek kiválasztása az egyes antigének esetében szakirodalmi információk felhasználásával történt [191, 195, 196]. A formalin fixált paraffinba ágyazott vese blokkból 3-4 µm vastag metszeteket készítettünk adhézions tárgylemezre, mely a felszínén pozitív töltéseket hordoz, így segítve elő a metszet rögzülését a tárgylemezre. A metszeteket 37°C-os termosztátban egy éjszakán át szárítottuk. Ezt követően a metszeteket xilollal 4 x 5 percig deparaffináltuk, majd leszálló alkoholsorral (96%-os és 70%-os alkohol: 2 x 2 perc) rehidráltuk és desztillált vízbe helyeztük. Ezután antigénfeltárást végeztünk, amely a formalin fixálás hatására az aminosavak között létrejött keresztkötéseket felhasítja, így az antigén determinánsok (epitópok) hozzáférhetővé válnak az antitestek számára.

Minden fehérje esetében kétféle, egy alacsony (citrát pH6) és egy magas pH-jú (Tris-EDTA pH8 és pH9) feltárási oldatot teszteltünk. A ZNT9 és ZIP6 esetében 11 mM-os pH9-es Tris-EDTA pufferrel vízfürdőben végeztük a feltárást 30 percig 95°C-on. Az antigénfeltárást után a metszeteket desztillált vízben öblítettük, majd az aspecifikus reakciók elkerülése érdekében endogén peroxidáz gátlást végeztünk (3%-os hidrogén-peroxid vizes oldatával 10 percig, szobahőmérsékleten). A ZIP4 és ZIP11 11 mM-os pH8-as Tris-EDTA pufferrel mikrohullámú készülékben végeztük a feltárást 15 percig 700W-on. Mind a négy fehérje esetében 11 mM-os pH6-os citrát pufferrel kuktában tártunk fel túlnyomáson 2 percig.

Ezután desztillált vízben, majd Tris alapú mosópufferben (TBS, pH7,4) öblítettük a metszeteket. Ezt követően a primer antitest aspecifikus szöveti bekötődésének elkerülése érdekében 1%-os (m/m) BSA-val (Bovine Serum Albumin, TBS pufferben oldva, pH7,4) inkubáltuk a metszeteket, majd öblítés nélkül a primer antitest inkubációját végeztük el.

A vizsgált ZNT9, ZIP4, ZIP6 és ZIP11 antitestek nyúlban termeltetett poliklonális antitestek voltak (ZNT9: Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, katalógusszám: PA5-52043; ZIP4: Elabscience Biotechnology Inc., katalógusszám: EPP20204; ZIP6: Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, katalógusszám: PA5-100155; ZIP11: Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, katalógusszám: PA5-20679).

Az immunreakciók standardizálásának kritikus része a megfelelő primer antitest titer meghatározása, ezért a gyártó cég által javasolt hígítási tartomány környékén többféle titert megvizsgáltunk.

A primer antitesteket frissen hígítottuk 1%-os (m/m) BSA-ban és 30 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk a metszeten. A reakciók optimalizálása során vizsgált antigénfeltárási módszerek és primer antitest hígítási arányok kombinációját a 2. táblázat szemlélteti.

2. táblázat: A ZNT9, ZIP4, ZIP6 és ZIP11 antigének standardizálása során alkalmazott antigénfeltáró módszerek és a primer antitestek hígítási arányai

Antigén	Antigénfeltáró módszer	Primer antitest hígítása
ZNT9	citrát puffer (pH6) - kuktában túlnyomáson 2 percig	1:50 1:100
	Tris-EDTA puffer (pH9) vízfürdőben 30 percig 95°C-on	1:50 1:100
ZIP4	citrát puffer (pH6) - kuktában túlnyomáson 2 percig	1:50 1:100 1:150
	Tris-EDTA puffer (pH8) - mikrohullámú készülékben 15 percig 700W-on	1:50 1:150
ZIP6	citrát puffer (pH6) - kuktában túlnyomáson 2 percig	1:50 1:100
	Tris-EDTA puffer (pH9) - vízfürdőben 30 percig 95°C-on	1:50 1:100 1:200
ZIP11	citrát puffer (pH6) - kuktában túlnyomáson 2 percig	1:200 1:400
	Tris-EDTA puffer (pH8) - mikrohullámú készülékben 15 percig 700W-on	1:100 1:200 1:400

A primer antitest inkubációja után a metszeteket TBS pufferben öblítettük (3 x 5 perc), majd a detektáló reagens inkubációja következett. Ez kecskében termeltetett anti-egér és anti-nyúl szekunder antitestet egyaránt tartalmazó tormaperoxidázzal (HRP, HorseRadish Peroxidase) konjugált polimer alapú detektáló (MACH4, Biocare Medicals Inc), mellyel 30 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk a metszeteket. A nem kötődött szekunder antitestek eltávolítása érdekében TBS mosópufferrel öblítettük a metszeteket (3 x 5 perc), majd a reakció vizualizálása következett DAB kromogénnel (Diamino-benzidin, Dako Agilent Technologies).

A reakció előhívása során a metszetekben található ZNT9, ZIP4, ZIP6 és ZIP11 antigének lokalizációjában a DAB kromogén hatására barna színreakció alakult ki. Az előhívó DAB reagenst 10 percig inkubáltuk a metszeten és a reakció sikerességét fénymikroszkóppal ellenőriztük. A reakciót desztillált vízben állítottuk le. Előhívás után a metszeteken hematoxin (VWR International Kft.) magfestést végeztünk 10 másodpercig, majd a metszeteket víztelenítettük (2-2 perc 70%-os és 96%-os alkohol, 3 x 2 perc acetone, 2 x 2 perc xilol) és lefedtük Pertex-et alkalmazva (Histolab).

A ZNT9, ZIP4, ZIP6 és ZIP11 immunreakciók standardizálása során a primer antitest elhagyásával negatív kontrollokat is alkalmaztunk.

3.2.4. Cink transzport fehérjék egyedi nukleotid polimorfizmusainak meghatározása

Az általunk vett vérmintákból a *SLC30A/ZnT1-10* és a *SLC39A/ZIP 1-14* gének polimorfizmusát határoztuk meg.

Az egyedi polimorfizmusok meghatározását a szakirodalomban ismert eljárások közül kapillaris gelelektroforézissel, PCR amplifikációval valamint szekvenálással valósítottuk meg.

3.2.4.1. DNS extrakció teljes vérből

Genomi DNS izolálásánál több dologra is ügyelni kell, például arra, hogy a DNS minél kevésbé törjön össze és nagyon fontos követelmény a DNáz-mentesség biztosítása, amit megfelelő összetételű pufferrel biztosítottunk.

A teljes vérből való genomiális DNS-extrakcióhoz Blood DNA Isolation Mini Kit-et (Norgen Biotek) használtunk, a gyártó által megadott utasítások szerint, így közvetlenül a vérmintákból voltunk képesek a tiszta gDNS izolálására.

A tisztítás Spin Column kromatográfias technológián, mint elválasztó mátrixon alapul. A Norgen oszlopa az optimális só koncentrációk alatt megköti a DNS-t, és a kötött DNS-t alacsony só és kissé lúgos körülmények között szabadítja fel.

A tisztított genomi DNS teljes mértékben emészthető az összes vizsgált restrikciós enzimmel és teljesen kompatibilis a későbbi downstream alkalmazásokkal, beleértve a PCR-t is.

3.2.4.2. A gDNS mennyiségi meghatározása

A Qubit[®] 3.0 fluorométerhez használható Qubit[®] dsDNA HS Assay Kittal (Thermo Fisher Scientific) határoztuk meg a gDNS koncentrációt. Ez egy pontos és szelektív módszer a nagyszámú minták DNS mennyiségének meghatározására. A módszer igen érzékeny és szelektív a dsDNS-re, így a készlet nem alkalmazható RNS, fehérje vagy szabad nukleotidok koncentrációinak mérésére. Az assay jól „tolerálja” a mintákban gyakran előforduló szennyezőanyagokat (sók, szabad nukleotidok, oldószerek, detergens). A Qubit[®] DNA HS (High Sensitivity) vizsgálati készlet mérései sokkal jobb jelzést adnak a minta tisztaságára vonatkozóan, mint az A260/A280 arány elemzése. A méréshez szükséges minta mennyisége a protokollok alapján különböző lehet, 1 µl - 20 µl között változhat.

Esetünkben:

2 µl minta esetében = 198 µl Qubit[™] munkaoldat + 2 µl minta

A kit segítségével a gyártó utasításai alapján határoztuk meg a gDNS koncentrációt.

3.2.4.3. Új primer párok tervezése polimeráz láncreakciókhoz

A polimeráz láncreakciókhoz (PCR) általában két speciális szekvenciájú oligonukleotid (primer) szükséges, amely közrefogja az amplifikálni kívánt DNS szakaszt.

A vérből izolált DNS minták ZnT és ZIP fehérjék szekvenciáinak tanulmányozására különböző primerek tervezésére volt szükség. Minden cink transzporter gén minden exonját megvizsgáltuk (National Center for Biotechnology Information, NCBI), kiválasztottuk azokat a régiókat, amelyek nagy számban tartalmaznak misszensz mutációkat, és ezeket a régiókat összehasonlítottuk a rendelkezésre álló Thermo Fisher Scientific TaqMan SNP genotipizáló próbáival [I3, I4]. Új primereket terveztünk minden olyan hosszabb exonra, amelyek több misszensz mutációt tartalmaztak és alkalmasnak tűntek megbízható hosszúságú PCR-fragmensek előállítására a szekvenáláshoz. A tervezett szakaszok hossza 100 és 276 bp közé esett. A humán *SLC30A/ZnT* és *SLC39A/ZIP* génszekvencia összehasonlításokhoz és a primerek fejlesztéséhez az NCBI-BLASTN [I4] elemzéseket, valamint az ENSEMBL webes felületet alkalmaztuk [I5].

3.2.4.4. PCR amplifikáció

A PCR-amplifikációkat 25 µl végtérfogatban hajtottuk végre a StepOnePlus (Applied Biosystems) és iCycler (Bio-Rad) készülékek segítségével. Az amplifikáció összeméréséhez a DreamTaq PCR Master Mix-et (2X) (Thermo Fisher Scientific) használtuk az útmutató utasításainak megfelelően, és minden reakcióhoz 1 µl (koncentrációtartomány: 15-30 ng/l) teljes genomiális DNS-t adtunk. A ciklusparaméterek azonosak voltak, azzal a különbséggel, hogy a primer annealációs hőmérsékletét minden primer pár esetén optimalizáltuk (3-4. táblázat).

A 24 db génhez huszonnégy primerpárt használtunk, melyek helyzetét (3-4. táblázat) a gén első nukleotidjától számoltuk. A negatív kontrollokat az előbbiekben leírt módon hajtottuk végre, de DNS templát nélkül.

A ciklusok futási beállításait a korábbi tapasztalataink alapján optimalizáltuk és a következő paraméterekkel végeztük: kezdeti denaturálási lépés (95°C 2 perc), melyet 35 ciklus követett, amely egy denaturálási lépést (95°C 30 mp), egy primer annealációs lépést (30 mp) (az egyes primer párokra jellemző hőmérsékleten), és egy extenzió lépést (72°C 1 perc) tartalmazott. A végső extenzió 72°C-on 10 percig tartott.

A primer szekvenciákat és a primerek PCR-reakcióhoz optimalizált annealációs hőmérsékletét a 3. és 4. táblázat tartalmazza.

3. táblázat: Az SNP-k azonosításához szükséges paraméterek az SLC30A/ZnT géncsaládban

Sorszám	Gén	Referencia szekvencia	Régió	Primerek elhelyezkedése	Primerek a PCR reakcióhoz	PCR termékhossz (bp)	Annelációs hőmérséklet (°C)
1.	<i>SLC30A1/ZnT1</i>	NM_021194.2	Exon 1	1442-1617	Forward: TGTGAACTTGCCTGCAGAAC Reverse: ACAGCAGGGATGTTTTACAGC	176	56
2.	<i>SLC30A2/ZnT2</i>	NM_001004434.2	Exon 5	815-951	Forward: AATGGGGTTGACCCCTTACC Reverse: CCACTAGGACACCCATGCTC	137	52
3.	<i>SLC30A3/ZnT3</i>	NM_001318949.1	Exon 5	745-887	Forward: GGGTCTAGGGGAGCAGAGTAT Reverse: AGGATGGAGGCAGCCAGTA	143	54
4.	<i>SLC30A4/ZnT4</i>	NM_013309.5	Exon 7	1313-1443	Forward: GTGTGCCAAGCCATTTGAATGTA Reverse: GCTGTATGTGAACTATGGCAGT	132	55
5.	<i>SLC30A5/ZnT5</i>	NM_022902.4	Exon 8	1097-1318	Forward: GTGGAGTCTTGGTTTTCTCTCA Reverse: CTGGTGTGCTGCTTTGTTC	222	50
6.	<i>SLC30A6/ZnT6</i>	NM_001330476.1	Exon 12	863-1111	Forward: GCCTTATTGTCTGGGCCTGT Reverse: GCTGCTGTAAGGTGTGTGTC	249	53
7.	<i>SLC30A7/ZnT7</i>	NM_001144884.1	Exon 6	701-800	Forward: CGGACACAGTCATTCCCTCT Reverse: GCTATGTGCAGCACCATGTTT	100	53
8.	<i>SLC30A8/ZnT8</i>	NM_173851.2	Exon 2	309-498	Forward: CTCCAACAGAAACCGGTGAATA Reverse: CGACCTCTGCAATCATGAAAATG	190	55
9.	<i>SLC30A9/ZnT9</i>	NM_006345.3	Exon 15	1426-1543	Forward: CTTTGGGTGTGGGCACCTTA Reverse: AGGAGTTCAGTGAGCCGTTG	118	57
10.	<i>SLC30A10/ZnT10</i>	NM_018713.2	Exon 4	1367-1573	Forward: GACTTGAAGGAACCCCTGGA Reverse: AGCCACTTCTCTTGCCTCTC	207	53

4. táblázat: Az SNP-k azonosításához szükséges paraméterek az SLC39A/ZIP géncsaládban

Sorszám	Gén	Referencia szekvencia	Régió	Primerek elhelyezkedése (bp)	Primerek a PCR reakcióhoz	PCR termékhossz (bp)	Annelációs hőmérséklet (°C)
1.	SLC39A1/ ZIP1	NM_001271959.1	Exon 4	879-1053	Forward: CTTGCGTGCCTGTGTACTG Reverse: CCTAAGGTGGCTCTGCAAC	175	57
2.	SLC39A2/ ZIP2	NM_014579.3	Exon 4	492-742	Forward: GGAGTATCCCTATGGAGAGC Reverse: CCACAGCTAGCCCTTCAAAC	251	51
3.	SLC39A3/ ZIP3	NM_144564.4	Exon 2	273-436	Forward: GCCAAAATCCTGTGCATGGT Reverse: TTGAAGCACGTGGCCAGAAA	164	53
4.	SLC39A4/ ZIP4	NM_017767.2	Exon 1	422-628	Forward: CTCACTTGTCTCTGCCCAACA Reverse: GAGGTGGTCTGCATGAGAGG	207	57
5.	SLC39A5/ ZIP5	NM_173596.2	Exon 4	269-544	Forward: CCCAGTGAGTCATCTGCTG Reverse: CTGTGTGTGGAATTGTCTGC	276	55
6.	SLC39A6/ ZIP6	NM_012319.3	Exon 2	416-690	Forward: TGGCATTAAATGTTGACTTGG Reverse: GATTATGGTGAGAGTGATGATC	275	50
7.	SLC39A7/ ZIP7	NM_006979.2	Exon 1	523-779	Forward: CACGACGATCTGCAAGAGGA Reverse: GACTCCCCATAGCCTCCAT	257	57
8.	SLC39A8/ ZIP8	NM_022154.5	Exon 6	1445-1577	Forward: ATGATAACGCTCTGCGATGC Reverse: CTAACCTCGTGGGGAAACTCC	133	55
9.	SLC39A9/ ZIP9	NM_001252150.1	Exon 3	908-1069	Forward: GAAAACACCACCAAGCAAGT Reverse: CCACCAGCAACATGAAAACG	162	55
10.	SLC39A10/ ZIP10	NM_001127257.1	Exon 2	484-749	Forward: CCTTGGAGAGAGAAAAGTAGT Reverse: GTAGGCGGTGATTATGGTC	266	52

Sorszám	Gén	Referencia szekvencia	Régió	Primerek elhelyezkedése (bp)	Primerek a PCR reakcióhoz	PCR termékhossz (bp)	Annelációs hőmérséklet (°C)
11.	<i>SLC39A11/ZIP11</i>	NM_001159770.1	Exon 10	1071-1193	Forward: ATGGGAAACTGGCATCCTG Reverse: ACTGCTGTTTCTTCGTATGGC	123	51
12.	<i>SLC39A12/ZIP12</i>	NM_001145195.1	Exon 2	278-524	Forward: GCTTCCGGACAAAGCTCTC Reverse: TCTCCTTGCATTCCGTTTCTC	247	55
13.	<i>SLC39A13/ZIP13</i>	NM_001128225.2	Exon 2	311-477	Forward: CTGTCGCCTGGACAACAAGG Reverse: CTTCTGAGCGCAGCATGGTC	167	57
14.	<i>SLC39A14/ZIP14</i>	NM_001135154.2	Exon 2	241-464	Forward: TGACCCTGCTTGGCTTATGG Reverse: CGTGGAGAGGTTCTGTGTC	224	52

3.2.4.5. PCR termékek ellenőrzése gélelektroforézissel

Az elektroforézis egy olyan elválasztási technika, amely az ionok elektromos térbeni mozgékonyaságán alapul. A kapilláris gélelektroforézist biológiai makromolekulák méret szerinti szétválasztására alkalmazzák. A kapilláris gél-töltet megakadályozza az elektroosmotikus áramlást. A PCR-termékek sikeres amplifikációját követően QIAxcel készülékben (Qiagen) DNA Screening Gel patron segítségével ellenőriztük. Az elválasztást ezzel az előre gyártott gélpatronnal hajtottuk végre. A negatív töltésű nukleinsavmolekulák a kapilláris pozitív töltésű részeihez vándorolnak. A molekulák láthatóvá tétele a patronba töltött etídium-bromid segítségével történik. A QIAGEN QIAxcel rendszer előnye, hogy teljes mértékben automatizált, a termékek láthatóvá tételét és kiértékelését Screenging szoftver (Qiagen) segítségével végeztük el.

A DNS szakasz méretének és koncentrációjának meghatározásához QIAxcel Screening Kit-et alkalmaztunk, AM320 protokollra beállítva. A genomi markerek vizsgálata esetén 15bp - 1000bp mérettartományt átfogó QX Alignment Markert és 50bp - 800bp mérettartományú QX DNA Size Markert használtunk.

Ellenőrzésként a DNS-fragmenseket hagyományos elektroforézissel is elválasztottuk 2%-os agarózgélben, etídium-bromiddal festettük és UV-fény alatt CCD-kamerával fényképeztük.

3.2.4.6. Szekvenciaelemzés

A PCR-termékeket EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit-tel (Bio Basic Inc.) tisztítottuk. A tisztított PCR-termékeket a Macrogen és a Thermo Fisher Scientific vállalat szekvenálta. A szekvenáltatást az amplifikációhoz használt primerekkel végeztük (3-4. táblázat).

A szekvenálandó oldalt a feltételezett misszensz mutációk exonon belüli elhelyezkedése alapján választottuk ki.

A direkt szekvenálásból származó összes kromatogramot vizuálisan ellenőriztük. A szekvenciák elektroferogramjait Trev, Pregap4 és Gap4 program [197] alkalmazásával elemeztük, és a Clustal Omega [198] használatával igazítottuk a referencia szekvenciákhoz. A nukleotid változatokat GeneDoc és SnapGene szoftverekkel vizualizáltuk. Az SNP-k azonosítását az NCBI genom böngészőjének Variation Viewer alkalmazásával végeztük [14].

3.3. Statisztikai analízis

3.3.1. Cinkkoncentráció elemzése

A cinkszint adatok statisztikai elemzéseikhez a SigmaStat (Systat Software)/SPSS szoftvert (IBM) használtuk. Student t-tesztet alkalmaztunk (paraméteres adatok) a szintek között mutatkozó különbségek értékelésére. A különbségeket szignifikánsnak tekintettük, ha a p-érték kisebb, mint 0,05.

A vérben lévő cinkkoncentrációk, a hüvelyszövet szintjei, valamint a betegek kora közötti összefüggéseket Pearson-féle korrelációs együtthatóval fejeztük ki. Többszörös lineáris regressziót végeztünk a hüvelyszövet cinkszintjének jóslására az életkor, a menopauzás állapot, a hüvelyi szülések (hüvelyi paritások) száma és a vér cinkszint alapján, amelyekben a hüvelyi szövet cinkszintje volt a függő változó, az életkor, a menopauza állapota, a hüvelyi szülések és a vér cinkszintje pedig a független változó. Akkor tekintettük szignifikánsnak a különbségeket, ha a p-érték kisebb volt, mint $\alpha = 0,05$. Eredményeink adatait átlag értékekkel \pm szórással mutattuk be.

A mintaméret kiszámítását a G* Power 3.1.9.7 Statisztikai szoftverrel végeztük (Heinrich Heine Egyetem). A következő paramétereket használtuk: a hatás nagysága 0,3, a tesztelt prediktorok száma 1 és a prediktorok teljes száma 4, R^2 pedig 0,4 (előzetes adatok alapján). A 80%-os teljesítmény eléréséhez 5% szignifikanciaszint mellett 29 nőből álló minta szükséges.

3.3.2. Génexpressziós és immunhisztokémiai eredmények elemzése

A génexpressziós vizsgálatokból kapott normális eloszlású adatokat összehasonlítottuk a Student t-tesztel, ha a minta eloszlás aszimmetrikus volt, akkor a Mann-Whitney U-próbát alkalmaztuk. A függő tesztek kombinálásához szükséges harmonikus átlag p-értéket alkalmaztuk a többszörös összehasonlításhoz [199]. A génexpresszió különbségeit ezért akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p-érték kevesebb, mint 0,039. Az összes statisztikai számítást az SPSS szoftver (SPSS Inc) segítségével végeztük. A kvantitatív eredményeket az átlagértékek \pm szórás alkalmazásával írtuk le, ha másképp nem volt meghatározva.

A minták méretének kiszámítása a kísérleti *SLC30A9/ZnT9* mRNS expressziós adatok alapján történt. Elvégeztük a *SLC30A9/ZnT9* kezdeti RT-PCR analízisét, és megállapítottuk, hogy premenopauzás nőknél az átlagos expressziós szint értéke 1,1 volt, szórás értéke 0,3. Feltételezve, hogy a posztmenopauzás nőknél az mRNS expressziója 40%-kal csökken, úgy becsültük, hogy 12 betegből álló mintaméret szükséges a 80%-os teljesítmény eléréséhez 5%-os szignifikancia szint mellett.

3.3.3. Egyedi nukleotid polimorfizmusok elemzése

A cink koncentrációjának és az SNP-k számának összefüggéseinek értékelésére a SISA Quantitative Skills szoftvert használtuk, valamint Fisher-egzakt tesztet alkalmaztunk. Az alacsony vércinkszintet ≤ 5 mg/l-ben határoztuk meg, amely a teljes vér cink koncentrációjának normális tartománya (4,4 - 8,6 mg/l) alatt van 10%-kal [200]. Mivel az irodalomban nincs adat arról, hogy mi a hüvelyszövetben a „normális” cinkszint értéke, a cink koncentrációját ≤ 50 mg/kg-nak választottuk alacsony cink hüvelyi szövetszintnek és magas cink hüvelyi szövetszintnek pedig az 50 mg/kg feletti értéket a mellszöveti adatokra alapul véve [201].

4.Eredmények

4.1. Atomabszorpciós eredmények

Kutatásunk során 32 nő szövet- és vérmintáit vizsgáltuk meg. A résztvevő személyek klinikai és demográfiai jellemzői az 5. táblázatban találhatóak.

5. táblázat: A menopauza előtti és a posztmenopauzás nők klinikai és demográfiai jellemzői

Jellemzők	Eredmények
Kor (év, átlag, SD)	62,5 ± 13,11
Premenopauzás státusz, <i>n</i> (%)	7 (21, 87 %)
Premenopauzás kor (átlag, szórás)	44,4 ± 9,1
Posztmenopauzás státusz, <i>n</i> (%)	25 (78, 13 %)
Posztmenopauzás kor (átlag, szórás)	67,6 ± 8,9
Terhességek száma (átlag, szórás)	2,78 ± 1,26
Szülések száma (átlag, szórás)	2,18 ± 1,14
BMI (testtömegindex) (átlag, szórás, kg/m ²)	28,41 ± 4,78

A cinkkoncentrációkat mind a premenopauzás, mind a posztmenopauzás nőkben elemeztük és rögzítettük a vonatkozó klinikai információkat (életkor, menopauza állapota, hüvelyi paritás).

Amint az várható volt, a posztmenopauzás csoportban lévő nők szignifikánsan idősebbek voltak a premenopauzás csoporthoz képest (átlag ± szórás, 68 ± 9 év vs. 44 ± 8 év, $p < 0,01$). A pre- és posztmenopauzás nők között a vérben nem találtunk szignifikáns cinkszint különbséget (átlag ± szórás, cink 5,08 ± 0,62 mg/l vs. 4,75 ± 0,87 mg/l). Adataink nem mutattak

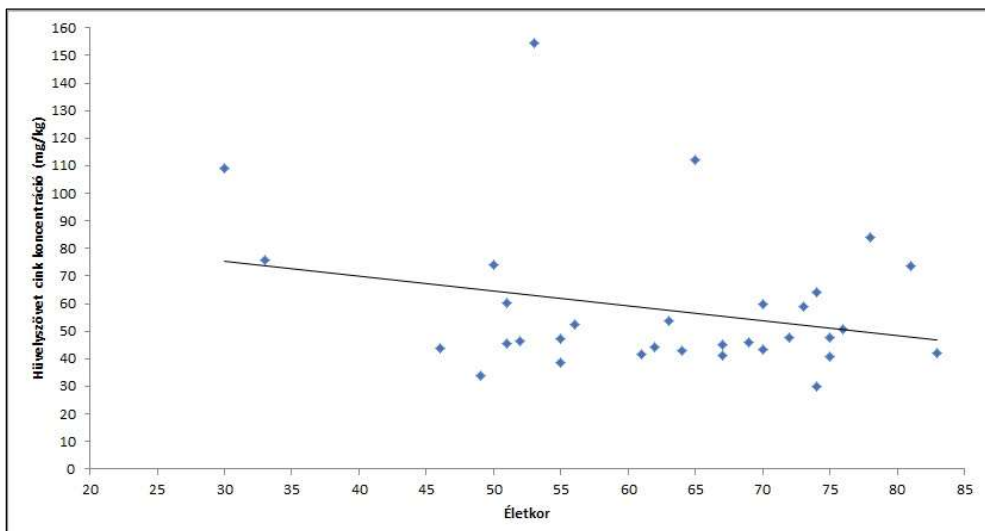
szignifikáns különbséget a menopauza előtti és a posztmenopauzában lévő nők hüvelyi szövet cinkszintjei között sem (átlag ± szórás, $61,26 \pm 24,04$ mg/kg vs. $56,92 \pm 25,92$ mg/kg).

A 6. táblázat a vizsgálatban résztvevő 32 személy cinkszintjének átlag értékeit mutatja a hüvelyi szövetben és a teljes vérben.

6. táblázat: Cinkszint a teljes vérben és a hüvelyi szövetben

		Zn átlag (szórás)
Nők (n=32)	Szövet (mg/kg)	57,86 (26,09)
	Teljes vér (mg/l)	4,84 (0,82)

A teljes vér cinkszintje nem korrelált a beteg életkorával ($r = 0,01$ és $r = -0,11$, $p = \text{NS}$). A hüvelyszövet cinkszintje és az életkor között azonban negatív korrelációt találtunk ($r = -0,27$, $p = 0,04$) (7. ábra).



7. ábra: A hüvelyszövet cinkszintje és az életkor közötti korreláció

Többszörös lineáris regresszió számítását végeztünk a hüvelyi szövet cinkszintjének megjósolására az életkor, a menopauza, a hüvelyi szülések száma, valamint a vér cinkszintje alapján. Az összes vizsgált változót (életkor, menopauza állapota, hüvelyi szülések, valamint a vér cinkszintje) belefoglaltuk a regressziós modellbe. Jelentős regressziós egyenletet találtunk ($F(4, 27) = 4,4$, $p = 0,006$), ahol az R^2 értéke 0,4 volt. A többszörös lineáris regressziós modell azt mutatta, hogy a cink hüvelyszöveti szintjének esetében csak az életkor maradt az egyetlen szignifikáns előrejelző [$p = 0,03$, 95% CI: -2,28 – (-0,06)] változó.

4.2. Génexpresszió analízis eredményei

Azért, hogy összehasonlíthassuk a pre- és posztmenopauzában lévő nők génkifejeződésének értékeit, 14 mintát vontunk be a génexpressziós és az immunhisztokémiai vizsgálatainkba. A résztvevő nők klinikai és demográfiai jellemzőit a 7. táblázat ismerteti. A várakozásoknak megfelelően a posztmenopauzás csoportban a nők szignifikánsan idősebbek voltak a premenopauzás csoporthoz képest (átlag \pm szórás, $61,7 \pm 10,4$ év vs. $44,4 \pm 9,1$ év, $p < 0,01$). A teljes vérminták cink koncentrációját is megvizsgáltuk az említett csoportokban, de a posztmenopauzás csoportban mért cinkkoncentrációk nem különböztek szignifikánsan a premenopauzás csoport koncentrációs eredményeitől (7. táblázat).

7. táblázat: A résztvevő pre- és posztmenopauzás nők klinikai és demográfiai jellemzői

	Posztmenopauzás csoport (n = 7)	Premenopauzás csoport (n = 7)	p-érték
Kor (átlag ± szórás)	61,7 ± 10,4	44,4 ± 9,1	0,006
Terhesség (közéérték, tartomány)	4 (2-7)	3 (1-5)	0,307
Szülés (közéérték, tartomány)	3 (2-7)	2 (1-3)	0,357
Testtömegindex (átlag ± szórás)	27,7 ± 3,6	28,4 ± 4,9	0,786
Teljes vér cinkszint (mg/l, átlag ± szórás)	5,02 ± 0,28	5,09 ± 0,68	0,811
Hormonterápia (n, %)	0	0	-

Ezek után, sikeresen izoláltuk minden hüvelyi szövetmintából a qPCR reakciókhoz szükséges mRNS mintákat.

A vizsgálatok során mind a 24 gén (*SLC30A1-10/ZnT1-10* és *SLC39A1-14/ZIP1-14*) expresszióját meghatároztuk a szövetmintákban. A kapott értékekből megállapítható, hogy mind a 24 gén kifejeződik mind a menopauza előtti, mind a posztmenopauzás nők hüvelyszöveteiben (8-9. táblázat).

8. táblázat: A cink transzporterek családjába tartozó ZnT (SLC30A) transzporterek mRNS-expressziója a hüvelyi szövetekben

	Gén	Posztmenopauzás csoport (n = 7)	Premenopauzás csoport (n = 7)	p-érték
SLC30A/ZnT mRNS expresszió (átlag ± szórás, RQ) ^a	<i>SLC30A1/ZnT1</i>	29,90 (52,65)	113,78 (92,18)	0,058
	<i>SLC30A2/ZnT2</i>	1,02 (1,51)	1,24 (2,08)	0,824
	<i>SLC30A3/ZnT3</i>	16,08 (19,90)	2,95 (3,22)	0,111
	<i>SLC30A4/ZnT4</i>	96,43 (140,61)	410,59 (304,34)	0,029
	<i>SLC30A5/ZnT5</i>	0,71 (0,40)	1,13 (0,37)	0,066
	<i>SLC30A6/ZnT6</i>	1,10 (0,38)	1,02 (0,42)	0,724
	<i>SLC30A7/ZnT7</i>	59,85 (44,98)	88,72(58,09)	0,319
	<i>SLC30A8/ZnT8</i>	2,28 (5,17)	0,99 (1,38)	0,536
	<i>SLC30A9/ZnT9</i>	0,62 (0,39)	1,13 (0,31)	0,019
	<i>SLC30A10/ZnT10</i>	74,98 (112,88)	13,01 (13,34)	0,175

a - RQ = Relative quantification, StepOne Software v2.3 alapján.

9. táblázat: A cink transzporterek családjába tartozó ZIP (SLC39A) transzporterek mRNS-expressziója a hüvelyi szövetekben

	Gén	Posztmenopauzás csoport (n = 7)	Premenopauzás csoport (n = 7)	p-érték
SLC39A/ZIP mRNS expresszió (átlag ± szórás, RQ) ^a	<i>SLC39A1/ZIP1</i>	2,25 (1,39)	2,06 (1,00)	0,778
	<i>SLC39A2/ZIP2</i>	1,11 (0,61)	2,29 (1,20)	0,038
	<i>SLC39A3/ZIP3</i>	2,32 (1,90)	15,82 (12,97)	0,018
	<i>SLC39A4/ZIP4</i>	1,52 (1,07)	3,21 (3,02)	0,188
	<i>SLC39A5/ZIP5</i>	1,91 (2,54)	0,57 (0,46)	0,193
	<i>SLC39A6/ZIP6</i>	1,10 (0,80)	5,73 (4,72)	0,025
	<i>SLC39A7/ZIP7</i>	2,31 (1,47)	3,07 (2,17)	0,455
	<i>SLC39A8/ZIP8</i>	0,98 (0,54)	2,21 (3,79)	0,410
	<i>SLC39A9/ZIP9</i>	43,09 (24,61)	52,03 (23,15)	0,497
	<i>SLC39A10/ZIP10</i>	1,05 (0,64)	1,02 (0,61)	0,927
	<i>SLC39A11/ZIP11</i>	1,21 (0,35)	1,86 (1,34)	0,238
	<i>SLC39A12/ZIP12</i>	0,23 (0,40)	2,62 (6,77)	0,367
	<i>SLC39A13/ZIP13</i>	3,40 (2,56)	1,49 (1,19)	0,098
	<i>SLC39A14/ZIP14</i>	3,56 (4,06)	1,30 (1,66)	0,197

a - RQ = Relative quantification, StepOne Software v2.3 alapján.

Az *SLC30A4/ZnT4* és az *SLC30A9/ZnT9* mRNS expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a posztmenopauzás nőknél, mint a premenopauzás nők szöveteiben (átlag ± szórás mRNS expresszió relatív egységekben, $96,43 \pm 140,61$ vs. $410,59 \pm 304,34$, $p = 0,03$ és $0,62 \pm 0,39$ vs. $1,13 \pm 0,31$, $p = 0,02$) (8. táblázat).

Hasonlóképpen, az *SLC39A2/ZIP2*, *SLC39A3/ZIP3* és *SLC39A6/ZIP6* gének mRNS expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a posztmenopauzás nőknél, mint a premenopauzás nők mintáiban (átlag \pm szórás mRNS expresszió relatív egységekben, $1,11 \pm 0,61$ vs. $2,29 \pm 1,20$, $p = 0,04$; $2,32 \pm 1,90$ vs $15,82 \pm 12,97$, $p = 0,02$ és $1,10 \pm 0,80$ vs. $5,73 \pm 4,72$, $p = 0,03$) (9. táblázat).

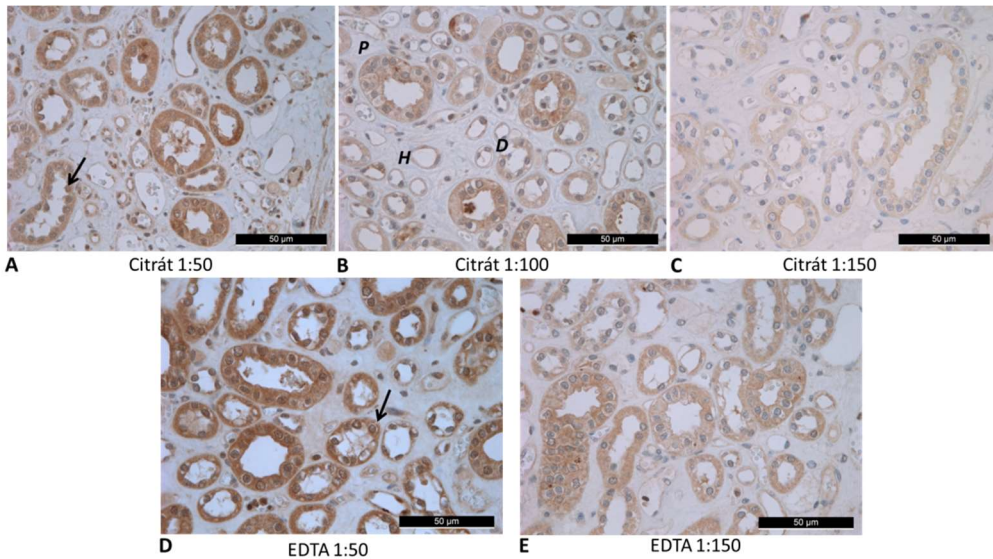
Nem találtunk azonban szignifikáns különbséget az *SLC30A1-3/ZnT 1-3*, az *SLC30A5-8/ZnT 5-8* és az *SLC30A10/ZnT10* gének, valamint az *SLC39A1/ZIP1*, *SLC39A4-5/ZIP4-5* és *SLC39A7-14/ZIP7-14* mRNS-expressziójában a pre- és posztmenopauzás nők között (8-9. táblázat). Az *SLC30A1/ZnT1* és *SLC30A4/ZnT4* gének, valamint az *SLC39A3/ZIP3*, *SLC39A6/ZIP6* és *SLC39A9/ZIP9* gének mRNS expressziója magasabb volt, mint a többi *SLC30A/ZnT* és *SLC39A/ZIP* gén expressziója.

4.3. Az immunreakció standardizálásának eredményei

Korábbi tanulmányok arról számoltak be, hogy a ZnT9, ZIP4, ZIP6 és ZIP11 antigének különböző szövetekben expresszálódnak [191, 196]. Vese szövetet alkalmaztunk ezen antitestek immunválaszának optimalizálására a megfelelő antigénfeltárási módszer és az elsődleges antitest titer meghatározásához.

A ZIP4 immunreakció optimalizálása során a nagy koncentrációban (1:50) alkalmazott primer antitest fals pozitív eredményt adott az endotél sejtek, valamint a tubulus hámsejtek sejtmagjában mindkét feltárási esetén (8. A és D ábra). A ZIP4 immunhisztokémiai reakció optimalizálásának további eredményei azt mutatták, hogy a ZIP4 fehérje valamennyi tubulushám citoplazmájában kimutatható, így a proximális, a disztális tubulusban, a gyűjtőcsatornában és a Henle-kacsban is, közel azonos intenzitással (8. B ábra). Ugyanakkor citrátos feltárást követően 1:150 hígítást alkalmazva

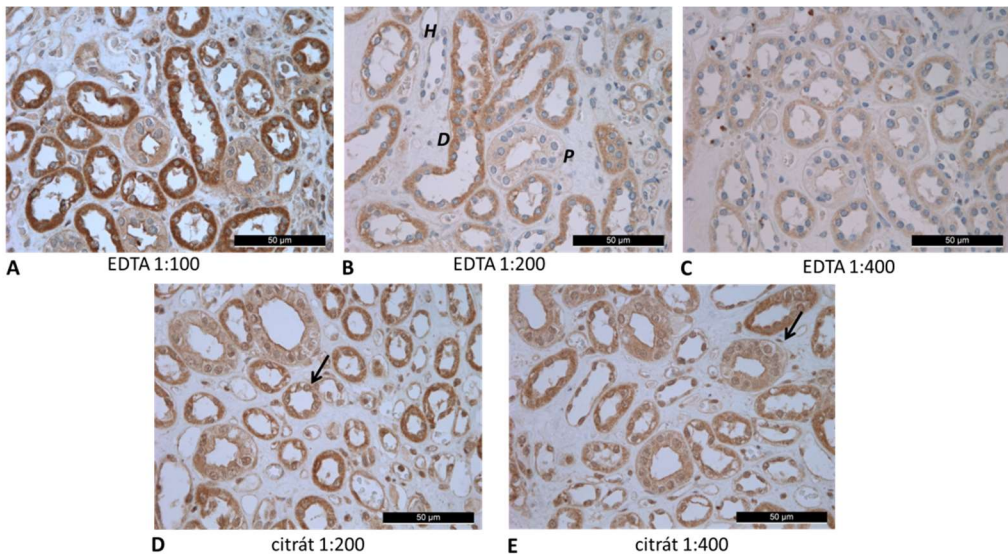
nehezen értékelhető, gyenge reakciókat kaptunk (8. C ábra). Kontrasztos, optimális színintenzitást a citrát 1:100 és EDTA 1:150 kombinációk esetén kaptunk (8. B és E ábra), viszont a hüvelymintákon végzett későbbi vizsgálatokban a Tris-EDTA feltárás rendre háttérreakciókat eredményezett, ezért a ZIP4 fehérje immunhisztokémiai vizsgálatára optimális reakciókörülménynek egyértelműen a citrát feltárás és a primer antitest 1:100 titere bizonyult (8. B ábra).



8. ábra: ZIP4 immunreakció standardizálása, barna színnel a ZIP4 fehérje lokalizációja azonosítható (400x). **A)** citrát 1:50. **B)** citrát 1:100 (P: proximális tubulus, D: disztális tubulus, H: Henle-kacs). **C)** citrát 1:150. **D)** EDTA 1:50. **E)** EDTA 1:150. Nyíllal jelölten a tubulushámsejtek fals pozitív magi expressziója látható.

A ZIP11 immunreakció optimalizálása során a töményebb antitest (1:100) esetén jelentős aspecifikus háttérfestődés volt megfigyelhető (9. A ábra). A ZIP11 immunreakciók további értékelése során a különböző vesetubulusokban eltérő expressziós intenzitásokat tapasztaltunk: közepesen intenzív citoplazmatikus reakciót a disztális csatornák sejtjeiben tapasztaltunk, míg a

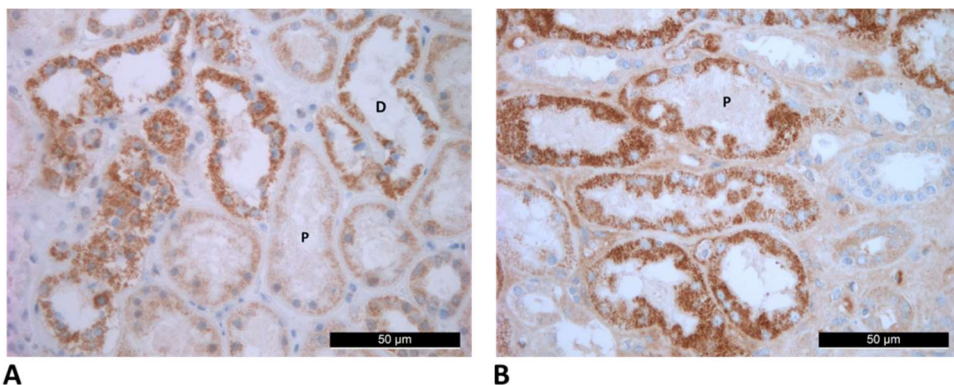
proximális tubulusban, a Henle-kacsban és a gyűjtőcsatornában gyenge citoplazmatikus színintenzitás, expressziós szint volt megfigyelhető (9. B ábra). Az alacsonyabb antitest koncentráció (1:400) esetén a kettős színintenzitást nehezen lehetett elkülöníteni (9. C ábra). Az alacsony pH-jú feltáró oldatot egyértelműen ki lehetett zárni a lehetséges feltáró módszerek közül, ugyanis citrát pufferes feltárást követően a primer antitest kis koncentrációban (1:400) történő alkalmazása során is aspecifikus sejtmagi expresszió volt megfigyelhető a vesetubulusokban (9. D és E ábra), ezen kívül az egyes vesecsatorna típusok eltérő ZIP11 expressziós mintázatát sem lehetett elkülöníteni. A színintenzitásbeli különbségek bemutatására leginkább a Tris-EDTA pufferes feltárás volt alkalmas, a primer antitest 1:200-as hígítása mellett. A ZIP11 fehérje immunhisztokémiai vizsgálatára optimális reakciókörülménynek egyértelműen a Tris-EDTA feltárás és a primer antitest 1:200 titere bizonyult (9. B ábra).



9. ábra: ZIP11 immunreakció standardizálása, barna színnel a ZIP11 fehérje lokalizációja azonosítható (400x). **A)** EDTA 1:100. **B)** EDTA 1:200 (P: proximális tubulus, D: disztális tubulus, H: Henle-kacs). **C)** EDTA 1:400. **D)** citrát 1:200. **E)** citrát 1:400. Nyíllal jelölten a tubulushámsejtek fals pozitív magi expressziója látható.

A ZnT9 immunhisztokémiai reakció optimalizálása során az eredményeink azt mutatták, hogy a ZnT9 fehérje a különböző vesetubulusokban eltérő mértékben expresszálódik: a disztális tubulusban közepes, míg a proximális tubulusban gyenge intenzitás tapasztalható. Mindkét tubulustípusnál a citoplazmában jellegzetes pontszerű, szemcsés reakció figyelhető meg. Kontrasztos, optimális színintenzitást a pH9-es Tris-EDTA pufferben történő antigénfeltárás során és a primer antitest 1:100 titerére esetén tapasztaltunk (10. ábra).

A ZIP6 immunreakciók értékelése során a proximális vesetubulusban tapasztaltunk szemcsés, pontszerű citoplazmatikus reakciót, valamint az endotél sejtekben diffúz citoplazmatikus színintenzitás volt leírható. A ZIP6 fehérje immunhisztokémiai vizsgálatára optimális reakciókörülménynek egyértelműen a magas pH-jú Tris-EDTA feltárás és a primer antitest 1:200 titerére bizonyult (10. ábra).

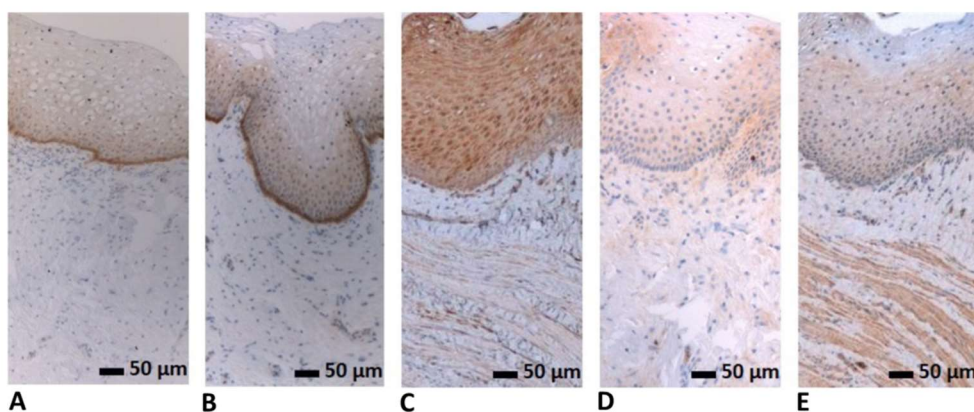


10. ábra: ZnT9 és ZIP6 immunreakció standardizálása **A)** ZNT9 expresszió pozitív szöveti kontrollon. D: Disztális tubulusban erős (3+), szemcsés citoplazmatikus expresszió P: Proximális tubulusban gyenge (1+), szemcsés citoplazmatikus reakció. Primer antitest titer 1:100. **B)** ZIP6 expresszió pozitív szöveti kontrollon. P: Proximális tubulusban erős (3+), szemcsés citoplazmatikus reakció. Primer antitest titer 1:200.

4.4. Immunhisztokémiai elemzés eredményei

A cink transzport fehérjék meghatározása a hüvelyből vett mintákban korábban nem kerültek meghatározásra. Vizsgálatainkkal kimutatható a cink transzportban résztvevő fehérjék jelenléte és segít annak a megismerésében, hogy mely enzimek, fehérjék vehetnek részt a cinkszint kialakításában, a hüvelyszövetben.

Immunhisztokémiai vizsgálatot alkalmaztunk a ZnT és a ZIP transzporterek génexpressziójának megerősítésére és értékelésére fehérjeszinten. Kiválasztottunk egy ZnT transzportert (ZnT9) és három ZIP transzportert (ZIP4, ZIP6 és ZIP11), hogy megerősítsük a ZnT / ZIP fehérjék kifejeződését a hüvelyi szövetben (11. ábra és 10. táblázat).



11. ábra: A ZnT9, ZIP4, ZIP6 és ZIP11 immunhisztokémiai elemzése a hüvely falában (50 µm). Az elülső hüvelyfal biopsziát immunfestéssel vizsgáltuk ZnT9, ZIP4, ZIP6 és ZIP11 antitestekkel.

A) ZnT9 expresszió a posztmenopauzás nők hüvelyfalának rétegeiben. A ZnT9 fehérje expressziója a stratum spinosum-ban szignifikánsan alacsonyabb volt a posztmenopauzás nőknél, mint a premenopauzás nőknél. **B)** ZnT9 expresszió a premenopauzás nők hüvelyfalának rétegeiben. **C)** ZIP4 expresszió a hüvelyfal rétegeiben: a stratum basale és néhány alacsonyabb sejtsor a stratum spinosum rétegében, gyenge diffúz citoplazmatikus expressziót, míg a stratum spinosum felső rétegei és a teljes stratum planocellulare réteg közepesen erős reakciót mutatott. **D)**

ZIP6 expresszió a hüvelyfal rétegeiben: diffúz citoplazmatikus expresszió a stratum basale és a stratum spinosum rétegben. E) ZIP11 expresszió a hüvelyfal rétegeiben: a stratum basale és a stratum spinosum diffúz citoplazmatikus expressziót mutatott.

A szemikvantitatív festési intenzitási pontszámot 0-3 skálán határoztuk meg (0-nincs, 1-gyenge, 2-közepes, 3-erős).

10. táblázat: Hüvelyi cink transzporterek (ZnT9, ZIP4, ZIP6 és ZIP11) expressziója immunhisztokémiai módszerrel pre- és posztmenopauzás nőknél

	Posztmenopauzás csoport (n = 7)	Premenopauzás csoport (n = 7)	p-érték
ZnT9 Intenzitási pont (középpérték, tartomány)			
• Tunica mucosa			
- stratum planocellulare	0 (0)	0 (0)	0.920
- stratum spinosum	1 (0-1)	2 (1-2)	0.012
- stratum basale	3 (2-3)	3 (2-3)	0.920
• Tunica muscularis	0 (0)	0 (0)	0.968
• Tunica adventitia	0 (0)	0 (0)	0.968
ZIP4 Intenzitási pont (középpérték, tartomány)			
• Tunica mucosa			
- stratum planocellulare	2 (0-2)	2 (0-2)	0.347
- stratum spinosum	2 (1-2)	2 (1-2)	0.960
- stratum basale	1 (0-1)	1 (0-1)	0.704
• Tunica muscularis	2 (1-2)	2 (1-2)	0.976
• Tunica adventitia	2 (1-2)	2 (1-2)	0.936

	Posztmenopauzás csoport (n = 7)	Premenopauzás csoport (n = 7)	p-érték
ZIP6 Intenzitási pont (közéérték, tartomány)			
• Tunica mucosa			
- stratum planocellulare	0 (0)	0 (0)	0.920
- stratum spinosum	2 (1-2)	2 (1-2)	0.920
- stratum basale	2 (1-2)	2 (1-2)	0.920
• Tunica muscularis	1 (0-1)	1 (0-1)	0.968
• Tunica adventitia	2 (1-2)	2 (1-2)	0.920
ZIP11 Intenzitási pont (közéérték, tartomány)			
• Tunica mucosa			
- stratum planocellulare	0 (0)	0 (0)	0.920
- stratum spinosum	1 (0-1)	1 (0-1)	0.347
- stratum basale	0 (0-1)	0 (0-1)	0.960
• Tunica muscularis	3 (2-3)	3 (2-3)	0.976
• Tunica adventitia	0 (0)	0 (0)	0.936

A hüvelyi nyálkahártyában a stratum spinosum rétegben szignifikánsan gyengébb kifejeződést mutatott a ZnT9 fehérje a posztmenopauzás csoportban a premenopauzális csoporthoz képest [11. A ábra; közéérték (intenzitási pontszám) 1 (0-1) vs. 2 (1-2), $p = 0,012$]. Nem találtunk ZnT9 expressziót a stratum planocellulare rétegben, a tunica muscularis vagy a tunica adventitia rétegben (11. A és B ábra, 10. táblázat).

Az elvégzett vizsgálatoknál valamennyi mintánál kimutattuk a ZIP4 fehérje extracelluláris expresszióját. Emellett valamennyi esetben tapasztaltuk az érfali simaizomban megjelenő barna festődést, illetve a tunica muscularis rétegben is látható volt a ZIP4 fehérje expressziója közepesen erős (intenzitási

pontszám, 2), diffúz citoplazmatikus reakciója. A hüvelyfalat borító hámszövet a ZIP4 expressziós mintázata alapján 2 részre osztható. A stratum basale és a stratum spinosum alsó néhány sejtsorában gyenge (intenzitási pontszám, 1), diffúz citoplazmatikus expresszió figyelhető meg, míg a stratum spinosum felsőbb rétegeiben, illetve a teljes stratum planocellulare területén közepesen erős (intenzitási pontszám, 2) reakció alakult ki. Diffúz citoplazmatikus ZIP4 festődést a tunica adventitia rétegben is tapasztaltunk (11. C ábra és 10. táblázat).

A ZIP6 minta (11. D ábra) diffúz citoplazmatikus expressziót mutatott a hüvelyfalat borító hámszövetben a stratum basale és a stratum spinosum sejtsoraiban (intenzitási pontszám, 2). Nem találtunk kifejeződést a stratum planocellulare rétegben. A tunica muscularis rétegben minden esetben gyenge pozitív festődést (intenzitási pontszám, 1) figyeltünk meg. Mérsékelt pontszerű ZIP6 expressziót is kimutattunk (intenzitási pontszám, 2) a tunica adventitia rétegben (11. D ábra és 10. táblázat).

A hüvelyfal hámszövetében a stratum basale és a stratum spinosum a ZIP11 diffúz citoplazmatikus expresszióját mutatta. Nem találtunk kifejeződést a stratum planocellulare rétegben (11. E ábra). Az immunhisztokémiai vizsgálatok feltárták a ZIP11 fehérje expresszióját a tunica adventitia vaszkuláris simaizmában, illetve a tunica muscularis rétegben (intenzitási pontszám, 3). A kötőszöveti sejtekben és az extracelluláris matrixban egyértelmű specifikus festődés nem volt látható (11. E ábra és 10. táblázat).

Nem találtunk szignifikáns különbséget a ZIP4, a ZIP6 és a ZIP11 immunfestés eredményeiben a pre- és posztmenopauzás hüvelyi szövetek között (11. C-E ábra és 10. táblázat).

4.5. Szekvenciaelemzés eredményei

Az egyedi polimorfizmusok meghatározását a szakirodalomban ismert eljárásokkal a korábban ismertett módszerekkel valósítottuk meg.

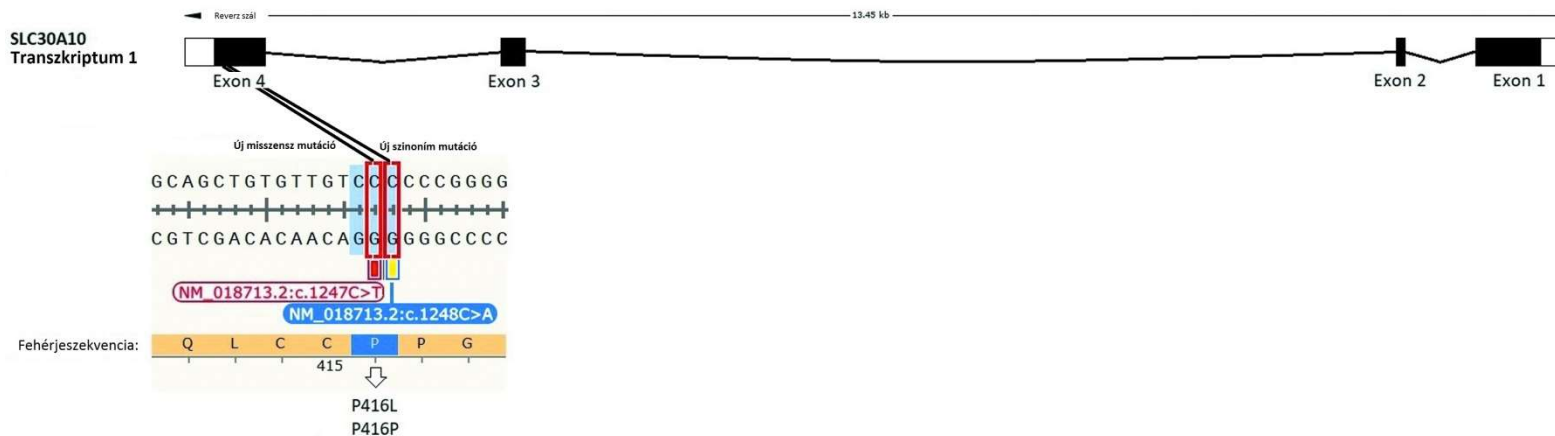
A vizsgálatba bevont nők demográfiai és klinikai jellemzőit az 5. táblázatban ismertettük.

Az egyedi nukleotid polimorfizmusoknak köszönhetően az egyes gének működése eltérhet. Ennek ismeretében megbecsülhető, hogy a populációban vannak-e jelen olyan genetikai változatok, ahol a cinkszint szabályozása másképp működik.

4.5.1. Azonosított változatok magasabb allél frekvenciával

Az SNP-k azonosítása a tíz *SLC30A/ZnT* gén és a 14 db *SLC39A/ZIP* gén hosszabb exonjaikra tervezett szakaszaiban PCR és szekvenálási módszerekkel történt.

Eredményeink azt mutatták, hogy csak egy gén (*SLC30A10/ZnT10*) tartalmazott egyedi nukleotid polimorfizmust a tíz vizsgált *SLC30A/ZnT* génből (12. ábra), míg az *SLC30A1-9/ZnT1-9* gének exon régiói a referencia szakaszokkal megegyező szekvenciákkal rendelkeztek.



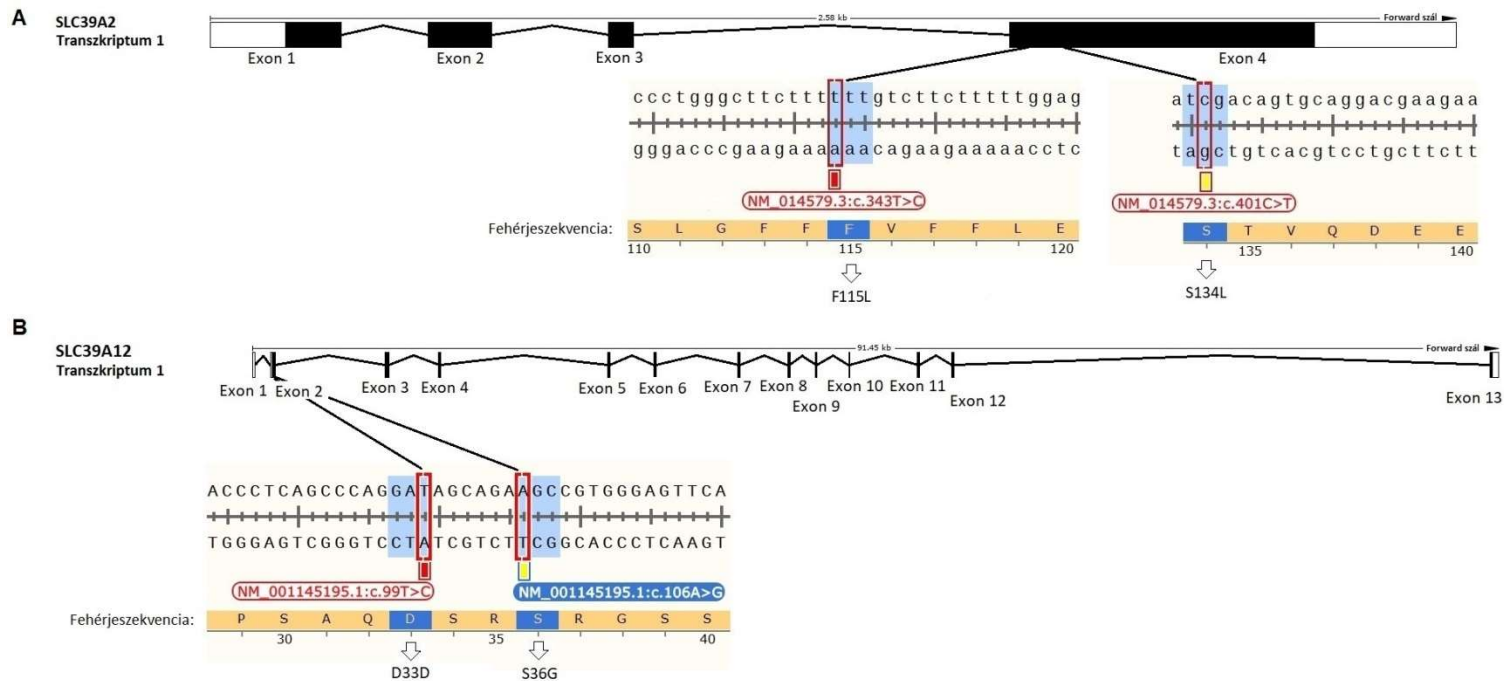
12. ábra: Azonosított új SNP-k az SLC30A10/ZnT10 génen. Az ábrán a gén helyzetének megfelelő nukleotid és aminosav pozíciók láthatók a SnapGene szoftverben alkalmazott referencia szekvencia kódoló régiói alapján. A referencia szekvencia NM_018713.2. Ez a transzkriptum négy exont tartalmaz. Az azonosított mutációk betegenként eltérő mintázatot mutattak, így egyedi mutációként jelöltük őket és töltöttük fel a dbSNP adatbázisba [16-7]. Az azonosított új misszensz mutáció (c.1247C>T) a negyedik exonban található a 416. aminosav pozíciónál (p.P416L), ami Prolin-Leucin változást eredményez. Egyes mintákban viszont szinoním mutációt azonosítottunk, amely szintén a negyedik exonban található (c.1248C>A) a 416. aminosav helyzetben, (p.P416P), ami továbbra is Prolin beépülését jelentette. Az NCBI Nucleotide adatbázis alapján a vizsgált transzkriptum nukleotid pozíciói: c.1458C>T és c.1459C>A [14].

11. táblázat: A referencia szakaszokkal megegyező szekvenciák az *SLC30A/ZnT* családban

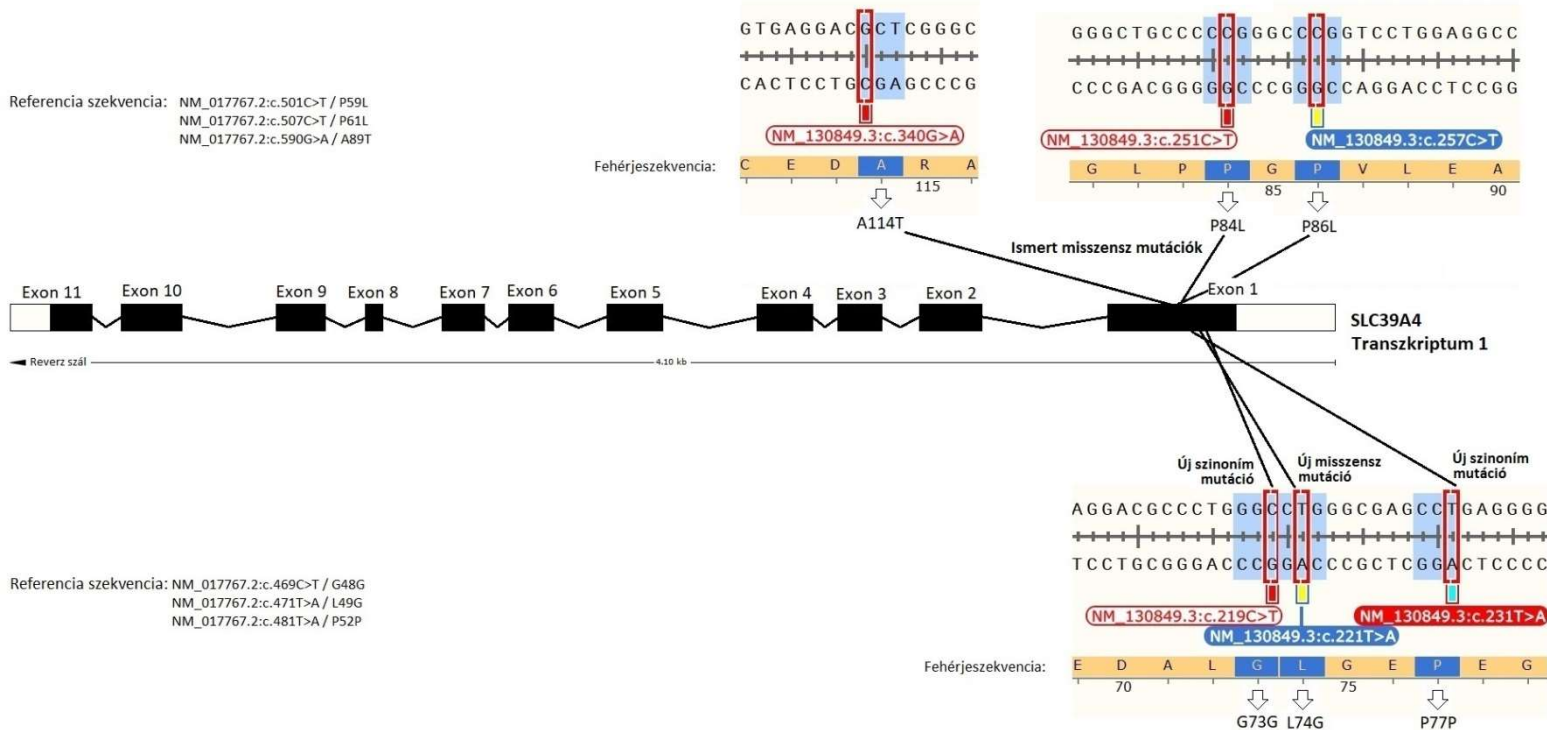
Gén	Referencia szekvencia ^a	Régió ^a	Szakasz (bp) ^a
<i>SLC30A1/ZnT1</i>	NM_021194.2	Exon 1	1442-1617
<i>SLC30A2/ZnT2</i>	NM_001004434.2	Exon 5	815-951
<i>SLC30A3/ZnT3</i>	NM_001318949.1	Exon 5	745-887
<i>SLC30A4/ZnT4</i>	NM_013309.5	Exon 7	1313-1443
<i>SLC30A5/ZnT5</i>	NM_022902.4	Exon 8	1097-1318
<i>SLC30A6/ZnT6</i>	NM_001330476.1	Exon 12	863-1111
<i>SLC30A7/ZnT7</i>	NM_001144884.1	Exon 6	701-800
<i>SLC30A8/ZnT8</i>	NM_173851.2	Exon 2	309-498
<i>SLC30A9/ZnT9</i>	NM_006345.3	Exon 15	1426-1543

a - Az NCBI Nucleotide adatbázis szerint [14].

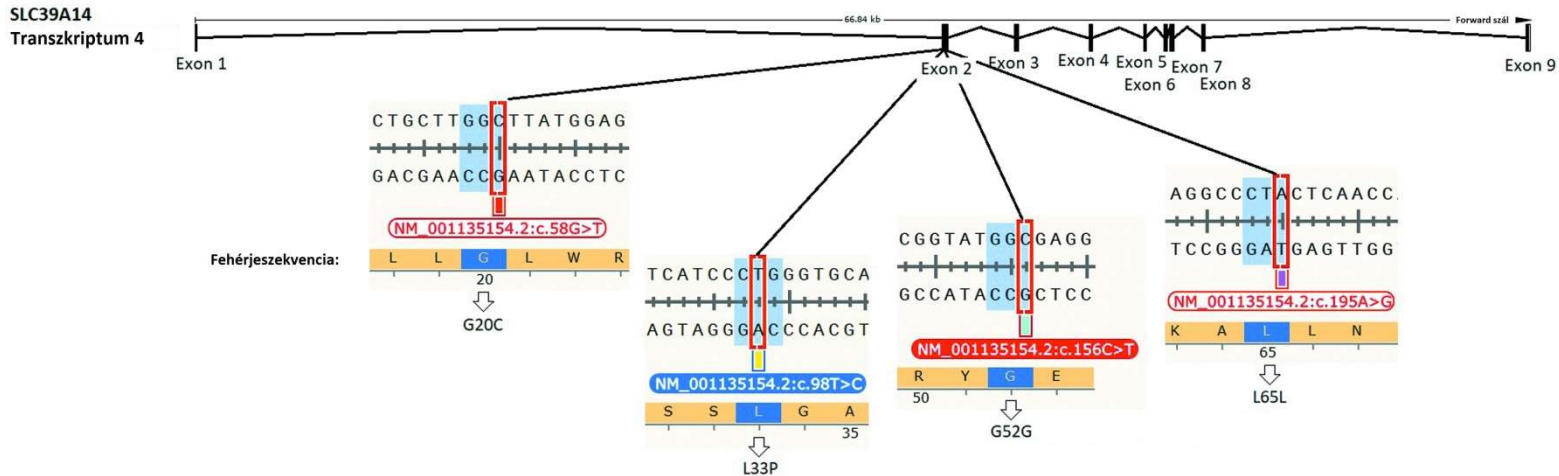
Ezzel szemben a 14 *SLC39A/ZIP* génből négy gén (*SLC39A2/ZIP2* – 13. ábra, *SLC39A4/ZIP4* – 14. ábra, *SLC39A12/ZIP12* – 13. ábra és *SLC39A14/ZIP14* – 15. ábra) tartalmazott SNP-eket. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a *SLC39A/ZIP* gének vizsgált exonjai valószínűleg hajlamosabbak a pontmutációkra. A szekvencia összehasonlítások nem mutattak további genetikai változatokat az *SLC39A1/ZIP1*, *SLC39A3/ZIP3*, *SLC39A5-11/ZIP5-11*, *SLC39A13/ZIP13* gének exonjaiban (12. táblázat).



13. ábra: Azonosított SNP-k az SLC39A2/ZIP2 és SLC39A12/ZIP12 génekben. Az ábrán a gén helyzetének megfelelő nukleotid és aminosav pozíciók láthatók a SnapGene szoftverben alkalmazott referencia szekvenciák kódoló régiói alapján. **A)** A referencia szekvencia az NM_014579.3 az SLC39A2/ZIP2 génnél. Az azonosított misszensz mutációk a negyedik exonban vannak a 115. (c.343T>C, p.F115), ami Fenilalanin-Leucin változást eredményez és a 134. aminosav pozícióban (c.401C>T, p.S134L), ami Szerin-Leucin változást eredményez. A felhasznált transzkriptum nukleotid pozíciói az NCBI adatbázis alapján (c.535T>C) (c.593C>T) [14]. **B)** A referencia szekvencia az NM_001145195.1 az SLC39A12/ZIP12 génnél. Az azonosított szinonim mutáció a 33. aminosav helyzetben (c.99T>C, p.D33D), ami továbbra is Aszparaginsav beépülését jelenti és az azonosított misszensz mutáció a 36. aminosav pozícióban (c.106A>G, p.S36G), ami Szerin-Glicin változást eredményez a második exonban található. Az NCBI Nucleotide adatbázis alapján a vizsgált transzkriptum nukleotid pozíciói: c.372T>C és c.379A>G [14].



14. ábra: Azonosított új és ismert SNP-k az SLC39A4/ZIP4 génben. Az NCBI Nucleotide adatbázis alapján a vizsgált transzkriptum referencia szekvenciája NM_017767.2. Az ábrán a gén helyzetének megfelelő nukleotid és aminosav pozíciók láthatók, ahol az NM_130849.3 referencia szekvencia kódoló régióját használtuk a SnapGene szoftver alkalmazásával. Minden azonosított mutáció az első exonban található. Az azonosított ismert misszensz mutációk a 84. (c.251C>T, p.P84L), ami Prolin-Leucin; a 86. (c.257C>T, p.P86L), ami Prolin-Leucin és a 114. aminosav helyzetben (c.340G>A, p.A114T), ami Aszparagin-Treonin változást eredményez. Az azonosított új misszensz mutáció a 74. aminosav pozícióban (c.221T>A, p.L74G), ami Leucin-Glicin változást eredményez. Az azonosított új szinonim mutációk a 73. aminosav pozícióban (c.219C>T, p.G73G), ami továbbra is Glicin beépülését jelenti és a 77. aminosav pozícióban (c.231T>A, p.P77P), ami továbbra is Prolin beépülését jelenti.



15. ábra: Azonosított SNP-k az SLC39A14/ZIP14 génben. Az ábrán a gén helyzetének megfelelő nukleotid és aminosav pozíciók láthatók a SnapGene szoftverben alkalmazott referencia szekvencia kódoló régiói alapján. A referencia szekvencia az NM_001135154.2. Minden azonosított mutáció a második exonban található. Az azonosított misszensz mutációk a 20. aminosav pozícióban (c.58G>T, p.G20C), ami Glicin-Cisztein változást eredményez és a 33. aminosav pozícióban (c.98T>C, p.L33P), ami Leucin-Prolin változást eredményez. Az azonosított szinonim mutációk az 52. aminosav helyzetben (c.156C>T, p.G52G), ami továbbra is Glicin beépülését jelenti és a 65. aminosav pozícióban (c.195A>G, p.L65L), ami továbbra is Leucin beépülését jelenti. Az NCBI Nucleotide adatbázis alapján a vizsgált transzkriptum nukleotid pozíciói: c.252G>T, c.292T>C, c.350C>T és c.389A>G [14].

12. táblázat: A referencia szakaszokkal megegyező szekvenciák az SLC39A/ZIP családban

Gén	Referencia szekvencia^a	Régió^a	Szakasz^a
<i>SLC39A1/ZIP1</i>	NM_001271959.1	Exon 4	879-1053
<i>SLC39A3/ZIP3</i>	NM_144564.4	Exon 2	273-436
<i>SLC39A5/ZIP5</i>	NM_173596.2	Exon 4	269-544
<i>SLC39A6/ZIP6</i>	NM_012319.3	Exon 2	416-690
<i>SLC39A7/ZIP7</i>	NM_006979.2	Exon 1	523-779
<i>SLC39A8/ZIP8</i>	NM_022154.5	Exon 6	1445-1577
<i>SLC39A9/ZIP9</i>	NM_001252150.1	Exon 3	908-1069
<i>SLC39A10/ZIP10</i>	NM_001127257.1	Exon 2	484-749
<i>SLC39A11/ZIP11</i>	NM_001159770.1	Exon 10	1071-1193
<i>SLC39A13/ZIP13</i>	NM_001128225.2	Exon 2	311-477

a - Az NCBI Nucleotide adatbázis szerint [14].

Vizsgálatunk során összesen tíz misszensz mutációt és hat szinoním mutációt azonosítottunk (8-11. ábra és 13. táblázat).

13. táblázat: Azonosított SNP-k adatai az SLC30A/ZnT és SLC39A/ZIP családokban

Sorszám	Gén	Referencia szekvencia ^a	Régió	dbSNP (rs kód) ^b	Pozíció a kromoszómán	SNP pozíció a referencia szekvencián ^b	SNP funkció	Aminosav változás ^b
1	<i>SLC30A10/ ZnT10</i>	NM_018713.2	Exon 4	<i>rs1558249270</i>	Chr 1: 219,915,660	c.1458C>T	misszensz	P416L
2				<i>rs781687046</i>	Chr 1: 219,915,659	c.1459C>A	szinoním	P416P
3	<i>SLC39A2/ ZIP2</i>	NM_014579.3	Exon 4	rs2234636	Chr 14: 21,000,992	c.535T>C	misszensz	F115L
4				rs1290081870	Chr 14: 21,001,050	c.593C>T	misszensz	S134L
5	<i>SLC39A4/ ZIP4</i>	NM_017767.2	Exon 1	<i>rs1554873909</i>	Chr 8: 144,416,065	c.469C>T	szinoním	G48G
6				<i>rs1564711111</i>	Chr 8: 144,416,063	c.471T>A	misszensz	L49G
7				<i>rs1484902933</i>	Chr 8: 144,416,053	c.481T>A	szinoním	P52P
8				rs117535951	Chr 8: 144,416,033	c.501C>T	misszensz	P59L
9				rs187080747	Chr 8: 144,416,027	c.507C>T	misszensz	P61L
10				rs17855765	Chr 8: 144,415,944	c.590G>A	misszensz	A89T

Sorszám	Gén	Referencia szekvencia ^a	Régió	dbSNP (rs kód) ^b	Pozíció a kromoszómán	SNP pozíció a referencia szekvencián ^b	SNP funkció	Aminosav változás ^b
11	<i>SLC39A12/ZIP12</i>	NM_001145195.1	Exon 2	rs691112	Chr 10: 17,953,375	c.372T>C	szinoním	D33D
12				rs10764176	Chr 10: 17,953,382	c.379A>G	misszensz	S36G
13	<i>SLC39A14/ZIP14</i>	NM_001135154.2	Exon 2	rs183988980	Chr 8: 22,404,768	c.252G>T	misszensz	G20C
14				rs896378	Chr 8: 22,404,808	c.292T>C	misszensz	L33P
15				rs33999442	Chr 8: 22,404,866	c.350C>T	szinoním	G52G
16				rs2293144	Chr 8: 22,404,905	c.389A>G	szinoním	L65L

a - Az NCBI Nucleotide adatbázis szerint [I4].

b - A Single Nucleotide Polymorphism adatbázis (dbSNP) szerint. Az új piros színnel jelölt SNP-eket felvették a dbSNP adatbázisba, és nyilvánosan elérhetők a dbSNP Build (B154) felületen [I6-10].

Érdekes módon bizonyos SNP-k (590 / *SLC39A4*/*ZIP4* - rs17855765, 292 / *SLC39A14*/*ZIP14* - rs896378, 1459 / *SLC30A10*/*ZnT10* - rs781687046) különösen magas allélfrekvenciával rendelkeztek a mintáinkban (14. táblázat). Az *SLC39A2*/*ZIP2* gén SNP-i hasonló adatokat mutattak, mint az európai populáció allélfrekvenciái. Az rs2234636 referencia allélje azonban magasabb volt a vizsgált csoportban. Az *SLC39A4*/*ZIP4* génben az rs17855765 (c.590G>A) gyakoribb, mint az európai és a globális allélfrekvencia. Az *SLC39A12*/*ZIP12* gén SNP-i hasonló adatokat mutattak, mint az európai és a globális tanulmányokban bemutatott populáció allél gyakoriságai. Az *SLC39A14*/*ZIP14* génben azonosított SNP-k közül kettő különbözött az Ensembl és a dbSNP adatbázistól. Az rs896378 SNP (c.292T>C) esetén a C allél magasabb frekvenciával rendelkezik. Az rs33999442 SNP-ben (c.350C>T) mindkét allél 50%-kal jelenik meg az adatbázisban. Ezek az SNP-k a nők több mint 70%-ában találhatók meg, míg ugyanazon SNP-k (590 / *SLC39A4*/*ZIP4*, 292 / *SLC39A14*/*ZIP14*) allélfrekvenciája az európai országokban csak körülbelül 50% volt (Ensembl) (14. táblázat) [15].

14. táblázat: Allélfrekvenciák globálisan, valamint a magyar és az európai populációkban

Gén	dbSNP (rs kód) ^a	SNP pozíció a referencia szekvencián ^b	Magyar allél- frekvenciák ^b Ref. allél, n (%)	Magyar allél- frekvenciák ^b Alt. allél, n (%)	Európai allél- frekvenciák (%) ^c	Globális allél- frekvenciák ^d
<i>SLC30A10/ ZnT10</i>	<i>rs1558249270</i>	c.1458C>T	25 (78,125%)	7 (21,875%)	-	-
	<i>rs781687046</i>	c.1459C>A	6 (18,75%)	26 (81,25%)	-	-
<i>SLC39A2/ ZIP2</i>	rs2234636	c.535T>C	31 (96,875%)	1 (3,125%)	T: 67% C: 33%	T=0,63240 C=0,36760
	rs1290081870	c.593C>T	30 (93,75%)	2 (6,25%)	C: 100 %	C=0,99999 T=0,00001
<i>SLC39A4/ ZIP4</i>	<i>rs1554873909</i>	c.469C>T	31 (96,875%)	1 (3,125%)	-	-
	<i>rs1564711111</i>	c.471T>A	17 (53,125%)	15 (46,875%)	-	-
	<i>rs1484902933</i>	c.481T>A	21 (65,625%)	11 (34,375%)	-	-
	rs117535951	c.501C>T	29 (90,625%)	3 (9,375%)	G: 95% A: 5%	G=0,97102 A=0,02898
	rs187080747	c.507C>T	31 (96,875%)	1 (3,125%)	G: 100% A: 0%	G=0,99792 A=0,00208
	rs17855765	c.590G>A	9 (28,125%)	23 (71,875%)	C: 48% T: 52%	C=0,54135 T=0,45865

Gén	dbSNP (rs kód) ^a	SNP pozíció a referencia szekvencián ^b	Magyar allél-frekvenciák Ref. allél, n (%)	Magyar allél-frekvenciák Alt. allél, n (%)	Európai allél-frekvenciák (%) ^c	Globális allél-frekvenciák ^d
<i>SLC39A12/ZIP12</i>	rs691112	c.372T>C	0 (0%)	32 (100%)	T: 9% C: 91%	T=0,09786 C=0,90214
	rs10764176	c.379A>G	26 (81,25%)	6 (18,75%)	A: 71% G: 29%	A=0,72647 G=0,27353
<i>SLC39A14/ZIP14</i>	rs183988980	c.252G>T	31 (96,875%)	1 (3,125%)	G: 100%	G=0,99999 T=0,00001
	rs896378	c.292T>C	5 (15,625%)	27 (84,375%)	T: 50% C: 50%	T=0,47468 C=0,52532
	rs33999442	c.350C>T	16 (50%)	16 (50%)	C: 79% T: 21%	C=0,82340 T=0,17660
	rs2293144	c.389A>G	19 (59,375%)	13 (40,625%)	A: 50% G: 50%	A=0,45223 G=0,54777

a - A Single Nucleotide Polymorphism adatbázis (dbSNP) szerint. Az új piros színnel jelölt SNP-ket felvették a dbSNP adatbázisba, és nyilvánosan elérhetők a dbSNP Build (B154) felületen [16-10].

b - Magyar allél frekvenciák 32 résztvevővel = 100% összehasonlítva a referencia mutációk alléleloszlásával.

c - Európai allél frekvenciák az Ensembl adatbázis alapján - Population genetics / 1000 Genomes Project Phase 3 allél frekvencia (gnomAD - rs1290081870: FIN) [15].

d - Globális allél frekvenciák a dbSNP adatbázis alapján (gnomAD and TOPMED - rs1290081870, rs183988980) [14].

4.5.2. Öt új azonosított SNP

Az azonosított 16 db SNP közül öt bizonyult új SNP-nek (13. táblázat). Különböző új heterozigóta mutációkat azonosítottunk az *SLC30A10/ZnT10* génben és az *SLC39A4/ZIP4* génben (12., 14. ábra és 13. táblázat). Három új polimorfizmus szinoním volt, amely nem okozott változást a fehérjében, míg két SNP misszensz mutáció volt, aminek következtében a fehérje adott pontján az eredetitől eltérő aminosav épült be (13. táblázat). Ezen kívül két új heterozigóta misszensz mutációt találtunk: c.1458C>T (p.P416L) - rs1558249270 az *SLC30A10* gén 4. exonjában és c.471T>A (p.L49G) - rs1564711111 az *SLC39A4* gén 1. exonjában (12., 14. ábra). Három új heterozigóta szinoním mutációt találtunk: c.1459C>A (p.P416P) - rs781687046 a 4-es exonban az *SLC30A10/ZnT10* génben (12. ábra) és c.469C>T (p.G48G) - rs1554873909 és c.481T>A (p.P52P) - rs1484902933 az 1. exonban az *SLC39A4/ZIP4* génben (14. ábra). Az egyedi nukleotid polimorfizmusokat az NCBI dbSNP nyilvános adatbázisába feltöltöttük (dbSNP Build, B154) [I6-10].

Az új SNP-k mellett 11 SNP-t találtunk öt génben, amelyek már ismertek voltak. Az *SLC39A2/ZIP2* génben két misszensz mutációt, az *SLC39A12/ZIP12* génben egy misszensz és egy szinoním mutációt, az *SLC39A14/ZIP14* génben két misszensz és két szinoním mutációt találtunk. Az SNP-k jellemzőit a 13. táblázatban mutatjuk be.

Az *SLC39A4/ZIP4* gén 1. exonjában három további SNP-t (rs117535951, rs187080747, rs17855765) találtunk (14. ábra és 13. táblázat), amelyeket korábban az AE betegséghez kapcsoltak [156]. Mivel közülük kettőnek magas volt az allélfrekvenciája a mintáinkban (14. táblázat), érdekes lenne tudni, hogy ezeknek a nőknek acrodermatitis tünetei voltak-e vagy sem. Sajnos azonban nincs információnk róla.

4.5.3. SNP-k a nyomelemek vér- és szövetkoncentrációjával összefüggésben

A cink transzporter gének SNP-i és a vér vagy a szövet cink koncentrációi közötti összefüggéseket nem ismerjük teljesen. Ezért a vizsgált gének SNP-i és a cinkkoncentráció közötti összefüggéseket is megvizsgáltuk (15. táblázat). A hüvelyi szövetminták átlagos cink koncentrációja $57,88 \pm 26,07$ mg/kg (átlag \pm szórás) a teljes vér átlagos cink koncentrációja pedig $4,84 \pm 0,82$ mg/l (átlag \pm szórás) volt.

15. táblázat: Cinkkoncentráció és SNP-k száma a vizsgált mintákban

Minta	Kor (év)	Menopauza	BMI (kg/m ²)	SNP / Páciens	Teljes vér Zn (mg/l)	Hüvelyi szövet Zn (mg/kg)
B1	53	1	30,48	5	5,47	154,62
B2	52	0	30,11	4	5,49	46,55
B3	56	1	-	9	4,92	52,45
B4	74	1	30	7	5,31	64,10
B5	55	1	22,78	6	4,93	47,40
B6	76	1	24,44	7	4,74	50,65
B7	67	1	26,72	8	5,03	45,25
B8	33	0	31,98	8	4,24	75,98
B9	51	1	31,71	7	4,74	60,48
B10	63	1	31,71	7	4,60	53,80
B11	55	1	24,22	5	2,60	38,80
B12	70	1	22,5	6	4,70	59,86
B13	46	0	18,92	5	5,02	43,71
B14	81	1	32,46	8	4,17	73,48
B15	30	0	30,38	7	4,48	108,93
B16	61	1	33,6	4	5,28	41,87
B17	74	1	22,66	5	5,38	29,79
B18	69	1	35,94	5	6,56	45,92
B19	50	0	24,82	6	4,74	74,09
B20	62	1	23,53	7	4,74	44,45
B21	51	0	29,69	4	6,20	45,65
B22	49	0	32,62	4	5,44	33,94
B23	70	1	22,94	3	4,13	43,20
B24	73	1	28,51	7	4,14	58,75
B25	75	1	26,1	5	5,59	47,65
B26	64	1	25,89	7	5,29	43,00
B27	67	1	24,1	5	2,37	41,03
B28	75	1	39,06	5	4,25	40,75
B29	65	1	37,23	5	4,95	83,95
B30	78	1	27,56	6	5,09	111,94
B31	83	1	30	6	5,09	42,28
B32	72	1	28,11	7	5,11	47,73

Bár minden nőnek egyedi SNP mintázata volt (16. táblázat), több összefüggést találtunk az SNP-k és a hüvelyi szövet cinkszintje között.

16. táblázat: SNP mintázat

SNP pozíció a tripletben																		
Minta	gén nukleotid ^a	<i>SLC39A2/ ZIP2</i>			<i>SLC39A4/ ZIP4</i>				<i>SLC39A12/ ZIP12</i>			<i>SLC39A14/ ZIP14</i>				<i>SLC30A10/ ZnT10</i>		SNP (db)
		535	593	469	471	481	501	507	590	372	379	252	292	350	389	1458	1459	
B1		T	C	C	T	T	C	C	A	C	A	G	C	C	G	C	A	5
B2		T	C	C	A	T	C	C	G	C	A	G	C	T	A	C	C	4
B3		T	C	C	A	A	C	C	A	C	A	G	C	T	G	T	A	9
B4		T	C	C	A	T	C	C	G	C	G	G	C	T	G	T	A	8
B5		T	C	C	T	T	C	C	A	C	A	G	C	T	G	C	A	6
B6		T	C	C	A	T	T	C	A	C	A	G	T	C	A	T	A	6
B7		T	C	C	A	T	T	C	A	C	A	G	C	T	A	T	C	7
B8		T	C	C	A	T	C	C	A	C	A	G	C	T	G	T	A	8
B9		T	C	C	A	T	C	C	A	C	A	G	C	T	G	C	A	7
B10		T	C	C	A	A	C	C	A	C	A	G	C	T	G	C	A	8
B11		T	C	C	T	T	T	C	A	C	A	G	T	C	A	C	A	4
B12		T	C	C	A	T	C	C	A	C	A	G	T	C	A	T	A	5
B13		T	C	C	A	A	C	C	G	C	A	G	C	C	A	C	A	5
B14		T	C	C	A	A	C	C	A	C	G	G	C	C	G	C	A	8
B15		T	T	C	T	A	C	C	A	C	G	G	C	T	G	C	C	8

SNP pozíció a tripletben

Minta	gén nukleotid ^a	<i>SLC39A2/</i> <i>ZIP2</i>		<i>SLC39A4/</i> <i>ZIP4</i>				<i>SLC39A12/</i> <i>ZIP12</i>		<i>SLC39A14/</i> <i>ZIP14</i>				<i>SLC30A10/</i> <i>ZnT10</i>		SNP (db)		
		535	593	469	471	481	501	507	590	372	379	252	292	350	389		1458	1459
B16		T	C	C	T	T	C	C	A	C	G	G	T	C	A	C	C	3
B17		T	C	C	T	A	C	C	G	C	G	G	C	T	A	C	A	6
B18		T	C	T	T	A	C	C	G	C	A	G	C	C	A	C	A	5
B19		T	C	C	T	A	C	C	A	C	A	G	C	C	A	C	A	5
B20		T	C	C	T	T	C	T	A	C	A	G	C	T	A	C	A	6
B21		T	C	C	A	T	C	C	G	C	A	G	C	T	G	C	A	6
B22		T	C	C	T	T	C	C	A	C	A	G	C	C	A	C	C	3
B23		T	C	C	T	T	C	C	G	C	A	G	C	C	A	C	A	3
B24		C	C	C	A	A	C	C	A	C	A	G	C	C	A	C	A	7
B25		T	C	C	T	T	C	C	A	C	A	T	T	C	A	C	A	5
B26		T	C	C	T	T	C	C	A	C	G	G	C	T	A	C	A	7
B27		T	C	C	T	A	C	C	G	C	A	G	C	T	G	C	A	6
B28		T	C	C	A	A	C	C	G	C	A	G	C	C	A	T	C	5
B29		T	C	C	T	T	C	C	A	C	A	G	C	T	A	C	A	5
B30		T	C	C	T	T	C	C	A	C	A	G	C	C	A	C	A	4
B31		T	C	C	T	T	C	C	A	C	A	G	C	T	G	C	A	6
B32		T	T	C	A	T	C	C	A	C	A	G	C	C	G	C	A	7

a - A nukleotid pozíció a gén vizsgált transzkriptum szekvenciájának kezdetétől számoltan jelenik meg az NCBI Nucleotide adatbázis alapján [14].

Elemzésünk összefüggést mutatott ki a betegenkénti SNP-k száma (több mint hat SNP és kevesebb, mint hat) és a magas hüvelyszöveti cinkszint (67% vs. 33%, $p = 0,004$) között. Az *SLC39A4/ZIP4* SNP 590c (rs17855765) szignifikánsan gyakoribb volt a magas hüvelyszöveti cinkszinttel rendelkező nők csoportjában az SNP nélküli csoporthoz képest (93% vs. 7%, $p = 0,02$). Érdekes módon az *SLC39A4/ZIP4* 590c (rs17855765) gyakran jelen volt az *SLC39A14/ZIP14* 389c (rs2293144) SNP-vel együtt a magas szöveti cinkszinttel rendelkező nőknél, szemben az SNP nélküli nőkkal (100% vs. 0%, $p = 0,02$).

Ezenkívül vizsgálati eredményeink összefüggést mutattak az *SLC30A10/ZnT10* génen belül az SNP-k száma betegenként (egynél több SNP szemben egy SNP vagy SNP nélkül) és a magas szöveti cinkszintek között (100% vs. 0%, $p = 0,01$).

Az SNP-k egyedi kombinációja az *SLC30A10/ZnT10* génben (több SNP) és az *SLC39A4/ZIP4* génben (több mint kettő) szignifikánsan gyakoribb volt a magas cinkszöveti szinttel rendelkező nők csoportjában (61% vs. 39%, $p = 0,03$).

Azt is tapasztaltuk, hogy az SNP-k száma (kettő vagy több vs. kevesebb, mint kettő) az *SLC39A4/ZIP4* génben szignifikánsan gyakoribb volt az alacsony vér cinkszinttel rendelkező résztvevőknél (76% vs. 24%, $p = 0,01$).

Általánosan elmondható, hogy a magasabb hüvelyszöveti cinkszinttel rendelkező nőknél gyakrabban fordulnak elő egyedi nukleotid polimorfizmusok.

5. Diszkusszió

A cink a sejtek és szövetek elengedhetetlen nyomeleme. Fontos szerepe van a sejtes folyamatok, például a fejlődés és a differenciálódás szabályozásában, illetve számos fiziológiai folyamatban is részt vesz. Megtalálható a legkülönbözőbb szervek sejteiben és a hiánya komoly betegségekhez, rendellenességekhez vezethet [21, 190]. Hiszen a menopauza után a nyomelemek anyagcseréjében bekövetkező zavarok kockázata igen magas [172].

Az állatokban kapott eredmények alapján feltételeztük, hogy a humán hüvelyi szövetben is megtalálható és kimutatható a cink, mennyisége kapcsolatban lehet az öregedéssel, illetve a menopauzával [187-189]. Kutatásainkat az is ösztönözte, hogy az állatkísérletek vizsgálati eredményeinek alkalmazása humán kísérleteknél sok bizonytalanságot vet fel. Az állatokon elvégzett kísérletek gyakran nem vagy csak részlegesen alkalmazhatók embereken.

Ezért elindítottuk azokat a vizsgálatainkat, amelyek pre- és posztmenopauzás egészséges nők hüvelyi szövetének és a vér cinktartalmának elemzésére irányultak. A vonatkozó tudományos szakirodalom alapos áttekintése után úgy gondoljuk, hogy ez az első vizsgálat az emberi hüvelyszövet cinkszintjének meghatározásáról, valamint a teljes vérben és a hüvelyszövetben található cink koncentrációjának összehasonlításáról. A teljes vért vizsgáltuk a plazma vagy a szérum helyett, mert a teljes vér a cink állapotának jobb mutatója lehet, mint a szérum vagy a plazma [11]. Ugyanis a vérben lévő teljes cink 80-90%-a jelen van a sejtekben, 10-20%-ban a plazmában, és kevesebb, mint 1% található meg szabad cinkként [202, 203]. Az eritrociták eltérő cinkszintje alapján a teljes vérben a cink koncentrációt 4-

8 mg/l tartományban határozták meg [204]. A mi adataink is ebbe a tartományba estek [4,84 mg/l (szórás 0,82)], ami megfelel annak, hogy a vizsgálati alanyok teljes egészében egészségesek voltak, nem szenvedtek jelentős krónikus betegségekben és normális hematológiai értékekkel rendelkeztek, beleértve a normális hemoglobin értékeket is. Ez azért fontos, mert néhány kóros állapot, mint például a daganatok vagy a csonttritkulás befolyásolhatja a cink koncentrációját a vérben [205, 206].

Eredményeink szerint a teljes vér cinkszintje hasonló volt a mintákban és nem korrelált a vizsgálati alanyok életkorával ($r = 0,01$ és $r = - 0,11$, $p = \text{NS}$). Hasonló adatot kaptak az életkor és a vérszérum cinkszintjének értékelésénél az 50 éves kor alatti vagy annál idősebb mellrákos betegek esetében is [207].

Ugyanakkor a hüvelyi szövet cinkszintjei változatosabbak voltak és negatív korrelációt mutattak az életkorral ($r = - 0,27$, $p = 0,04$). Azaz, a hüvelyszövet cinkszintjének csökkenése összefüggésben van az öregedéssel. A többszörös regressziós elemzésünk során az életkor volt az egyetlen szignifikáns előrejelző. Egyes korábbi állatkísérletekben szintén hasonló eredményt kaptak, ahol az állatok öregedésével a különböző szövetek, mint például a vese szöveti cinkszintje csökkent [185, 186].

Ezen eredmények viszont eltérnek a méh cinkszintjének adataitól, ott ugyanis a korábbi kísérletekben a méhszövet cinkszintje a menopauzában volt a legalacsonyabb [183, 187, 188], és feltehetően ez az alacsony cinkszint szerepet játszhatott az atrófiás változások kialakulásában. Honore és mtsai. megállapították, hogy a legalacsonyabb cinkszint a méhben a menopauza után kialakuló alacsony ösztrogén szint mellett következett be és változott a méh szövetmintáinak gyűjtéshelyei alapján is [183]. Mindez azt sugallja, hogy a hüvelyi szövetek és a méh cinkszintjének igen komplex szabályozási mechanizmusa lehet. Eredményeink azt is jelzik, hogy a vér cinkszintje nem

feltétlenül tükrözi a szövetek magas cinkszintjét, hasonlóan a korábbi adatokhoz [208, 209].

A humán szövetekben található nyomelemek kis mennyiségük ellenére jelentős hatást gyakorolnak az anyagcserére. A homeosztázis fenntartásához elengedhetetlen a transzporterek expressziója [103], ezért vizsgálatainkat kiegészítettük a cink transzporter gének mRNS és fehérje expressziójának vizsgálatával.

Jelenleg tíz ZnT (ZnT1–10) és 14 ZIP transzportert azonosítottak (ZIP1–14) [118, 124]. Kutatásunk során kimutattuk az összes cink transzporter mRNS expresszióját a hüvelyi szövetekben, hasonlóan más szöveteken végzett más tanulmányokhoz [210-213]. Az mRNS szintek részletesebb vizsgálata azt mutatta, hogy elvárásainknak megfelelően az *SLC30A4/ZnT4*, *SLC30A9/ZnT9* és *SLC39A2/ZIP2*, *SLC39A3/ZIP3*, *SLC39A6/ZIP6* mRNS expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a posztmenopauzás nők esetében, szemben a premenopauzás nők mRNS expressziójával. Az *SLC30A9/ZnT9* és az *SLC39A6/ZIP6* gének működése különösen fontos lehet, hiszen az expressziós profiljuk változása különböző betegségekhez is kapcsolható. Bizonyították rákos megbetegedésekben ezen cink transzporterek megváltozott expresszióját [214-216].

Az adataink alapján az is elmondható, hogy a transzportek között is volt különbség, hiszen az *SLC30A1/ZnT1* és *SLC30A4/ZnT4* gének, valamint az *SLC39A3/ZIP3*, *SLC39A6/ZIP6* és *SLC39A9/ZIP9* gének mRNS expressziója magasabb volt, mint a többi *SLC30A/ZnT* és *SLC39A/ZIP* gén expressziója. Ez azt mutatja, hogy a szövet cinkellátásában a transzporterek hozzájárulása különböző mértékű lehet.

Az *SLC30A4/ZnT4* erősebb mRNS expresszióját más szövetekben korábbi tanulmányok is kimutatták. Az agyban és az emésztőtraktusban magasabb volt az *SLC30A4/ZnT4* mRNS szintje, mint a test más szöveteiben [217],

ugyanakkor jelentősen csökkent a szintje jó- és rosszindulatú prosztatata megbetegedések esetén [218]. Korábbi kutatások megállapították, hogy a legtöbb *SLC30A/ZnT* transzporter közepes szinten expresszálódik a különböző szervekben, kivéve a *SLC30A9/ZnT9* gént, amelyet nagyobb mértékben expresszál a szív, a vázizom, a here, a pajzsmirigy és a hasnyálmirigy [191].

Mivel a magas transzkripciós szint nem feltétlenül jelenti, hogy az adott fehérje is keletkezik a szövetben, ezért a fehérje jelenlétének bizonyítására, immunhisztokémiai ellenőrzéshez kiválasztottunk néhány transzportert. Az *SLC39A4/ZIP4* és az *SLC39A11/ZIP11* transzporterekre azért esett a választásunk, mert számos tanulmány használta őket genetikai vizsgálatokban [191, 196, 214]. Az *SLC30A9/ZnT9* és az *SLC39A6/ZIP6* transzportereket pedig azért választottuk ki, mert ezek a gének szignifikáns különbséget mutattak az mRNS szintekben a poszt- és premenopauzás csoportokban található nőknél.

Megállapítottuk, hogy mind a négy fehérje kimutatható volt a vizsgált szövetekben. Ugyanakkor nem voltak szignifikáns különbségek a ZIP4, ZIP6 és ZIP11 immunfestés eredményeinkben a pre- és posztmenopauzás hüvelyi szövetek között, ellentétben a ZnT9 fehérje mennyiségével, amely a stratum spinosumban szignifikánsan alacsonyabb volt a posztmenopauzás nők hüvelyszöveiteiben. Ez a fehérje azért érdemel figyelmet, mert bár a ZnT transzporterek családjához tartozik, nem rendelkezik cinkszállító aktivitással, mert hiányzik belőle egy alapvető hisztidin, amely az intramembrán cinkkötő helyet alkotja. Elsősorban a citoplazmában lokalizálódik [219], és sejtmag receptorok koaktivátoraként funkcionál, éppen ennek köszönhetően új elnevezést kapott: GAC63 (GRIP1-kapcsolt koaktivátor 63) [220]. Így szerepének megállapítása a hüvelyszövetben további vizsgálatokat igényel. Már csak ezért is, mert a ZnT9-et kódoló *SLC30A9/ZnT9* gén biallélikus mutációi Birk-Landau-Perez szindrómához vezetnek [221, 222]. Klinikailag

ez a szindróma cerebro-renális szindrómaként jelentkezik, korai kezdetű értelmi fogyatékossgal és a ZnT9 hiány miatt másodlagos tubulointerstitialis nephritis-szel, amely a cink homeosztázisának megzavarásához vezet csökkent citoszolos cinkkoncentrációval [222]. Feltételezhetjük, hogy a postmenopauzás nőknél a csökkent ZnT9 expresszió a citoszolos cink koncentrációjának csökkenéséhez vezethet és hozzájárulhat a posztmenopauzás hüvelyi szövetekben található abnormális extracelluláris összetételhez. Ennek bizonyítására azonban további vizsgálatok szükségesek.

Vizsgálatunkban szintén kimutattuk, hogy az *SLC39A2/ZIP2* és *SLC39A3/ZIP3* mRNS expressziója szignifikánsan alacsonyabb a posztmenopauzás nők esetében. A ZIP1, a ZIP2 és a ZIP3 fehérjék expressziójáról viszont azt tudjuk, hogy a szervezetben gyakran összehangolt módon történik, és például mRNS szintjük csökken az idős emberek limfocitáiban, összehasonlítva kifejeződésükkel a fiatalokban [223]. Ugyanakkor, az *SLC39A2/ZIP2* gén mRNS expressziója jelentősen fokozódik a cink koncentrációjában bekövetkező csökkenés hatására a monocitákban [224], a makrofágokban [225] valamint a keratinocita differenciálódás során [226]. Más tanulmányok pedig az *SLC39A1/ZIP1* és az *SLC39A3/ZIP3* gének mRNS expressziója és az allergiás eredetű légúti gyulladások közötti kapcsolatra hívták fel a figyelmet [227]. E gének rendellenes működése az *SLC39A2/ZIP2*-vel együtt összefüggésbe hozható a prosztatarákkal, ahol a fehérjék expressziója csökkent, utalva potenciális szerepükre, mint daganat-szuppresszorok a prosztatában [228].

Viszonylag magas *SLC39A3/ZIP3*, *SLC39A6/ZIP6* és *SLC39A9/ZIP9* mRNS expressziót találtunk a premenopauzás nők szöveteiben, hasonlóan más tanulmányhoz, amely az *SLC39A6/ZIP6* és *SLC39A9/ZIP9* magas expresszióját írta le különböző szövetekben [191]. Yang és mtsai. kimutatták, hogy az *SLC39A6/ZIP6* expressziója megemelkedett a prosztatában és a

placentában és az *SLC39A6/ZIP6* és az *SLC39A9/ZIP9* a leggyakoribb ZIP transzporterek, amelyek magasan expresszálódnak a különböző emberi szervekben, például a szívben, a herében és a hasnyálmirigyben [191]. Ezek a szerzők azonban nem tesztelték a hüvelyszövet cink transzporter expresszióját.

A ZIP6 fehérje a plazmamembránban található meg és cink transzporterként működik [125, 229], továbbá növekedési faktor által indukáltan szerepet játszhat a jelátvitelben, a cink extracelluláris tér felől az intracelluláris oldalra történő pumpálásával. A fehérje megváltozott expressziója összefüggésben van különböző ráktípusok invazív és áttétet képző képességével, illetve progressziójával [230, 231]. A megnövekedett ZIP6 expresszió mellrák sejtekből [232], hasnyálmirigy [233] és prosztatata karcinómából is kimutatható [234]. A ZIP6 összefüggésbe hozható az emlőrák fokozataival, méretével és stádiumával, ami azt sugallja, hogy erős mozgatórugó a rosszindulatú daganatok kialakulásában [235]. Az adatok alapján, a ZIP6 által mediált cink beáramlás inaktíválja a glikogén-szintetáz-kináz 3 β -t, amely Snail aktivációt és a programozott sejthalál egy típusa elleni rezisztenciát eredményez. A ZIP6 fehérje potenciális célpontja a számos humán rosszindulatú daganatból kimutatható STAT3 molekulának [232]. Ezek a tulajdonságok lehetővé teszik, hogy a ZIP6 a későbbiekben a különböző rákfajták terjedését előre jelezze, illetve terápiás célpontként is szolgálhat áttétet képző daganatok kezelésében [232, 236]. A fehérjének az immunrendszer működésében is fontos szerepe van, így a dendritikus sejtek [237] és a T-sejtek működését is befolyásolja [238].

Feltételezzük tehát, hogy az egyes gének szignifikánsan magasabb expressziói hatással vannak a hüvelyszövet cinkszint szabályozására, illetve a menopauza során kialakuló tünetek megjelenésére, de ezek bizonyítására további kutatások szükségesek.

A továbbiakban a transzporter gének egyes régiók SNP mintázatát is megvizsgáltuk. E munka során sikerült azonosítani egyedi nukleotid polimorfizmusokat (SNP) a magyar nők mintáiban, megvizsgálni az SNP-k hatását a cink koncentrációjára a teljes vérben és a hüvelyszövetben, valamint összehasonlítani eredményeinket más populációkban kapott adatokkal. Megvizsgáltuk azokat a régiókat a hosszabb exonok szekvenciáiban, amelyek más populációkban tartalmaztak misszensz mutációkat, és amelyek később alkalmasak lehetnek a TaqMan SNP genotipizáló vizsgálatok (Thermo Fisher Scientific) használatára is.

Az *SLC30A/ZnT* és *SLC39A/ZIP* géncsaládok polimorfizmusát PCR és szekvenálási módszerekkel vizsgáltuk, amelyhez új primereket terveztünk. A tervezett PCR primerek alkalmazhatók lesznek a cink transzporterek további tanulmányaiban is. A szekvencia-összehasonlításokkal 16 SNP-t tudunk azonosítani, köztük öt új mutációt fedeztünk fel. Az öt új SNP-t feltöltöttük az NCBI dbSNP adatbázisba, ahol a következő hivatkozási számokkal megtalálhatók: rs1558249270, rs1564711111, rs781687046, rs1554873909 és rs1484902933 [16-10]. Az adataink azt mutatták, hogy az *SLC39A2/ZIP2*, *SLC39A4/ZIP4*, *SLC39A12/ZIP12*, *SLC39A14/ZIP14* és *SLC30A10/ZnT10* gének rendelkeztek nagyobb fokú polimorfizmussal. Az *SLC39A4/ZIP4* gén általunk kimutatott, de korábban már azonosított SNP-it (rs117535951, rs187080747, rs17855765) az acrodermatitis enteropathica betegséghez kapcsolták [156]. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az *SLC39A/ZIP* gének tesztelt exonjai valószínűleg hajlamosabbak a pontmutációkra, mint az *SLC30A/ZnT* gének hosszabb exonjai.

Az SNP-k fehérjékre való hatásait tekintve, tíz misszensz mutációt és hat szinoním mutációt találtunk. Különösen magas allélfrekvenciával rendelkezett a korábban azonosított misszensz pontmutációk közül kettő (590 / *SLC39A4/ZIP4* - rs17855765, 292 / *SLC39A14/ZIP14* - rs896378) és egy új

SNP (1459 / *SLC30A10/ZnT10* - rs781687046) a populációnkban az európai és a globális allélfrekvenciákhoz képest. Adatainkból az is kiderült, hogy minden nőnek egyedi SNP mintázata volt. Ez nehezítette az SNP-k és a cinkszintek közötti összehasonlításokat, illetve az összefüggések felismerését. Ráadásul eredményeinket nem tudtuk összehasonlítani az irodalom egyéb adataival sem, mert ez volt az első asszociációs kutatás, amely összefüggést vizsgált az *SLC30A/ZnT* és *SLC39A/ZIP* géncsaládok polimorfizmusai és a hüvelyi szövet cinkszintje között. Bizonyos SNP-k és a cinkszintek között viszont lehetnek összefüggések, hiszen egyes tanulmányokban jelentős összefüggéseket tártak fel a vér cink koncentrációja és a vizsgált SNP-k között. Fujihara és mtsai. szignifikánsan magasabb vér cinkkoncentrációt találtak több pontmutációnál is [*SLC30A3/ZnT3* - rs11126936 (TT és TG genotípus), *SLC39A8/ZIP8* - rs233804 (A allél) és *SLC39A14/ZIP14* - rs4872479 (TT és TG genotípus)] [239]. Ugyanakkor a teljes vérvizsgálat során az általunk kimutatott SNP-kenél (*SLC39A12/ZIP12* - rs10764176 és *SLC39A4/ZIP4* - rs17855765) megerősítettük Fujihara és munkatársai [239] azon eredményeit, hogy ezek a mutációk nem befolyásolják a cinkszintet.

Az összes SNP számát nézve viszont az elemzésünk összefüggést mutatott ki a betegenkénti SNP-k száma és a magas hüvelyszöveti cinkszint (67% vs. 33%, $p = 0,004$) között. Érdekes módon, az *SLC39A4/ZIP4* SNP 590c (rs17855765) szignifikánsan gyakoribb volt a magas hüvelyszöveti cinkszinttel rendelkező nők csoportjában azokhoz képest, akik ezt az SNP-t nem tartalmazták (93% vs. 7%, $p = 0,02$). Továbbá, hogy az *SLC39A4/ZIP4* 590c (rs17855765) gyakran együtt volt jelen az *SLC39A14/ZIP14* 389c (rs2293144) SNP-vel, a magas szöveti cinkszinttel rendelkező nőknél, szemben e két SNP-vel nem rendelkező nőkkel (100% vs. 0%, $p = 0,02$).

Feltételezzük tehát, hogy az *SLC30A/ZnT* és *SLC39A/ZIP* géncsaládok egyes polimorfizmusai befolyásolják a teljes vér és a hüvelyi szövet

cinkkoncentrációját. Az adatok arra utalnak, hogy a transzporterek ezen mutációi befolyásolhatják a cink homeosztázisát, de ennek bizonyítására további vizsgálatok szükségesek.

Vizsgálatunk erőssége, hogy elsőként számoltunk be kiterjedten a pre- és posztmenopauzás nőktől izolált hüvelyi szövetekben található cink transzporterek expressziójáról, elsőként elemeztük a hüvelyi szövet cinkszintjét, és összehasonlítottuk azokat az új egyedi nukleotid polimorfizmusokkal.

Ennek ellenére eredményeink értelmezésekor figyelembe kell venni néhány korlátozást. Vizsgálatunk legfontosabb korlátja a résztvevők kis száma volt. A mintagyűjtés fiatal és egészséges premenopauzás nőktől meglehetősen nagy kihívást jelent, mivel ezek a nők sokkal kevésbé esnek át méheltávolításon. Ezen kívül a pre- és posztmenopauzás nők közötti nagy korkülönbség hozzájárulhatott a cink transzporterek expressziójában tapasztalt különbségekhez. Szinte lehetetlen összegyűjteni az életkornak megfelelő, a menopauza előtti és a posztmenopauzás kohortot.

Csak négy cink transzportert (ZnT9, ZIP4, ZIP6 és ZIP11) értékeltünk immunhisztokémiai módszerekkel. Ezt a munkát az nehezítette, hogy számos cink transzporter esetében nincsenek kereskedelemben kapható antitestek az immunhisztokémia szempontjából, de az új reagensek kifejlesztése céljaink között nem szerepelt, illetve meghaladta volna a költségvetésünket. Az immunhisztokémiai értékeléshez használt Intensity Score módszer megkérdőjelezhető a pontrendszer szubjektív, félkvantitatív jellegével is.

A hüvely szövetben kimutatott alacsonyabb cinkszint korrelál egy friss kutatás tapasztalataival, amely feltárta, hogy a cinktartalmú hüvelygél jelentősen javította a hüvely atrófiájával kapcsolatos tüneteket a posztmenopauzás nőknél, ami arra utal, hogy a cinkpótlás segíthet helyreállítani a hüvelyi szövetek minőségét [179].

A további vizsgálatok tisztázhatják, hogy ezek a változások hozzájárulnak-e az öregedéssel vagy a menopauzával kapcsolatos tünetek (hüvelyi szárazság, atrófia) kialakulásához. További kísérletekkel megállapítható, hogy a cink transzporterek (ZnT és ZIP) differenciális expressziója szerepet játszik-e a menopauzával kapcsolatos állapotok kialakulásában vagy éppen annak következményei. Hisszük, hogy eredményeink, a humán mintákon végzett kísérleteink, jelentős előrelépést jelenthetnek az alap- és menopauza kutatásban.

6. Összefoglalás

Mivel a cink a sejtek és szövetek fontos nyomeleme és fontos szerepet tölt be a sejtosztódásban, valamint a szövetregenerációban, a hiánya pedig számos betegséghez és rendellenességhez vezet, elindítottuk azokat az úttörő jellegű vizsgálatainkat, melyek a hüvelyszövet cinktartalmának meghatározására irányultak. A kapott eredményeket megpróbáltuk összehasonlítani a vér cink koncentrációjával, illetve összekötni a cink transzporter gének mRNS expressziós mintázatával és fehérje termelésével. Emellett a transzporter gének vizsgált exonjaiban előforduló SNP-ket is analizáltuk.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy:

- ¹. Sikerült meghatározni mind a hüvelyszövet, mind a teljes vér cink koncentrációját. A vér cinktartalma közel egységes volt, míg a hüvelyszövet esetén nagyobb változatosságot találtunk a minták között.
- ². Negatív korrelációt találtunk az életkor és a cink szöveti koncentrációja között, viszont a teljes vér cink koncentrációja nem korrelált a beteg életkorával. Eredményeink arra utalnak, hogy a hüvelyszövet cinkszintje az öregedéssel csökken.

- ³. A génexpressziós elemzésekből egyértelműen megállapítható, hogy egyes cinkszállító gének kifejeződése nagymértékben csökken a posztmenopauzában lévő nőknél. A *SLC30A4/ZnT4* és a *SLC30A9/ZnT9*, illetve a *SLC39A2/ZIP2*, *SLC39A3/ZIP3* és *SLC39A6/ZIP6* gének mRNS expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a posztmenopauzás nőknél.
- ⁴. *SLC30A1/ZnT1* és *SLC30A4/ZnT4* gének, valamint a *SLC39A3/ZIP3*, *SLC39A6/ZIP6* és *SLC39A9/ZIP9* gének mRNS expressziója magasabb volt, mint a többi *SLC30A/ZnT* és *SLC39A/ZIP* gén expressziója.
- ⁵. A szöveti cink transzporter fehérjék analízise alapján elmondhatjuk, hogy valamennyi vizsgált fehérje termelődött a hüvelyszövetben. A ZnT9 fehérje expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a posztmenopauzás nőknél, mint a premenopauzásoknál.
- ⁶. A polimorfizmus vizsgálatokhoz tervezett PCR primerek alkalmazhatók lesznek a cink transzporterek további tanulmányozásában is.
- ⁷. A transzporter gének DNS-sének vizsgálata számos SNP-t mutatott ki. A *SLC39A/ZIP* gének vizsgált exonjaiban több SNP-t találtunk, így valószínűleg hajlamosabbak a pontmutációkra.
- ⁸. A kiválasztott exonok szekvenálása 16 SNP-t tárt fel, köztük öt korábban azonosítatlan SNP-t.

⁹. Habár minden résztvevő egyedi SNP mintázattal rendelkezett, számos összefüggést találtunk az SNP-k és a hüvelyszövet vagy a teljes vér cinkszintje között.

¹⁰. Különösen magas allélfrekvenciával rendelkezett a korábban azonosított misszensz pontmutációk közül kettő és egy új SNP a populációnkban az európai és a globális allélfrekvenciákhoz képest.

Eredményeink jelentős előrelépést jelenthetnek a cink homeosztázis és a menopauza kutatásokban, ezen felül új vizsgálati területeket nyithatnak meg. Tanulmányunk alapján a cink transzporter gének különböző SNP-i jelentős hatással lehetnek a vér és a hüvelyi szövet cinkszintjére.

Kutatásokat javasolunk a nyomelemek szöveti szintjének életkor szerinti meghatározására, és több mintával végzett további vizsgálatokat tartunk szükségesnek, hogy pontosabban megérthessük a cink transzporterek expresszió-változásának jelentőségét és polimorfizmusaik cink koncentrációjában betöltött szerepét a teljes vérben és a hüvelyszövetben.

7. Summary

Since zinc is an important trace element in cells and tissues and plays a major role in cell division and tissue regeneration, and its deficiency leads to a number of diseases and disorders, we have started our novel studies to determine the zinc content of vaginal tissue. We compared the obtained results with the zinc concentration in the whole blood and linked with the mRNA expression pattern and protein production of the zinc transporter genes. In addition, SNPs present in the examined exons of the transporter genes were also analyzed.

Summarizing our results, we can conclude that:

- ^{1.} Zinc concentrations in both vaginal tissue and whole blood were determined. The zinc content in the blood was quite uniform, while in the case of vaginal tissue we found greater variability between the samples.
- ^{2.} We have found a negative correlation between age and tissue levels of zinc, but whole blood zinc concentration did not correlate with patient age. Our results suggest that levels of zinc in the vaginal tissue decrease with aging.
- ^{3.} It is clear from gene expression analyzes that the expression of some zinc transporter genes is greatly reduced in postmenopausal women. mRNA expression of *SLC30A4/ZnT4*, *SLC30A9/ZnT9* and *SLC39A2/ZIP2*, *SLC39A3/ZIP3*, and *SLC39A6/ZIP6* genes was significantly lower in postmenopausal women.

4. The mRNA expression of *SLC30A1/ZnT1* and *SLC30A4/ZnT4* genes as well as the *SLC39A3/ZIP3*, *SLC39A6/ZIP6* and *SLC39A9/ZIP9* genes was higher than the expression of other *SLC30A/ZnT* and *SLC39A/ZIP* genes.
5. Based on the analysis of zinc transporters in the tissue, we found that all examined proteins were produced in the vaginal tissue. ZnT9 protein expression was significantly lower in postmenopausal women compared to premenopausal women.
6. PCR primers were designed for polymorphism studies, and these can be applied in further studies of zinc transporters.
7. Examination of the DNA of the transporter genes revealed a number of SNPs. We have found more SNPs in the examined exons of the *SLC39A/ZIP* genes, so those are probably more prone to point mutations.
8. Sequencing of selected exons revealed 16 SNPs, including five previously unidentified SNPs.
9. Although each participant had a unique SNP pattern, we have found several associations between SNPs and vaginal tissue or whole blood zinc level.

¹⁰. Two of the previously identified missense point mutations and one new SNP had a particularly high allele frequency in our population compared to European and global allele frequencies.

Our results could represent a significant advancement in zinc homeostasis and menopausal studies, as well as open up further new areas for research. Our findings indicate that different SNPs of the zinc transporter genes may have a significant effect on the blood and vaginal tissue zinc levels.

Further studies with multiple samples are needed to better characterize the age-related changes in trace elements tissue levels, the expression of zinc transporters and the role of polymorphisms in whole blood and zinc levels of vaginal tissue.

8. Irodalomjegyzék

1. Koch HJ Jr, Smith ER, Shimp NF, Connor J (1956) Analysis of trace elements in human tissues. I. Normal tissues. *Cancer* 9(3):499-511.
2. Prashanth L, Kattapagari KK, Chitturi RT, Baddam VR, Prasad LK (2015) A review on role of essential trace elements in health and disease. *J NTR Univ Health Sci* 4(2):75-85.
3. Siddiqui K, Bawazeer N, Joy SS (2014). Variation in macro and trace elements in progression of type 2 diabetes. *The ScientificWorldJournal* 2014:461591.
4. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N (2015) The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol Rev* 95(3):749-84.
5. Raulin J (1869) Etudes cliniques sur la vegetation. *Ann Sci Nat Bot Biol Vegetale* 11:93.
6. Mazé P (1914) Respectives des elements de solution minerals sur le developement du mais. *Ann Inst Pasteur* 28:21-69.
7. O'Dell BL, Newberne PM, Savage JE (1958) Significance of dietary zinc for the growing chicken. *J Nutr* 65(4):503-18.
8. Todd WR, Elvehjem CA, Hart EB (1934) Zinc in the nutrition of the rat. *Am J Physiol* 107:146-56.
9. Berg JM, Shi Y (1996) The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* 271(5252):1081-5.
10. Horvát M (2016) Az idősek egészségi állapotának javítása vitaminok, ásványi anyagok, nyomelemek segítségével. *Gyógyszerészet* 60:15-22.
11. Maret W, Sandstead HH (2006) Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J Trace Elem Med Biol* 20(1):3-18.
12. Fraker PJ, King LE (2004) Reprogramming of the immune system during zinc deficiency. *Annu Rev Nutr* 24:277-98.

13. Wellinghausen N, Kirchner H, Rink L (1997) The immunobiology of zinc. *Immunol Today* 18(11):519-21.
14. Grahn BH, Paterson PG, Gottschall-Pass KT, Zhang Z (2001) Zinc and the eye. *J Am Coll Nutr* 20: 106-18.
15. Golub MS, Keen CL, Gershwin ME, Hendrickx AG (1995) Developmental zinc deficiency and behavior. *J Nutr* 125:2263S-71S.
16. Dvergsten CL, Fosmire GJ, Ollerich DA, Sandstead HH (1983) Alterations in the postnatal development of the cerebellar cortex due to zinc deficiency. I. Impaired acquisition of granule cells. *Brain Res* 271(2):217-26.
17. Dvergsten CL, Fosmire GJ, Ollerich DA, Sandstead HH (1984) Alterations in the postnatal development of the cerebellar cortex due to zinc deficiency. II. Impaired maturation of Purkinje cells. *Brain Res* 318(1):11-20. 318:11–20.
18. Dvergsten CL, Johnson LA, Sandstead HH (1984) Alterations in the postnatal development of the cerebellar cortex due to zinc deficiency. III. Impaired dendritic differentiation of basket and stellate cells. *Brain Res* 318(1):21-6.
19. Frederickson CJ, Koh JY, Bush AI (2005) The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 6(6):449-62.
20. Jackson MJ (1989) Physiology of zinc: general aspects. Mills CF szerk. *Zinc in human biology*. London: Springer 1-14.
21. Kambe T, Hashimoto A, Fujimoto S (2014) Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases. *Cell Mol Life Sci* 71(17): 3281-95.
22. Barnett JP, Blindauer CA, Kassar O, Khazaipoul S, Martin EM, Sadler PJ, Stewart AJ (2013) Allosteric modulation of zinc speciation by fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1830(12):5456-64.
23. Reyes JG (1996) Zinc transport in mammalian cells. *Am J Physiol* 270:C401-10.
24. Taylor CM, Bacon JR, Aggett PJ, Bremner I (1991) Homeostatic regulation of zinc absorption and endogenous losses in zinc-deprived men. *Am J Clin Nutr.* 53(3):755-63.

25. Hambidge M, Krebs NF (2001) Interrelationships of key variables of human zinc homeostasis: relevance to dietary zinc requirements. *Annu Rev Nutr* 21:429-52.
26. Krebs NF (2013) Update on zinc deficiency and excess in clinical pediatric practice. *Ann Nutr Metab* 62(Suppl 1):19-29.
27. Haase H, Rink L (2014) Zinc signals and immune function. *Biofactors* 40(1):27-40.
28. Qin Y, Dittmer PJ, Park JG, Jansen KB, Palmer AE (2011) Measuring steady-state and dynamic endoplasmic reticulum and Golgi Zn²⁺ with genetically encoded sensors. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(18):7351-6.
29. Vinkenborg JL, Nicolson TJ, Bellomo EA, Koay MS, Rutter GA, Merks M (2009) Genetically encoded FRET sensors to monitor intracellular Zn²⁺ homeostasis. *Nat Methods* 6(10):737-40.
30. Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* 59(4):627-47.
31. Cole TB, Wenzel HJ, Kafer KE, Schwartzkroin PA, Palmiter RD (1999) Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(4):1716-21.
32. Ghosh SK, Kim P, Zhang XA, Yun SH, Moore A, Lippard SJ, Medarova Z (2010) A novel imaging approach for early detection of prostate cancer based on endogenous zinc sensing. *Cancer Res* 70(15):6119-27.
33. Pfeiffer CC, Braverman ER (1982) Zinc, the brain and behavior. *Biol Psychiatry* 17(4):513-32.
34. Costello LC, Franklin RB (2011) Zinc is decreased in prostate cancer: an established relationship of prostate cancer! *J Biol Inorg Chem* 16(1):3-8.
35. Zalewski PD, Millard SH, Forbes IJ, Kapaniris O, Slavotinek A, Betts WH, Ward AD, Lincoln SF, Mahadevan I (1994) Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc. *J Histochem Cytochem* 42(7):877-84.

36. Frederickson CJ, Pérez-Clausell J, Danscher G (1987) Zinc-containing 7S-NGF complex. Evidence from zinc histochemistry for localization in salivary secretory granules. *J Histochem Cytochem* 35(5):579-83.
37. Danscher G, Zimmer J (1978) An improved Timm sulphide silver method for light and electron microscopic localization of heavy metals in biological tissues. *Histochemistry* 55(1):27-40.
38. Akagi T, Kaneda M, Ishii K, Hashikawa T (2001) Differential subcellular localization of zinc in the rat retina. *J Histochem Cytochem* 49(1):87-96.
39. Gustafson GT (1967) Heavy metals in rat mast cell granules. *Lab Invest* 17(6):588-98.
40. Bartels H (2009) Special aspects of postoperative complications following visceral surgery. *Chirurg* 80(9):780-9.
41. Grommes J, Binnebösel M, Klink CD, von Trotha KT, Rosch R, Oettinger AP, Lindlar I, Krones CJ (2011) Balancing zinc deficiency leads to an improved healing of colon anastomosis in rats. *Int J Colorectal Dis* 26(3):295-301.
42. Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley DH, Tay FR, Toledano M (2010) Zinc reduces collagen degradation in demineralized human dentin explants. *J Dent* 39(2):148-53.
43. Takacs P, Zhang Y, Candiotti K, Jaramillo S, Medina CA (2012) Effects of PPAR-delta agonist and zinc on vaginal smooth muscle cells collagen and tropoelastin production. *Int Urogynecol J* 23(12):1775-9.
44. Andreini C, Bertini I, Cavallaro G (2011) Minimal functional sites allow a classification of zinc sites in proteins. *PLoS One* 6(10):e26325.
45. Krishna SS, Majumdar I, Grishin NV (2003) Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Res* 31(2):532-50.
46. Laity JH, Lee BM, Wright PE (2001) Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol* 11(1):39-46.
47. Andreini C, Bertini I (2012) A bioinformatics view of zinc enzymes. *J Inorg Biochem* 111:150-6.

48. Vallee BL, Auld DS (1990) Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 29(24):5647-59.
49. Kochańczyk T, Drozd A, Krężel A (2015) Relationship between the architecture of zinc coordination and zinc binding affinity in proteins--insights into zinc regulation. *Metallomics* 7(2):244-57.
50. Maret W (2012) New perspectives of zinc coordination environments in proteins. *J Inorg Biochem* 111:110-6.
51. Prasad AS, Halsted JA, Nadimi M (1961) Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *Am J Med* 31: 532-46.
52. Devirgiliis C, Zalewski PD, Perozzi G, Murgia C (2007) Zinc fluxes and zinc transporter genes in chronic diseases. *Mutat Res* 622(1-2):84-93.
53. Hambidge M (2000) Human zinc deficiency. *J Nutr* 130(5):1344S-9S.
54. Sandstead HH (2013) Human zinc deficiency: discovery to initial translation. *Adv Nutr* 4(1):76-81.
55. Takeda A, Tamano H (2009) Insight into zinc signaling from dietary zinc deficiency. *Brain Res Rev* 62(1):33-44.
56. Prasad AS (2003) Zinc deficiency. *BMJ* 326(7386):409-10.
57. Penny ME (2013) Zinc supplementation in public health. *Ann Nutr Metab* 62(Suppl 1):31-42.
58. Brown KH, Wuehler SE, Peerson JM (2001) The importance of zinc in human nutrition and estimation of the global prevalence of zinc deficiency. *Food Nutr Bull* 22(2):113-25.
59. McClain CJ (1985) Zinc metabolism in malabsorption syndromes. *J Am Coll Nutr* 4(1):49-64.
60. Solomons NW, Rosenberg IH (1981) Zinc and inflammatory bowel disease. *Am J Clin Nutr* 34(7):1447-8.
61. Weismann K, Hoyer H (1982) Zinc deficiency dermatoses. Etiology, clinical aspects and treatment. *Hautarzt* 33(8):405-10.

62. Henzel JH, DeWeese MS, Lichti EL (1970) Zinc concentrations within healing wounds. Significance of postoperative zincuria on availability and requirements during tissue repair. *Arch Surg* 100(4):349-57.
63. Sandstead HH, Lanier VC Jr, Shephard GH, Gillespie DD (1970) Zinc and wound healing. Effects of zinc deficiency and zinc supplementation. *Am J Clin Nutr* 23(5):514-9.
64. Terril-Robb LA, Clemons DJ, Besch-Williford C, O'Brien DP, O'Dell BL (1996) Morphophysiologic characterization of peripheral neuropathy in zinc-deficient guinea pigs. *Proc Soc Exp Biol Med* 213(1):50-8.
65. Henkin RI, Patten BM, Re PK, Bronzert DA (1975) A syndrome of acute zinc loss. Cerebellar dysfunction, mental changes, anorexia, and taste and smell dysfunction. *Arch Neurol* 32(11):745-51.
66. Sandstead HH (2003) Zinc is essential for brain development and function. *J Trace Elem Exp Med* 16(4):165-73.
67. Ronaghy HA, Halsted JA (1975) Zinc deficiency occurring in females. Report of two cases. *Am J Clin Nutr* 28(8):831-6.
68. Abbasi AA, Prasad AS, Rabbani P, DuMouchelle E (1980) Experimental zinc deficiency in man. Effect on testicular function. *J Lab Clin Med* 96(3):544-50.
69. Abbasi AA, Prasad AS, Ortega J, Congco E, Oberleas D (1976) Gonadal function abnormalities in sickle cell anemia. Studies in adult male patients. *Ann Intern Med* 85(5):601-5.
70. Goldenberg RL, Tamura T, Neggers Y, Copper RL, Johnston KE, DuBard MB, Hauth JC (1995) The effect of zinc supplementation on pregnancy outcome. *JAMA* 274(6):463-8.
71. Keen CL, Hurley LS (1989) Zinc and reproduction: effects of deficiency on foetal and postnatal development. Mills CF szerk. *Zinc in human biology*. London: Springer 183-220.

72. Scholl TO, Hediger ML, Schall JI, Fischer RL, Khoo CS (1993) Low zinc intake during pregnancy: its association with preterm and very preterm delivery. *Am J Epidemiol* 137(10):1115-24.
73. Prasad AS, Oberleas D, Halsted JA (1965) Determination of zinc in biological fluids by atomic absorption spectrophotometry in normal and cirrhotic subjects. *J Lab Clin Med* 66(3):508-16.
74. Hackley BM, Smith JC, Halsted JA (1968) A simplified method for plasma zinc determination by atomic absorption spectrophotometry. *Clin Chem* 14(1):1-5.
75. Pilch SM, Senti FR (1985) Analysis of zinc data from the second National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES II). *J Nutr* 115(11):1393-7.
76. Prasad AS, Fitzgerald JT, Hess JW, Kaplan J, Pelen F, Dardenne M (1993) Zinc deficiency in elderly patients. *Nutrition* 9(3):218-24.
77. Grider A, Bailey LB, Cousins RJ (1990) Erythrocyte metallothionein as an index of zinc status in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(4):1259-62.
78. World Health Organization (2001) *Environmental Health Criteria 221: Zinc*. Geneva: World Health Organization 360.
79. Prasad AS, Beck FW, Bao B, Fitzgerald JT, Snell DC, Steinberg JD, Cardozo LJ (2007) Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. *Am J Clin Nutr* 85(3): 837-44.
80. Tuerk MJ, Fazel N (2009) Zinc deficiency. *Curr Opin Gastroenterol* 25(2): 136-43.
81. Brown KH, Peerson JM, Rivera J, Allen LH (2002) Effect of supplemental zinc on the growth and serum zinc concentrations of prepubertal children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 75(6):1062-71.
82. Age-Related Eye Disease Study Research Group (2001) A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no 8. *Arch Ophthalmol* 119(10):1417-36.

83. Broun ER, Greist A, Tricot G, Hoffman R (1990) Excessive zinc ingestion. A reversible cause of sideroblastic anemia and bone marrow depression. *JAMA* 264(11):1441-3.
84. Pfaffl MW, Gerstmayer B, Bosio A, Windisch W (2003) Effect of zinc deficiency on the mRNA expression pattern in liver and jejunum of adult rats: monitoring gene expression using cDNA microarrays combined with real-time RT-PCR. *J Nutr Biochem* 14(12):691-702.
85. Sakai T, Miki F, Wariishi M, Yamamoto S (2004) Comparative study of zinc, copper, manganese, and iron concentrations in organs of zinc-deficient rats and rats treated neonatally with l-monosodium glutamate. *Biol Trace Elem Res* 97(2): 163-82.
86. Fukada T, Yamasaki S, Nishida K, Murakami M, Hirano T (2011) Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *J Biol Inorg Chem* 16(7):1123-34.
87. Hirano T, Murakami M, Fukada T, Nishida K, Yamasaki S, Suzuki T (2008) Roles of zinc and zinc signaling in immunity: zinc as an intracellular signaling molecule. *Adv Immunol* 97:149-76.
88. Besser L, Chorin E, Sekler I, Silverman WF, Atkin S, Russell JT, Hershfinkel M (2009) Synaptically released zinc triggers metabotropic signaling via a zinc-sensing receptor in the hippocampus. *J Neurosci* 29(9):2890-901.
89. Sharir H, Zinger A, Nevo A, Sekler I, Hershfinkel M (2010) Zinc released from injured cells is acting via the Zn²⁺-sensing receptor, ZnR, to trigger signaling leading to epithelial repair. *J Biol Chem* 285(34):26097-106.
90. Yamasaki S, Sakata-Sogawa K, Hasegawa A, Suzuki T, Kabu K, Sato E, Kurosaki T, Yamashita S, Tokunaga M, Nishida K mtsai (2007) Zinc is a novel intracellular second messenger. *J Cell Biol* 177(4):637-45.
91. Aras MA, Aizenman E (2011) Redox regulation of intracellular zinc: molecular signaling in the life and death of neurons. *Antioxid Redox Signal* 15(8):2249-63.

92. Wilson M, Hogstrand C, Maret W (2012) Picomolar concentrations of free zinc(II) ions regulate receptor protein-tyrosine phosphatase β activity. *J Biol Chem* 287(12):9322-6.
93. Hojyo S, Fukada T, Shimoda S, Ohashi W, Bin BH, Koseki H, Hirano T (2011) The zinc transporter SLC39A14/ZIP14 controls G-protein coupled receptor-mediated signaling required for systemic growth. *PLoS One* 6(3):e18059.
94. Aydemir TB, Liuzzi JP, McClellan S, Cousins RJ (2009) Zinc transporter ZIP8 (SLC39A8) and zinc influence IFN-gamma expression in activated human T cells. *J Leukoc Biol* 86(2):337-48.
95. Velázquez-Delgado EM, Hardy JA (2012) Zinc-mediated allosteric inhibition of caspase-6. *J Biol Chem* 287(43):36000-11.
96. Hansson A (1996) Extracellular zinc ions induces mitogen-activated protein kinase activity and protein tyrosine phosphorylation in bombesin-sensitive Swiss 3T3 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 328(2):233-8.
97. Takeda A, Nakamura M, Fujii H, Tamano H (2013) Synaptic Zn(2+) homeostasis and its significance. *Metallomics* 5(5):417-23.
98. Tamaki M, Fujitani Y, Hara A, Uchida T, Tamura Y, Takeno K, Kawaguchi M, Watanabe T, Ogihara T, Fukunaka A, mtsai (2013) The diabetes-susceptible gene SLC30A8/ZnT8 regulates hepatic insulin clearance. *J Clin Invest* 123(10):4513-24.
99. Hara T, Takeda TA, Takagishi T, Fukue K, Kambe T, Fukada T (2017) Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J Physiol Sci* 67(2):283-301.
100. Küry S, Dréno B, Bézieau S, Giraudet S, Kharfi M, Kamoun R, Moisan JP (2002) Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nat Genet* 31(3):239-40.
101. Fukada T, Kambe T (2011) Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Metallomics* 3(7):662-74.
102. Kambe T, Weaver BP, Andrews GK (2008) The genetics of essential metal homeostasis during development. *Genesis* 46(4):214-28.

103. Lichten LA, Cousins RJ (2009) Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu Rev Nutr* 29:153-76.
104. Palmiter RD, Huang L (2004) Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflugers Arch* 447(5):744-51.
105. Eide DJ (2004) The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflugers Arch* 447(5):796-800.
106. Kamizono A, Nishizawa M, Teranishi Y, Murata K, Kimura A (1989) Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 219(1-2):161-7.
107. Palmiter RD, Findley SD (1995) Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J* 14(4):639-49.
108. Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(11):5624-8.
109. Zhao H, Eide D (1996) The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(6):2454-8.
110. Zhao H, Eide D (1996) The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271(38):23203-10.
111. Eng BH, Guerinot ML, Eide D, Saier MH Jr (1998) Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. *J Membr Biol* 166(1):1-7.
112. Guerinot ML (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta* 1465(1-2):190-8.
113. Gaither LA, Eide DJ (2000) Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. *J Biol Chem* 275(8):5560-4.
114. Kambe T, Suzuki T, Nagao M, Yamaguchi-Iwai Y (2006) Sequence similarity and functional relationship among eukaryotic ZIP and CDF transporters. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 4(1):1-9.

115. Gaither LA, Eide DJ (2001) Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biomaterials* 14(3-4):251-70.
116. Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, Cousins RJ (2006) Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(37):13612-7.
117. Fujishiro H, Yano Y, Takada Y, Tanihara M, Himeno S (2012) Roles of ZIP8, ZIP14, and DMT1 in transport of cadmium and manganese in mouse kidney proximal tubule cells. *Metallomics* 4(7):700-8.
118. Huang L, Tepasamorndech S (2013) The SLC30 family of zinc transporters: a review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. *Mol Aspects Med* 34(2-3):548-60.
119. Lu M, Fu D (2007) Structure of the zinc transporter YiiP. *Science* 317(5845):1746-8.
120. Chao Y, Fu D (2004) Kinetic study of the antiport mechanism of an *Escherichia coli* zinc transporter, ZitB. *J Biol Chem* 279(13):12043-50.
121. Ohana E, Hoch E, Keasar C, Kambe T, Yifrach O, Hershfinkel M, Sekler I (2009) Identification of the Zn²⁺ binding site and mode of operation of a mammalian Zn²⁺ transporter. *J Biol Chem* 284(26):17677-86.
122. Podar D, Scherer J, Noordally Z, Herzyk P, Nies D, Sanders D (2012) Metal selectivity determinants in a family of transition metal transporters. *J Biol Chem* 287(5):3185-96.
123. Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, Ishihara K, Nagao M, Yamaguchi-Iwai Y, Kambe T (2005) Two different zinc transport complexes of cation diffusion facilitator proteins localized in the secretory pathway operate to activate alkaline phosphatases in vertebrate cells. *J Biol Chem* 280(35):30956-62.
124. Jeong J, Eide DJ (2013) The SLC39 family of zinc transporters. *Mol Aspects Med* 34(2-3):612-9.

125. Taylor KM, Morgan HE, Johnson A, Nicholson RI (2005) Structure-function analysis of a novel member of the LIV-1 subfamily of zinc transporters, ZIP14. *FEBS Lett* 579(2):427-32.
126. Wang F, Kim BE, Petris MJ, Eide DJ (2004) The mammalian Zip5 protein is a zinc transporter that localizes to the basolateral surface of polarized cells. *J Biol Chem* 279(49):51433-41.
127. Huang L, Kirschke CP (2007) A di-leucine sorting signal in ZIP1 (SLC39A1) mediates endocytosis of the protein. *FEBS J* 274(15):3986-97.
128. Mao X, Kim BE, Wang F, Eide DJ, Petris MJ (2007) A histidine-rich cluster mediates the ubiquitination and degradation of the human zinc transporter, hZIP4, and protects against zinc cytotoxicity. *J Biol Chem.* 282(10):6992-7000.
129. Bin BH, Fukada T, Hosaka T, Yamasaki S, Ohashi W, Hojyo S, Miyai T, Nishida K, Yokoyama S, Hirano T (2011) Biochemical characterization of human ZIP13 protein: a homo-dimerized zinc transporter involved in the spondylocheiro dysplastic Ehlers- Danlos syndrome. *J Biol Chem* 286(46):40255-65.
130. Jenkitkasemwong S, Wang CY, Mackenzie B, Knutson MD (2012) Physiologic implications of metal-ion transport by ZIP14 and ZIP8. *Biometals* 25(4):643-55.
131. Taylor KM, Nicholson RI (2003) The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochim Biophys Acta* 1611(1-2):16-30.
132. Haase H, Rink L (2009) Functional significance of zinc-related signaling pathways in immune cells. *Annu Rev Nutr* 29:133-52.
133. Szezewczyk B (2013) Zinc homeostasis and neurodegenerative disorders. *Front Aging Neurosci* 5:33.
134. Adlard PA, Parncutt JM, Finkelstein DI, Bush AI (2010) Cognitive loss in zinc transporter-3 knock-out mice: a phenocopy for the synaptic and memory deficits of Alzheimer's disease? *J Neurosci* 30(5):1631-6.
135. Religa D, Strozyk D, Cherny RA, Volitakis I, Haroutunian V, Winblad B, Naslund J, Bush AI (2006) Elevated cortical zinc in Alzheimer disease. *Neurology* 67(1):69-75.

136. Weiss JH, Sensi SL, Koh JY (2000) Zn(2+): a novel ionic mediator of neural injury in brain disease. *Trends Pharmacol Sci* 21(10):395-401.
137. Homma K, Fujisawa T, Tsuburaya N, Yamaguchi N, Kadowaki H, Takeda K, Nishitoh H, Matsuzawa A, Naguro I, Ichijo H (2013) SOD1 as a molecular switch for initiating the homeostatic ER stress response under zinc deficiency. *Mol Cell* 52(1):75-86.
138. Beyer N, Coulson DT, Heggarty S, Ravid R, Hellemans J, Irvine GB, Johnston JA (2012) Zinc transporter mRNA levels in Alzheimer's disease postmortem brain. *J Alzheimers Dis* 29(4):863-73.
139. Bosomworth HJ, Adlard PA, Ford D, Valentine RA (2013) Altered expression of ZnT10 in Alzheimer's disease brain. *PLoS One* 8(5):e65475.
140. Cui Y, Vogt S, Olson N, Glass AG, Rohan TE (2007) Levels of zinc, selenium, calcium, and iron in benign breast tissue and risk of subsequent breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16(8):1682-5.
141. Samman S (2007) Zinc. Mann JI, Truswell AS szerk. *Essentials of Human Nutrition*. 3. kiadás, Oxford: Oxford University Press 138-42.
142. Foster M, Samman S (2010) Zinc and redox signaling: perturbations associated with cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* 13(10):1549-73.
143. Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A (2006) Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res* 5(1):196-201.
144. Chowanadisai W, Lonnerdal B, Kelleher SL (2006) Identification of a mutation in SLC30A2 (ZnT-2) in women with low milk zinc concentration that results in transient neonatal zinc deficiency. *J Biol Chem* 281(51):39699-707.
145. Itsumura N, Inamo Y, Okazaki F, Teranishi F, Narita H, Kambe T, Kodama H (2013) Compound heterozygous mutations in SLC30A2/ZnT2 results in low milk zinc concentrations: a novel mechanism for zinc deficiency in a breast-fed infant. *PLoS One* 8(5):e64045.

146. Isumura N, Kibihara Y, Fukue K, Miyata A, Fukushima K, Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Nishito Y, Ishida R, Narita H mtsai (2016) Novel mutations in SLC30A2 involved in the pathogenesis of transient neonatal zinc deficiency. *Pediatr Res* 80(4):586-94.
147. Giacconi R, Muti E, Malavolta M, Cardelli M, Pierpaoli S, Cipriano C, Costarelli L, Tesei S, Saba V, Mocchegiani E (2008) A novel Zip2 Gln/Arg/Leu codon 2 polymorphism is associated with carotid artery disease in aging. *Rejuvenation Res* 11(2):297-300.
148. Perez-Becerril C, Morris AG, Mortimer A, McKenna PJ, de Bellerocche J (2014) Allelic variants in the zinc transporter-3 gene, SLC30A3, a candidate gene identified from gene expression studies, show gender-specific association with schizophrenia. *Eur Psychiatry* 29(3):172-8.
149. Perez-Becerril C, Morris AG, Mortimer A, Mckenna PJ, de Bellerocche J (2016) Common variants in the chromosome 2p23 region containing the SLC30A3 (ZnT3) gene are associated with schizophrenia in female but not male individuals in a large collection of European samples. *Psychiatry Res* 246:335-40.
150. da Rocha TJ, Blehm CJ, Bamberg DP, Fonseca TL, Tisser LA, de Oliveira Junior AA, de Andrade FM, Fiegenbaum M (2014) The effects of interactions between selenium and zinc serum concentration and SEP15 and SLC30A3 gene polymorphisms on memory scores in a population of mature and elderly adults. *Genes Nutr* 9(1):377.
151. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S mtsai (2007) A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445(7130):881-5.
152. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM mtsai (2007) Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316(5829):1336-41.
153. Quadri M, Federico A, Zhao T, Breedveld GJ, Battisti C, Delnooz C, Severijnen LA, Di Toro Mammarella L, Mignarri A, Monti L mtsai (2012) Mutations in

SLC30A10 cause parkinsonism and dystonia with hypermanganesemia, polycythemia, and chronic liver disease. *Am J Hum Genet* 90(3):467-77.

154. Tuschl K, Clayton PT, Gospe SM Jr, Gulab S, Ibrahim S, Singhi P, Aulakh R, Ribeiro RT, Barsottini OG, Zaki MS mtsai (2012) Syndrome of hepatic cirrhosis, dystonia, polycythemia, and hypermanganesemia caused by mutations in SLC30A10, a manganese transporter in man. *Am J Hum Genet* 90(3):457-66.

155. Baum AE, Hamshere M, Green E, Cichon S, Rietschel M, Noethen MM, Craddock N, McMahon FJ (2008) Meta-analysis of two genome-wide association studies of bipolar disorder reveals important points of agreement. *Mol Psychiatry* 13(5):466-7.

156. Schmitt S, Küry S, Giraud M, Dréno B, Kharfi M, Bézieau S (2009) An update on mutations of the SLC39A4 gene in acrodermatitis enteropathica. *Hum Mutat* 30(6):926-33.

157. Guo H, Jin X, Zhu T, Wang T, Tong P, Tian L, Peng Y, Sun L, Wan A, Chen J mtsai (2014) SLC39A5 mutations interfering with the BMP/TGF- β pathway in non-syndromic high myopia. *J Med Genet* 51(8):518-25.

158. Waterworth DM, Ricketts SL, Song K, Chen L, Zhao JH, Ripatti S, Aulchenko YS, Zhang W, Yuan X, Lim N mtsai (2010) Genetic variants influencing circulating lipid levels and risk of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(11):2264-76.

159. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, Lango Allen H, Lindgren CM, Luan J, Mägi R mtsai (2010) Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet* 42(11):937-48.

160. International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies, Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Johnson AD, Chasman DI, Smith AV, Tobin MD, Verwoert GC, Hwang SJ mtsai (2011) Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature*. 478(7367):103-9.

161. Carrera N, Arrojo M, Sanjuán J, Ramos-Ríos R, Paz E, Suárez-Rama JJ, Paramo M, Agra S, Brenlla J, Martínez S mtsai (2012) Association study of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 71(2):169-77.
162. Gazzellone MJ, Zhou X, Lionel AC, Uddin M, Thiruvahindrapuram B, Liang S, Sun C, Wang J, Zou M, Tammimies K mtsai (2014) Copy number variation in Han Chinese individuals with autism spectrum disorder. *J Neurodev Disord* 6(1):34.
163. Fukada T, Civic N, Furuichi T, Shimoda S, Mishima K, Higashiyama H, Idaira Y, Asada Y, Kitamura H, Yamasaki S mtsai (2008) The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways. *PLoS One* 3(11):e3642.
164. Giunta C, Elçioğlu NH, Albrecht B, Eich G, Chambaz C, Janecke AR, Yeowell H, Weis M, Eyre DR, Kraenzlin M mtsai (2008) Spondylocheiro dysplastic form of the Ehlers-Danlos syndrome--an autosomal-recessive entity caused by mutations in the zinc transporter gene SLC39A13. *Am J Hum Genet* 82(6):1290-305.
165. Krause WJ (2005) Krause's essential human histology for medical students. 3. kiadás, Boca Raton: Universal Publishers 239, 248-49.
166. Konar H (2013) DC Dutta's textbook of gynecology. 6. kiadás, New Delhi:JP Medical Pub 1-7, 57-65.
167. Konar H (2015) DC Dutta's Textbook of obstetrics. 8. kiadás, New Delhi: JP Medical Pub 1-5.
168. Boreham MK, Wai CY, Miller RT, Schaffer JI, Word RA (2002) Morphometric analysis of smooth muscle in the anterior vaginal wall of women with pelvic organ prolapse. *Am J Obstet Gynecol* 187(1):56-63.
169. Squier CA, Mantz MJ, Schlievert PM, Davis CC (2008) Porcine vagina ex vivo as a model for studying permeability and pathogenesis in mucosa. *J Pharm Sci* 97(1):9-21.
170. Röhlich P (2006) Szövettan. 3. kiadás, Budapest: Semmelweis Kiadó 408.

171. Favier A (1996) Relevance of trace element supplements in women of different ages. Nève J, Chappuis P, Lamand M szerk. Therapeutic uses of trace elements. Boston, MA: Springer 83-91.
172. Grider A (2013) Zinc, Copper and Manganese. Stipanuk MH, Caudill MA szerk. Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition. 3. kiadás, St. Louis, MO: Elsevier/Saunders 828-45.
173. Hercberg S, Preziosi P, Galan P, Deheeger M, Papoz L, Dupin H (1991) Dietary intake of a representative sample of the population of Val-de-Marne; III. Mineral and vitamin intake. *Rev Epidemiol Sante Publique* 39(3):245-61.
174. Baudry J, Kopp JF, Boeing H, Kipp AP, Schwerdtle T, Schulze MB (2020) Changes of trace element status during aging: results of the EPIC-Potsdam cohort study. *Eur J Nutr* 59(7):3045-58.
175. Favier A, Hercberg S, Arnaud J, Preziosi P, Galan P (1991) Zinc and copper intakes and status of French population (Val de Marne 1988 Survey). Momcilovic B szerk. Trace Elements in Man and Animal 7. Zagreb: IMI 13-5.
176. Saltman PD, Strause LG (1993) The role of trace minerals in osteoporosis. *J Am Coll Nutr* 12(4):384-9.
177. Margen S, King JC (1975) Effect of oral contraceptive agents on the metabolism of some trace minerals. *Am J Clin Nutr* 28(4):392-402.
178. Farage M, Maibach H (2006) Lifetime changes in the vulva and vagina. *Arch Gynecol Obstet* 273(4):195-202.
179. Takacs P, Kozma B, Erdodi B, Jakab A, Larson K, Poka R (2019) Zinc-containing Vaginal Moisturizer Gel Improves Postmenopausal Vulvovaginal Symptoms: A Pilot Study. *J Menopausal Med* 25(1):63-8.
180. Krones CJ, Klosterhalfen B, Butz N, Hoelzl F, Junge K, Stumpf M, Peiper C, Klinge U, Schumpelick V (2005) Effect of zinc pretreatment on pulmonary endothelial cells in vitro and pulmonary function in a porcine model of endotoxemia. *J Surg Res* 123(2):251-6.

181. Yanagisawa H (2008) Zinc deficiency and clinical practice--validity of zinc preparations. *Yakugaku Zasshi* 128(3):333-9.
182. Prasad AS (2008) Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. *Mol Med* 14(5-6):353-7.
183. Honoré LH, Salkie ML, Jajczay FL (1986) The influence of anatomical site and hormonal status on the copper and zinc levels of human uterine smooth muscle. *Clin Biochem* 19(1):46-8.
184. Lossow K, Kopp JF, Schwarz M, Finke H, Winkelbeiner N, Renko K, Meçi X, Ott C, Alker W, Hackler J mtsai (2020) Aging affects sex- and organ-specific trace element profiles in mice. *Aging* (Albany NY) 12(13):13762-90.
185. Zhang B, Podolskiy DI, Mariotti M, Seravalli J, Gladyshev VN (2020) Systematic age-, organ-, and diet-associated ionome remodeling and the development of ionomic aging clocks. *Aging cell* 19(5):e13119.
186. Oztürk G, Akbulut KG, Afrasyap L (2008) Age-related changes in tissue and plasma zinc levels: modulation by exogenously administered melatonin. *Exp Aging Res* 34(4):453-62.
187. Kelkar MA, Khar SK, Mandakhot VM (1989) Studies on antepartum prolapse of the vagina in buffalo--plasma trace element concentrations. *Arch Exp Veterinarmed* 43(2):315-8.
188. Taneja SK, Kaur R (1990) Pathology of ovary, uterus, vagina and gonadotrophs of female mice fed on Zn-deficient diet. *Indian J Exp Biol* 28(11):1058-65.
189. Takacs P, Jaramillo S, Zhang Y, Datar R, Williams A, Olczyk J, Candiotti K, Medina CA (2013) The effects of PPAR δ agonist and zinc on ovariectomized rats' vagina. *Female Pelvic Med Reconstr Surg* 19(3):126-31.
190. Maret W (2013) Zinc and human disease. *Met Ions Life Sci* 13:389-414.
191. Yang J, Zhang Y, Cui X, Yao W, Yu X, Cen P, Hodges SE, Fisher WE, Brunicardi FC, Chen C mtsai (2013) Gene profile identifies zinc transporters differentially expressed in normal human organs and human pancreatic cancer. *Curr Mol Med* 13(3):401-9.

192. Grattan BJ, Freake HC (2012) Zinc and cancer: implications for LIV-1 in breast cancer. *Nutrients* 4(7):648-75.
193. Lee JY, Kim JH, Hong SH, Lee JY, Cherny RA, Bush AI, Palmiter RD, Koh JY (2004) Estrogen decreases zinc transporter 3 expression and synaptic vesicle zinc levels in mouse brain. *J Biol Chem* 279(10):8602-7.
194. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL mtsai (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55(4):611-22.
195. Pontén F, Jirstrom K, Uhlen M (2008) The Human Protein Atlas--a tool for pathology. *J Pathol* 216(4):387-93.
196. Martin AB, Aydemir TB, Guthrie GJ, Samuelson DA, Chang SM, Cousins RJ (2013) Gastric and colonic zinc transporter ZIP11 (Slc39a11) in mice responds to dietary zinc and exhibits nuclear localization. *J Nutr* 143(12):1882-8.
197. Staden R, Beal KF, Bonfield JK (2000) The Staden package, 1998. *Methods Mol Biol* 132:115-30.
198. McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, Cowley AP, Lopez R (2013) Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* 41:W597-600.
199. Wilson DJ (2019) The harmonic mean p-value for combining dependent tests. *Proc Natl Acad Sci USA* 116(4):1195-200.
200. LabCorp (2009) Analytical Validation Report. Quantification of Zinc in Whole Blood and Red Blood Cells by ICP-MS Analysis. Validation # VR-NOQS-BN-2009-008.
201. Drake EN II, Sky-Peck HH (1989) Discriminant analysis of trace element distribution in normal and malignant human tissues. *Cancer Res* 49(15):4210-5.
202. Aggett PJ, Comerford JG (1995) Zinc and human health. *Nutr Rev* 53(9 Pt 2): S16-22.

203. Bremner I, Beattie JH (1995) Copper and zinc metabolism in health and disease: speciation and interactions. *Proc Nutr Soc* 54(2):489-99.
204. Prohaska C, Pomazal K, Steffan I (2000) Determination of Ca, Mg, Fe, Cu, and Zn in blood fractions and whole blood of humans by ICP-OES. *Fresenius J Anal Chem* 367(5):479-84.
205. Kucharzewski M, Braziewicz J, Majewska U, Góźdz S (2003) Copper, Zinc, and Selenium in Whole Blood and Thyroid Tissue of People with Various Thyroid Diseases. *Biological Trace Element Research* 93(1-3):9-18.
206. Aaseth J, Boivin G, Andersen O (2012) Osteoporosis and trace elements--an overview. *J Trace Elem Med Biol* 26(2-3):149-52.
207. Yücel I, Arpacı F, Ozet A, Döner B, Karayilanoğlu T, Sayar A, Berk O (1994) Serum copper and zinc levels and copper/zinc ratio in patients with breast cancer. *Biol Trace Elem Res* 40(1):31-8.
208. Collecchi P, Cafiero F, Vecchio C (1987) Erythrocyte, plasma and serum level of zinc and copper in normal subjects and in patients with rectal cancer. *Medical Science Research* 15(17):1073-74.
209. Oster O, Dahm M, Oelert H, Prellwitz W (1989) Concentrations of some trace elements (Se, Zn, Cu, Fe, Mg, K) in blood and heart tissue of patients with coronary heart disease. *Clin Chem* 35(5):851-6.
210. Jackson KA, Valentine RA, Coneyworth LJ, Mathers JC, Ford D (2008) Mechanisms of mammalian zinc-regulated gene expression. *Biochem Soc Trans* 36 (Pt 6):1262-6.
211. Ford D (2004) Intestinal and placental zinc transport pathways. *Proc Nutr Soc* 63(1):21-9.
212. Liuzzi JP, Blanchard RK, Cousins RJ (2001) Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. *J Nutr* 131(1): 46-52.

213. Liuzzi JP, Bobo JA, Lichten LA, Samuelson DA, Cousins RJ (2004) Responsive transporter genes within the murine intestinal–pancreatic axis form a basis of zinc homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(40):14355-60.
214. Kang X, Chen R, Zhang J, Li G, Dai PG, Chen C, Wang HJ (2015) Expression Profile Analysis of Zinc Transporters (ZIP4, ZIP9, ZIP11, ZnT9) in Gliomas and their Correlation with IDH1 Mutation Status. *Asian Pac J Cancer Prev* 16(8):3355-60.
215. Li M, Zhang Y, Liu Z, Bharadwaj U, Wang H, Wang X, Zhang S, Liuzzi JP, Chang SM, Cousins RJ mtsai (2007) Aberrant expression of zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) significantly contributes to human pancreatic cancer pathogenesis and progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(47):18636-41.
216. Taylor KM, Morgan HE, Smart K, Zahari NM, Pumford S, Ellis IO, Robertson JF, Nicholson RI (2007) The emerging role of the LIV-1 subfamily of zinc transporters in breast cancer. *Mol Med* 13(7-8):396-406.
217. Huang L, Gitschier J (1997) A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. *Nat Genet* 17(3):292-97.
218. Henshall SM, Afar DE, Rasiyah KK, Horvath LG, Gish K, Caras I, Ramakrishnan V, Wong M, Jeffry U, Kench JG mtsai (2003) Expression of the zinc transporter ZnT4 is decreased in the progression from early prostate disease to invasive prostate cancer. *Oncogene* 22(38):6005-12.
219. Sim DL, Chow VT (1999) The novel human HUEL (C4orf1) gene maps to chromosome 4p12-p13 and encodes a nuclear protein containing the nuclear receptor interaction motif. *Genomics* 59(2):224-33.
220. Chen YH, Kim JH, Stallcup MR (2005) GAC63, a GRIP1-dependent nuclear receptor coactivator. *Mol Cell Biol* 25(14):5965-72.
221. Ferreira CR, Gahl WA (2017) Disorders of metal metabolism. *Transl Sci Rare Dis* 2(3-4):101-39.
222. Perez Y, Shorer Z, Liani-Leibson K, Chabosseau P, Kadir R, Volodarsky M, Halperin D, Barber-Zucker S, Shalev H, Schreiber R mtsai (2017) SLC30A9 mutation

affecting intracellular zinc homeostasis causes a novel cerebro-renal syndrome. *Brain* 140(4):928-39.

223. Giacconi R, Malavolta M, Costarelli L, Busco F, Galeazzi R, Bernardini G, Gasparini N, Mocchegiani E (2012) Comparison of intracellular zinc signals in nonadherent lymphocytes from young-adult and elderly donors: role of zinc transporters (Zip family) and proinflammatory cytokines. *J Nutr Biochem* 23(10):1256-63.

224. Cousins RJ, Blanchard RK, Popp MP, Liu L, Cao J, Moore JB, Green CL (2003) A global view of the selectivity of zinc deprivation and excess on genes expressed in human THP-1 mononuclear cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(12): 6952-7.

225. Subramanian Vignesh K, Landero Figueroa JA, Porollo A, Caruso JA, Deepe GS Jr (2013) Granulocyte macrophage-colony stimulating factor induced Zn sequestration enhances macrophage superoxide and limits intracellular pathogen survival. *Immunity* 39:697-710.

226. Inoue Y, Hasegawa S, Ban S, Yamada T, Date Y, Mizutani H, Nakata S, Tanaka M, Hirashima N (2014) ZIP2 protein, a zinc transporter, is associated with keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 289(31):21451-62.

227. Lang C, Murgia C, Leong M, Tan LW, Perozzi G, Knight D, Ruffin R, Zalewski P (2007) Anti-inflammatory effects of zinc and alterations in zinc transporter mRNA in mouse models of allergic inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292(2):L577-84.

228. Desouki MM, Geradts J, Milon B, Franklin RB, Costello LC (2007) hZip2 and hZip3 zinc transporters are down regulated in human prostate adenocarcinomatous glands. *Mol Cancer* 6:37.

229. Kong BY, Duncan FE, Que EL, Kim AM, O'Halloran TV, Woodruff TK (2014) Maternally-derived zinc transporters ZIP6 and ZIP10 drive the mammalian oocyte-to-egg transition. *Mol Hum Reprod* 20(11):1077-89.

230. Shen R, Xie F, Shen H, Liu Q, Zheng T, Kou X, Wang D, Yang J (2013) Negative correlation of LIV-1 and E-cadherin expression in hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One* 8(2):e56542.
231. Zhao L, Chen W, Taylor KM, Cai B, Li X (2007) LIV-1 suppression inhibits HeLa cell invasion by targeting ERK1/2-Snail/Slug pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 363(1): 82-8.
232. Hogstrand C, Kille P, Ackland ML, Hiscox S, Taylor KM (2013) A mechanism for epithelial-mesenchymal transition and anoikis resistance in breast cancer triggered by zinc channel ZIP6 and STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3). *Biochem J* 455(2): 229-37.
233. Unno J, Satoh K, Hirota M, Kanno A, Hamada S, Ito H, Masamune A, Tsukamoto N, Motoi F, Egawa S, Mtsai (2009) LIV-1 enhances the aggressive phenotype through the induction of epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Int J Oncol* 35(4): 813-21.
234. Lue HW, Yang X, Wang R, Qian W, Xu RZ, Lyles R, Osunkoya AO, Zhou BP, Vessella RL, Zayzafoon M, Mtsai (2011) LIV-1 promotes prostate cancer epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis through HB-EGF shedding and EGFR-mediated ERK signaling. *PLoS One* 6(11):e27720.
235. Takatani-Nakase T (2018) Zinc transporters and the progression of breast cancers. *Biol Pharm Bull* 41(10):1517-22.
236. Taylor KM, Hiscox S, Nicholson RI (2004) Zinc transporter LIV-1: a link between cellular development and cancer progression. *Trends Endocrinol Metab* 15(10):461-3.
237. Kitamura H, Morikawa H, Kamon H, Iguchi M, Hojyo S, Fukada T, Yamashita S, Kaisho T, Akira S, Murakami M, Mtsai (2006) Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell function. *Nat Immunol* 7(9):971-7.

238. Yu M, Lee WW, Tomar D, Pryshchep S, Czesnikiewicz-Guzik M, Lamar DL, Li G, Singh K, Tian L, Weyand CM mtsai (2011) Regulation of T cell receptor signaling by activation-induced zinc influx. J Exp Med 208(4):775-85.

239. Fujihara J, Yasuda T, Kimura-Kataoka K, Takinami Y, Nagao M, Takeshita H (2018) Association of SNPs in genes encoding zinc transporters on blood zinc levels in humans. Leg Med 30:28-33.

Internetes források:

I1. A belső női nemi szervek felépítése: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Scheme_female_reproductive_system-hu.png

I2. Szövetminták homogenizálási protokolljai: https://www.bertin-instruments.com/wp-content/uploads/2016/06/booklet_precellys_july13_BD.pdf

I3. Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/>

I4. NCBI adatbázis: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

I5. Ensembl adatbázis: <https://www.ensembl.org/>

dbSNP (B154) adatbázis:

I6. SLC30A10/ZnT10 - rs1558249270:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1558249270>

I7. SLC30A10/ZnT10 - rs781687046:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs781687046>

I8. SLC39A4/ZIP4 - rs1554873909:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1554873909>

I9. SLC39A4/ZIP4 - rs1564711111:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1564711111>

I10. SLC39A4/ZIP4 - rs1484902933:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1484902933>

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet Gálné Dr. Miklós Ida témavezetőmnek, hogy a munkám során professzionális szakmai segítséget, illetve a dolgozatírás valamennyi fázisában nélkülözhetetlen szakmai-emberi támogatást nyújtott.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Takács Péter Professor Úrnak, a folyamatos támogatást, valamint a közös munkát és a mindenkori megértést. Javasolataival, iránymutatásával nagyban hozzájárult szakmai és tudományos szemléletem fejlődéséhez.

Szeretném megköszönni a FemPharma Kft. és a Larkbio Kft. munkatársainak, hogy oly sok segítséggel hozzájárultak a kísérletek elkészítéséhez és lehetőséget biztosítottak arra, hogy elkészíthessem a disszertációm.

Köszönettel tartozom a DE Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet igazgatóinak, hogy támogatták kutatómunkánk indulását, illetve munkatársainak, hogy biztosították a megkezdett tudományos munka befejezését.

Köszönettel tartozom továbbá szerzőtársaimnak az elmúlt évek közös munkájáért, akik segítségükkel hozzájárultak az értekezés létrejöttéhez és szakmai fejlődésemhez.

Köszönettel tartozok a Debreceni Egyetem munkatársainak, hogy önzetlen segítségnyújtásukkal támogatták munkámat.

Hálával tartozom férjemnek és családomnak, akik mindvégig támogattak tanulmányaim folytatásában, illetve türelemmel viselték az elmúlt időszak megpróbáltatásait.

10. Publikációs lista

A disszertáció alapjául szolgáló, referált nemzetközi folyóiratban megjelent cikkek:

1. **Csikós A**, Kozma B, Baranyai E, Miklós I, Larson K, Póka R, Takacs P (2021) Evaluation of zinc and copper levels in vaginal tissues and whole blood: correlation with age. *BMC Womens Health* 21(1):62.
2. **Csikós A**, Kozma B, Pór Á, Kovács I, Lampé R, Miklós I, Takacs P (2021) Zinc Transporter 9 (SLC30A9) Expression Is Decreased in the Vaginal Tissues of Menopausal Women. *Biol Trace Elem Res* 199(11):4011-4019.
3. **Csikós A**, Takacs P, Miklós I (2020) Comparison of novel single nucleotide polymorphisms of zinc transporters with zinc concentration in the human blood and vaginal tissues. *Biometals* 33(6):323-337.

Hazai és nemzetközi konferencián bemutatott poszterek az értekezés témakörében:

1. **Csikós A**, Kozma B, Miklós I, Pór Á, Kovács I, Lampé R, Takacs P (2020) Differential expression of zinc transporters in vaginal tissues. *Female Pelvic Medicine and Reconstructive Surgery* 26(10S-Suppl1):S127.
2. **Csikós A**, Miklós I, Takács P (2018) Polymorphisms identification of SLC30A (ZnTs) and SLC39A (ZIPs) Family genes in Hungary. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2018. évi Nagygyűlése és a XIII. Fermentációs Kollokvium. Eger, Absztraktfüzet* 10-11.

A disszertáció témájához nem kapcsolódó cikkek:

1. **Csikós A**, Németh MZ, Frenkel O, Kiss L, Váczy KZ (2020) A Fresh Look at Grape Powdery Mildew (*Erysiphe necator*) A and B Genotypes Revealed Frequent Mixed Infections and Only B Genotypes in Flag Shoot Samples. *Plants* 9(9):1156.
2. Pálfi X, Karácsony Z, **Csikós A**, Bencsik O, Szekeres A, Váczy K (2020) The potential use of the culture filtrate of an *Aspergillus niger* strain in the management of fungal diseases of grapevine. *Journal of Central European Agriculture* 21(4):839-850.
3. Váczy KZ, Németh MZ, **Csikós A**, Kovács GM, Kiss L (2018). *Dothiorella omnivora* isolated from grapevine with trunk disease symptoms in Hungary. *European Journal of Plant Pathology* 150(3):817-824.
4. **Csikós A**, Váczy KZ (2015) A szőlő korai tökeelhalásáért felelős kórokozók azonosítása. Tavasz Szél Konferencia. Eger, Tavasz Szél 2015 / Spring Wind 2015 Konferenciakötet: I. kötet 17-22.
5. **Csikós A**, Jankovics T, Váczy Zs, Váczy KZ, Kiss L (2015) DNS-alapú módszerek alkalmazása a hazai szőlőlisztharmat-populációk genetikai változékonyságának feltárásában. *Georgikon for agriculture: A multidisciplinary journal in agricultural sciences* 19(1):79-83.
6. **Csikós A**, Váczy KZ (2014) Lisztharmat a termesztett és a vadon élő szőlőfajokon. *Kertészet és Szőlészet* 63(49):15.
7. Kiss L, **Csikós A**, Jankovics T, Váczy KZ (2014) A hazai szőlőlisztharmat-populációk eredetének nyomában. *Martonvásár* 26(1):24-25.
8. Szabó G, Angyal A, **Csikós A**, Bessenyei É, Tóth E, Kiss P, Szabó Sz (2010) A talajvíz szennyezettségének vizsgálata alföldi településeken. *Földrajzi Közlemények* 134(2):173-187.

9. Szabó G, Angyal A, **Csikós A**, Bessenyei É, Tóth E, Kiss P, Csorba P, Szabó S (2010) Examination of the groundwater pollution at lowland settlements. *Studia Universitatis "Vasile Goldis" Seria Stiintele Vietii (Life Sciences Series)* 20(4):89-95.

Az értekezés témjához nem kapcsolódó absztraktok és poszterek:

1. Németh MZ, **Csikós A**, Pintye A, Váczy KZ, Kiss L (2018) Identification of genetic groups of *Erysiphe necator* in Hungarian vineyards. 11th International Mycological Congress. San Juan, Abstracts book 525.
2. **Csikós A**, Váczy Z, Váczy KZ (2015) Review of grapevine trunk disease related fungal pathogens isolated in Hungary. First Workshop COST Action FA1303 „Sustainable Control of Grapevine Trunk Diseases: Current State and Future Prospects”. Cognac, Abstracts 42.
3. **Csikós A**, Váczy KZ (2015) Pathogenicity of grapevine trunk disease fungal pathogens isolated in Hungary. International Workshop on Fungal Grapevine Trunk Diseases. Eger, Abstract booklet 28.
4. **Csikós A**, Váczy KZ, Jankovics T, Kiss L (2014) Variability of the grapevine powdery mildew fungus, *Erysiphe necator* based on microsatellite markers. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése és EU FP7 PROMISE Regional Meeting. Keszthely, Absztraktfüzet 12.
5. **Csikós A**, Váczy KZ, Kiss L (2014) Szőlőlisztharmatot okozó *Erysiphe necator* változékonyságának vizsgálata mikroszatellit markerek segítségével. 60. Növényvédelmi Tudományos Napok. Budapest, Konferencia kiadvány 101.
6. **Csikós A**, Váczy KZ (2014) Szőlőlisztharmat: újdonságok a nemzetközi kutatásokban. XV. Szőlészeti és Borászati Konferencia. Eger, Konferencia kiadvány 61.

7. **Csikós A**, Váczy KZ (2014) Hazai szőlőlisztharmat-izolátumok vizsgálata mikroszatellit markerek segítségével. XV. Szőlészeti és Borászati Konferencia, Eger, Konferencia kiadvány 59.

8. **Csikós A**, Váczy KZ (2014) Hazai szőlőlisztharmat-izolátumok vizsgálata az rDNS ITS/IGS régiók szekvencia meghatározásával. XV. Szőlészeti és Borászati Konferencia, Eger, Konferencia kiadvány 58.

9. **Csikós A**, Váczy KZ, Kiss L (2012) Examination of genetically informative molecular markers in *Erysiphe necator*. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi Nagygyűlése. Keszthely, Absztraktfüzet 8.