

AFLATOKSIINI B1:N KULKEUTUMINEN JA METABOLIA IHMISISTUKASSA
ISTUKKAPERFUUSIOMENETELMÄLLÄ

Kaisa Lydman

Opinnäytetyö

Lääketieteellinen koulutusohjelma

Itä-Suomen yliopisto

Farmakologian ja toksikologian laitos

Helmikuu 2012

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO

Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen koulutusohjelma

LYDMAN, KAISA H.: Aflatoksiini B1:n kulkeutuminen ja metabolia ihmisistukassa
istukkaperfuusiomenetelmällä (Aflatoxin B1 transfer and metabolism in human
placenta)

Opinnäytetyö 39 sivua

Opinnäytetyön ohjaajat: professori Kirsi Vähäkangas ja tutkija Heidi Partanen
Helmikuu 2012

Avainsanat: istukkaperfuusio, aflatoksiinit, istukka, sikiötoksisuus

Odottavat äidit altistuvat raskaana olleessaan lukuisille haitallisille vierasaineille. Suurin osa vierasaineista siirtyy jossakin määrin sikiöön, jolle ne voivat olla haitallisia. Aflatoksiini B1 on yleinen elintarvikkeita kontaminoiva sienimyrkky, joka on karsinogeeninen, tetrageeninen ja akuutisti tappavakin. Istukkaperfuusiolla voidaan tutkia eettisesti istukan metaboliaa ja kulkeutumista. Istukka on elimistä lajispesifisin, ja tutkittaessa ihmissikiöiden altistumista on oleellista käyttää juuri ihmisistukkaa.

Opinnäytetyössä tutkittiin aflatoksiini B1:n kulkeutumista ja metaboliaa ihmisistukassa istukkaperfuusiomenetelmällä. Tutkimuksessa todettiin, että aflatoksiini B1 siirtyy hyvin istukan läpi sikiön puolelle ja että istukka metaboloii aflatoksiini B1:tä aflatoksikoliksi, joka myös siirtyy sikiöön. Tutkimus tehtiin Kuopion yliopiston farmakologina ja toksikologian laitoksella kesä-elokuussa 2007. Tutkimus on osa suurempaa kokonaisuutta.

SISÄLLYS

I KIRJALLISUUSKATSAUS

1.....	JOHDANTO	3
2.....	ISTUKKA	5
2.1	Istukan rakenne ja verenkierto	5
2.2	Istukan kehitys ja muuttuminen raskauden aikana	6

2.3	Istukan toiminta	9
3.....	ISTUKAN VIERASAINEKINETIIKKA	10
4.....	AFLATOKSIINIT	13
4.1	Esiintyminen ja altistuminen	13
4.2	Toksisuus	14
4.3	Metabolia ihmisessä	16

II KOKEELLINEN OSA

5.....	TYÖN TARKOITUS	18
6.....	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	18
6.1	Käytetyt kemikaalit	18
6.2	Laitteet	19
6.3	Liuokset	20
6.4	Istukkaperfuusiomenetelmä	21
6.5	Tutkittavien aineiden lisääminen	24
6.6	Näytteiden ottaminen	24
6.7	Näytteiden analysointi	25
7.....	TULOKSET	26
8.....	POHDINTA	33
LÄHTEET.....		36

I KIRJALLISUUSKATSAUS

1 JOHDANTO

Talidomikatastrofi 1960-luvun alussa osoitti, ettei istukka suoja sikiötä kemiallisten aineiden haitallisilta vaikutuksilta niin hyvin kuin uskottiin. Äitien raskauden aikaisesta talidomidi-lääkkeen käytöstä pahoinvoinnin estoon oli seurauksena noin 10 000 lapselle eriasteisia synnynnäisiä epämuodostumia (Pasanen 1993).

Nykyään odottavat äidit altistuvat lukuisille kemiallisille yhdisteille, esimerkiksi lääkkeille, ilmansaasteille, tupakansavulle sekä elintarvikkeiden lisäaineille. Äidit käyttävät myös lääkkeitä, joita heidän on sairautensa vuoksi pakko käyttää: Suomessa 46 % äideistä käyttää reseptilääkkeitä raskauden aikana. Esimerkiksi bakteeri-infektion hoitamatta jättäminen altistaa äidin yleistyneelle infektiolle (sepsis) tai voi aiheuttaa keskenmenon, sikiön kuoleman tai rakennepoikkeavuuden sekä altistaa ennenaikaiselle synnytykselle (Heiskanen ym. 2006). Yleisesti ottaen lapsi on herkimmillään anatomisia epämuodostumia aiheuttaville teratogeeneille alkioaikaudella eli raskausviikoilla 3–8. Usein äiti ei varsinkaan jakson alkupuolella tiedä olevansa raskaana eikä siis ymmärrä välttää teratogeeneja, kuten alkoholia tai tiettyjä lääkeaineita (Sadler 2004). Erittäin huolestuttavaa on, että Suomessa tupakointia jatkaa raskauden aikana yksi seitsemästä äidistä (Markussen-Linnet ym. 2005).

Raskauden aikaista altistumista ympäristön kemikaaleille on vaikea valvoa, koska äidit altistuvat niin suurelle määrälle kemikaaleja. Lääkeaineille altistumista on helpompi tutkia, koska niitä käytetään farmakologisesti määritettyinä annoksina ja vasteita monitoroidaan (Myllynen ym. 2007). Tässä työssä tutkittavana aineena oli aflatoksiini B1. Aflatoksiini B1 on yleinen ravintoa kontaminoiva mykotoksiini eli sienimyrkky ja merkittävä riskitekijä maksakarsinooman synnyssä. Ihmiset altistuvat mykotoksiineille ravinnon, kosketuskontaktin ja hengityksen kautta (Pattersson & Lima 2010). Äidin altistumisen seurauksena aflatoksiini B1:n metaboliitteja on löydetty vastasyntyneiden verestä (Abdulrazzaq ym. 2002).

Istukka on mielenkiintoinen tutkimuskohde, sillä se ei ole vain passiivinen kulkeute, vaan kuljetusta istukan läpi tapahtuu myös aktiivisesti. Lisäksi istukka pystyy metaboloimaan vieraita kemikaaleja sekä bioaktivoimaan kemiallisia karsinogeeneja (Myllynen ym. 2007). Ihmissikiön kannalta on erityisen tärkeää tutkia juuri ihmisistukkaa, sillä mikään ihmisen elin ei ole niin lajille spesifinen kuin istukka. Sekä anatomisesti että toiminnallisesti ihmisistukka eroaa eläinlajien istukoista. Tämä on tärkein syy, jonka vuoksi kehitetään tutkimismenetelmiä, joissa voidaan käyttää ihmisistukkaa. Lisäksi eläinkokeiden määrää on pyritty vähentä-

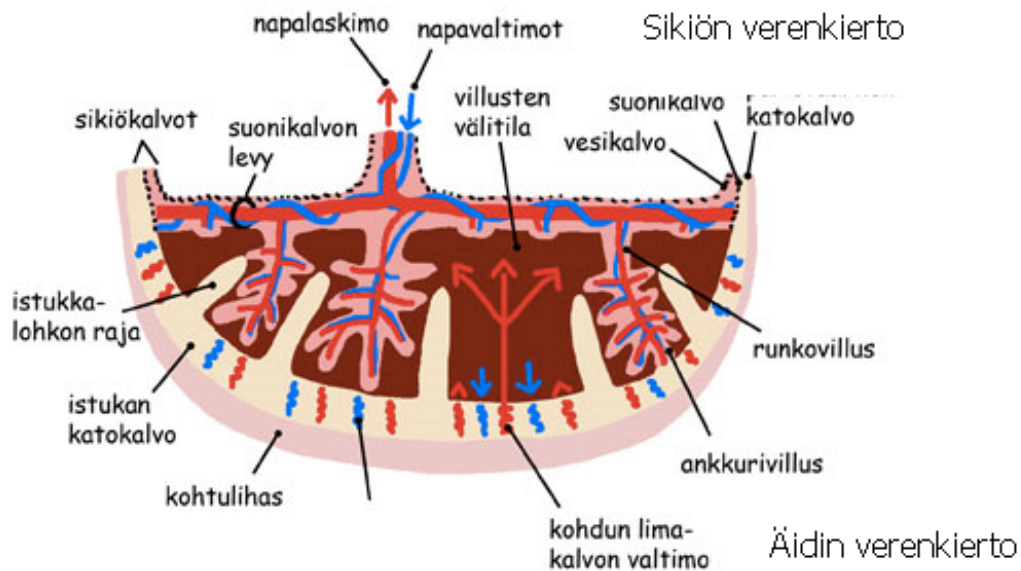
mään viime vuosina sekä yleisen mielipiteen että eettisten syiden takia. Eläinkokeita korvaamaan on kehitetty erilaisia laboratorio-olosuhteissa käytettäviä menetelmiä, jotka käyttävät ihmisistä peräisin olevia kudoksia. Ihmisistukan käyttäminen tieteellisiin tarkoituksiin ei ole Suomessa aiheuttanut suurempia eettisiä ongelmia, sillä länsimaissa istukkaa pidetään synnytyksen jälkeen jätteenä (Halkoaho ym. 2010; Halkoaho ym. 2011). Lisäksi istukan suuri koko mahdollistaa yhden istukan käyttämisen useampaan tutkimukseen. Eettisistä syistä toksikologisia tutkimuksia ei voida tehdä *in vivo* raskaana olevilla äideille (Vähäkangas & Myllynen 2006).

Tässä tutkimuksessa kulkeutumista istukan läpi tutkittiin käyttämällä istukkaperfuusiomallia, jossa ihmisen istukanosaa pidetään elossa perfuusiolaitteistossa keinotekoisien verenkierroksen avulla. Tarkoituksena oli tutkia aflatoksiini B1:n kulkeutumista ja metaboliaa istukassa. Käytettiin ihmisistukan lobuluksen kaksoisperfuusio-menetelmää, jossa äidin ja sikiön puolta perfusoidaan erikseen (Ala-Kokko 2000). Istukkaperfuusio tarjoaa mahdollisuuden tutkia istukan metaboliaa erillisenä äidin ja sikiön metaboliasta (Pienimäki 1997). Aikaisempien istukkaperfuusiotutkimusten perusteella useiden lääkeaineiden suhteen istukkaperfuusion on ajateltu kuvaavan todellista tilannetta äidin elimistössä varsin hyvin. On kuitenkin huomioitava, että laboratorio-olosuhteissa käytettävät menetelmät kuvaavat reaktiota vain pienessä osassa elimistöä kerrallaan eikä täysin vastaavia fysiologisia olosuhteita voida saavuttaa (Myllynen 2003).

2 ISTUKKA2.1 Istukan rakenne ja verenkierroslstukka, *placenta*, on litteä, pyöreähkö ja koostumukseltaan sienimäinen elin. Täysin kehittyneen istukan läpimitta on 15–25 cm, paksuus 3 cm ja paino 500–700 g, ja se peittää 15–30 % kohdun pinnasta. Istukan eri pinnat on nimetty fetaaliseksi eli sikiönpuoleiseksi pinnaksi ja maternaaliseksi eli äidinpuoleiseksi pinnaksi. Fetaaliselle pinnalle kiinnittyy napanuora ja maternaalinen pinta on kiinnittynyt kohdun seinämään. Maternaalipinnassa on lukuisia nukkamaisia ulokkeita, korionvilluksia, jotka ovat uppoutuneina kohdun seinämään. Sikiön veri puhdistuu kuona-aineista villuksis-

sa, joiden pinta-ala on yhteensä 300 m², kun myös villuksia peittävät mikrovillukset lasketaan mukaan (Eskola ym. 1990).

Istukka on jakautunut viidestätoista kahteenkymmeneenviiteen äidin puolelta ko-
hoavien istukkaseptojen eli väliseinien rajaamaan lohkoon (Kuva 1). Väliseinät eivät kuitenkaan yllä aivan sikiönpuoleiseen osaan, joten istukkaan muodostuu 150 ml:n ontelo, jonka kautta kaikki lohkot ovat yhteydessä toisiinsa (Ylikorkala & Kauppila 2001). Napanuora, *funiculus umbilicalis*, yhdistää sikiön ja istukan. Se on raskauden lopulla noin 50 cm pitkä ja halkaisijaltaan 1,5–2 cm. Napanuorassa kulkee kaksi valtimoa (*arteriae umbilicales*) ja laskimo (*vena umbilicalis*). Yleensä napanuora kiinnittyy keskelle istukkaa, mutta se voi lähteä myös istukan reunasta tai kalvosta (Eskola ym. 1990).

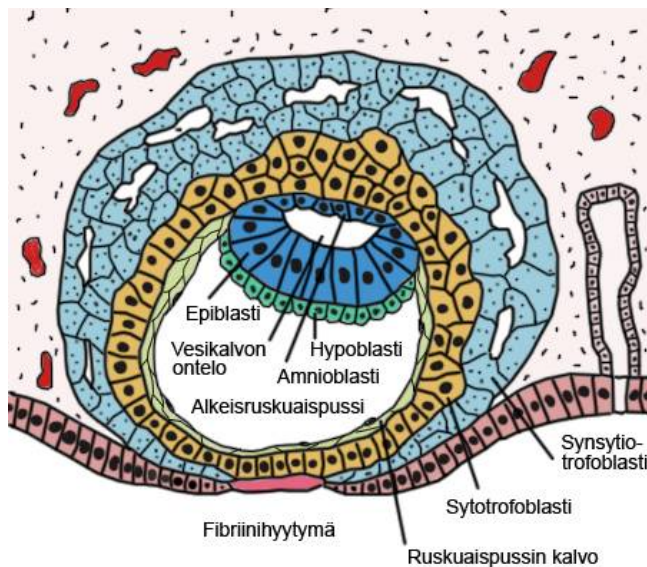


Kuva 1: Istukan rakenne (Solunetti 2011)

Koska sikiön hengitystoiminta alkaa vasta syntymähetkellä, sikiön verenkierto on järjestynyt toisin kuin syntymän jälkeen. Sikiöllä suurin osa verestä ohittaa keuhkot kulkien keuhkovaltimosta valtimokäytävän (*ductus arteriosus Botalli*) kautta aorttaan. Siellä veri sekoittuu vasemmasta kammiosta tulleeseen vereen. Osa verestä kulkee napanuoran valtimoita (*arteriae umbilicales*) pitkin istukkaan ja sieltä villusten sisäpuolella olevien ohuiden hiussuonten kautta takaisin napanuoraan. Veri palaa puhdistuneena ja ravintopitoisena napanuoran laskimoa

(*vena umbilicalis*) myöten maksan kautta alempaan ontolaskimoon. Sieltä veri joutuu sydämen oikeaan eteiseen ja sekoittuu muualta elimistöstä tulleeseen laskimovereen. Eteisten välillä on aukko (*foramen ovale*), jonka kautta osa verestä siirtyy suureen verenkiertoon (Eskola ym. 1990).

2.2 Istukan kehitys ja muuttuminen raskauden aikana Hedelmöitymisen jälkeen tsygootin eli hedelmöittyneen munasolun solut alkavat jakaantua ja muodostavat monisoluisemman blastokystan. Istukan varsinainen kehittyminen alkaa 8. tai 9. päivänä hedelmöitymisestä, jolloin blastokysta on noin 20-soluvaiheessa (Sadler 2004). Tällöin uloimmaksi kohdunseinästä jääneet solut litistyvät ja erilaistuvat trofoblasteiksi, joista aikanaan erilaistuvat istukka ja osa sikiökalvoista (Härkönen & Väänänen 2004). Toisen viikon alussa alkio hautautuu kohdun limakalvoon. Trofoblastikerros jakautuu kahteen kerrokseen, sisempään sytotrofoblastiin ja ulompaan synsytiotrofoblastiin (Kuva 2). Synsytiotrofoblastissa solujen rajat ovat hävinneet, joten se on kuin monitumainen jättisolu, joka on muodostunut sytotrofoblastin soluista. Sytotrofoblastin solut jakautuvat ja niitä sulautuu synsytiotrofoblastiin, joka ei pysty enää jakautumaan. Synsytiotrofoblastiin muodostuu onteloita eli lakunoita. Parin päivän päästä tästä kohdun seinämän kapillaarit ja synsytiotrofoblastin lakunat yhtyvät ja äidin veri täyttää lakunat (Sandler 2004).



Kuva 2: Istukan kehitys: 9. Päivä. Solunetti 2011

Kolmannen viikon alussa sytotrofoblastista alkaa työntyä solupylväitä synsytiotrofoblastiin. Näitä rakenteita kutsutaan primaarisiksi villuksiksi. Villusten päälle jää kerros synsytiotrofoblastisoluja. Sekundäärinen villus muodostuu, kun alkion ulkopuolisesta mesodermista työntyy juoste primaarisen villuksen sisään. Kolmannen viikon lopulla villuksen sisään muodostuu kapillaareja ja venuleita eli pieniä valtimoita ja laskimoita, ja villusta kutsutaan tertiääriseksi villukseksi. Tertiäärisen villuksen kapillaarit muodostavat yhteyden alkion ulkopuolisen mesodermin kapillaarien kanssa. Nämä kapillaarit ovat yhteydessä sikiökannan eli tulevan napanuoran kautta alkionsisäiseen verenkiertoon. Näin veriyhteys sikiön ja istukan välillä on valmiina, kun sydän alkaa lyödä neljännellä viikolla. Samaan aikaan sytotrofoblastin solut jatkavat tunkeutumista synsytiotrofoblastin läpi, kunnes ne saavuttavat kohdun limakalvon. Vierekkäisten villusten kärjissä olevat sytotrofoblastisolut sulautuvat yhteen ja muodostavat ulomman sytotrofoblastikerroksen, joka ympäröi koko trofoblastia ja kiinnittää istukan tiukasti kohdun limakalvoon. Tätä osaa kohdun limakalvosta kutsutaan katekalvoksi eli *decidua basalikseksi* (Sadler 2004).

Ankkuroivia villuksia kutsutaan runkovilluksiksi. Kaikki villukset eivät kasva kiinni katekalvoon, vaan ne jäävät vapaiksi villuksiksi eli päätevilluksiksi runkovillusten väliin. Päätevillukset haarautuvat sytotrofoblastin lakunoihin ja huolehtivat kaasujen ja ravinteiden vaihdosta äidin ja sikiön verenkierron kesken. Äidin verisuonet kulkevat uloimman synsytiotrofoblastikerroksen läpi ja kuljettavat verta lakunoihin. Sikiön ja äidin verenkierron erottaa lopuksi vain kaksi solukerrosta, synsytiotrofoblasti ja villusten kapillaarien endoteeli, kun sidekudos ja sytotrofoblasti myöhemmin häviävät. Alkuraskaudessa koko alkiota ympäröivä trofoblasti on villusten peittämä. Myöhemmin vain napanuoranpuoleisen pään villukset jatkavat kasvuaan. Toisella puolella villukset degeneroituvat. Trofoblastin röpelöistä puolta kutsutaan nimellä nukallinen suonikalvo, *chorion frondosum*, ja sileää puolta nimellä nukaton suonikalvo, *chorion laeve*. Nukallinen suonikalvo ja katekalvo muodostavat yhdessä istukan. Neljännen ja viidennen kuukauden paikkeilla ka-

tekalvosta kasvaa septoja, jotka jakavat istukan viidestätoista kahteenkymmeneenviiteen istukkalohkoon. Septat eivät ylety suonikalvoon asti, joten istukka-lohkojen välillä säilyy veriyhteys. Suonikalvossa kulkevat verisuonet napanuoraan. Äidin puolelta veri tulee istukkaan noin sataa pikkuvaltimoa pitkin (Sandler 2004).

15–16 raskausviikkoon mennessä istukka on täysin kehittynyt, mutta se kasvaa edelleen kooltaan ja sen kudokset uusiutuvat kehittyvän sikiön tarpeita vastaviksi. Sikiön kasvaessa myös sen tarve ravinteisiin ja muihin tekijöihin kasvaa. Tämä aiheuttaa suuria muutoksia istukkaan. Raskauden loppupuolella istukka alkaa rappeutua. Lapsen syntymän jälkeen istukka irtoaa kohdun seinämästä ja poistuu 20–30 min lapsen syntymisen jälkeen (Sadler 2004).

2.3 Istukan toimintalstukka on monimutkainen elin, jonka rakenne ja toiminta muuttuvat suuresti raskauden aikana ja joka osallistuu moniin erilaisiin tehtäviin. Sikiö saa tarvitsemansa hapen ja ravinnon äidin verestä istukan välityksellä, kun alkeissydän on alkanut toimia kuudennella viikolla (Eskola ym. 1990). Istukan päätehtävänä onkin metabolisten ja kaasumaisten tuotteiden vaihto maternaalisen ja fetaalisen verenkierron välillä sekä hormonien tuotto. Kaasujen, kuten hapen, hiilidioksidin ja hiilimonoksidin, vaihtaminen tapahtuu diffuusiolla. Äidin valtimoveri syöksyy pulssin tahdissa istukan välitilaan noin sadasta spiraalivaltimosta, jotka ovat kohtuvaltimoiden päätehaaroja. Kerrallaan istukassa on noin 150 ml verta, joka vaihtuu 3–4 kertaa minuutissa. Sikiö ottaa 20–30 ml happea minuutissa äidin verenkierrosta, ja lyhytkin katkos hapenkulussa on sikiölle kohtalokas. Ravintoaineiden ja elektrolyyttien, kuten aminohappojen, vapaiden rasvahappojen, hiilihydraattien ja vitamiinien, vaihtaminen on nopeaa ja lisääntyy raskauden edistyessä. Hiilidioksidi ja muut aineenvaihdunnan lopputuotteet sekä ylimääräinen lapsivesi poistuvat istukan kautta sikiön verestä äidin verenkiertoon (Sadler 2004). Äidin tuottamat vasta-aineet (immunoglobuliini G, IgG) alkavat siirtyä sikiöön istukan välityksellä 14. viikolla. Sikiölle kehittyy näin passiivinen immunitetti. Vastasyntyneet alkavat tuottaa omaa IgG:tä, mutta tuotanto on tehokasta vasta kolmen vuoden iässä (Sadler 2004). Istukka tuottaa hormoneita, jotka ovat tärkei-

tä sekä istukan elinkyvyille että sikiön kehitykselle. Neljänteen raskauskuukauteen mennessä istukka alkaa tuottaa riittävästi progesteronia raskauden ylläpitämiseksi, kun keltarauhanen, *corpus luteum*, alkaa rappeutua. Progesteronin lisäksi istukka tuottaa lisääntyvässä määrin estrogeenihormoneja, erityisesti estrioleja, melkein raskauden loppuun asti. Tällöin hormonitasot ovat korkeimmillaan. Korkeat estrogeenipitoisuudet stimuloivat kohdun kasvua ja maitorauhasten kehitystä. Kahden ensimmäisen raskauskuukauden aikana istukka tuottaa koriongonadotropiinia, hCG:tä, joka ylläpitää corpus luteumia. Istukka tuottaa myös somatomammotropiinia, joka on kasvuhormonin kaltainen hormoni. Se antaa sikiölle etuoikeuden äidin veren glukoosiin ja edistää rintojen kasvua maidon tuottamista varten (Härkönen & Väänänen 2004). Istukka toimii myös suojana taudinaiheuttajia ja myrkyllisiä aineita vastaan. Istukassa on entsyymiaktiivisuutta vierasainemetaboliaan sekä useita vierasaineita kuljettavia kuljetusproteiineja (Vähäkangas & Myllynen 2006). Useimmat bakteerit eivät pysty läpäisemään istukkaa siirtyäkseen äidin verenkierrosta sikiön verenkiertoon. Osa viruksista kuitenkin pystyy tähän, esim. vihurirokon ja kupan aiheuttajat sekä HIV-virus. Useimmat lääkeaineet ja monet vierasaineet läpäisevät istukan (Eskola ym. 1990).

3 ISTUKAN VIERASAINEKINETIIKKA

Ihmiset altistuvat nyky maailmassa päivittäin sadoille eri vierasaineille, joita saadaan hengitysilmosta, ruuasta ja juomasta sekä elintapatekijöiden kautta (esim. tupakka, huumeet, alkoholi) (Pasanen 1993). Suurin osa aineista, joille äiti altistuu raskauden aikana, siirtyy jossain määrin istukan kautta myös sikiöön. Vierasaineet kulkeutuvat sikiöön istukan kautta lähinnä passiivisen kulkeutumisen avulla eli siirtymällä energiaa kuluttamatta pienemmästä pitoisuudesta suurempaan. Lisäksi tapahtuu aktiivista kulkeutumista, joka ei riipu pitoisuuseroista, vaan voi tapahtua suurtakin pitoisuuseroa vastaan, mihin tarvitaan energiaa ATP-muodossa. Aktiivisia kulkeutumistapoja ovat transporttereiden, fagosytoosin ja pinosytoosin avulla tapahtuvat kulkeutumiset. Fagosytoosi ja pinosytoosi ovat

kuitenkin niin hitaita kulkeutumistapoja, ettei niillä ole merkitystä vierasaineiden siirtymiselle istukan läpi (Myllynen ym. 2007). Aineiden kyky läpäistä istukka ja siirtyä äidin verenkierrosta sikiön verenkiertoon riippuu vierasaineen ja istukan ominaisuuksista sekä maternaali- ja fetaalipuolen verenkierrosta. Istukassa on kaksi lipidikalvoa maternaali- ja fetaalikiertojen välillä, ja siksi aineiden läpäisevyyden määrittävät fysikokemiaaliset ominaisuudet on tärkeä tuntea tarkasteltaessa aineiden kulkua istukan läpi (Ala-Kokko ym. 2000). Äidin ja sikiön verenkiertoja erottavan kerroksen paksuus myös vaihtelee raskauden eri vaiheissa (Heiskanen ym. 2006). Istukasta johtuvia tekijöitä ovat läpäisevyys ja aktiivinen kuljetus. Äidistä ja sikiöstä riippuvia vierasaineiden kulkeutumiseen vaikuttavia tekijöitä ovat mm. puhdistuma, proteiiniin sitoutuminen ja veren pH. Koska äidillä ja sikiöllä on erillinen verenkierto, passiivisella diffuusiolla siirtyvien aineiden siirtymistä ei rajoita diffuusionopeus vaan napaverenkierto, jonka kapasiteetti kuljettaa ainetta istukkaan on rajallinen (Hupponen ym. 2001). Lisäksi raskauden aikana äidin elimistössä tapahtuu lukuisia muutoksia, jotka vaikuttavat myös lääkeaineiden pitoisuuksiin. Monien lääkeaineiden jakautumistilavuus kasvaa äidin verivolyymin lisääntyessä ja poistuminen elimistöstä voi nopeutua vilkastuneen munuaispuhdistuman vuoksi. Maksan toiminta voi raskauden aikana kiihtyä tai hidastua, minkä vuoksi vierasaineiden pitoisuudet plasmassa jäävät normaalia pienemmiksi tai kasvavat (Heiskanen ym. 2006). Tärkein kulkeutumismekanismi istukan läpi on passiivinen kulkeutuminen. Tärkeimmät fysiokemiaaliset aineiden ominaisuudet siirtymiseen istukan läpi passiivisella kulkeutumisella ovat aineen molekyylipaino, pK_a eli happovakio (kertoo kuinka vahva happo aine on), rasvaliukoisuus ja proteiinisitoutuminen (Myllynen ym. 2007). Helpoiten istukan läpäisevät molekyylipainoltaan pienet aineet (alle 500 daltonia), rasvaliukoiset ja varautumattomat aineet (Heiskanen ym. 2001). Aineiden läpäisy äidin verenkierrosta sikiön verenkiertoon noudattaa yleisiä biologisten membraanien läpäisemisperiaatteita. Lipidiliukoiset aineet, jotka ovat täysin tai pääasiassa ioni-soitumattomassa muodossa, pääsevät läpi helposti ja nopeasti. Vesiliukoisten aineiden kulkeutuminen membraanin läpi on hankalampaa. Tarpeeksi pienet molekyylit kulkeutuvat lähes yhtä helposti ja nopeasti kuin rasvaliukoisetkin aineet,

kun taas suuret orgaaniset ionit läpäisevät verisuonten membraanit huonosti tai eivät lainkaan (Kivistö ym. 2001).

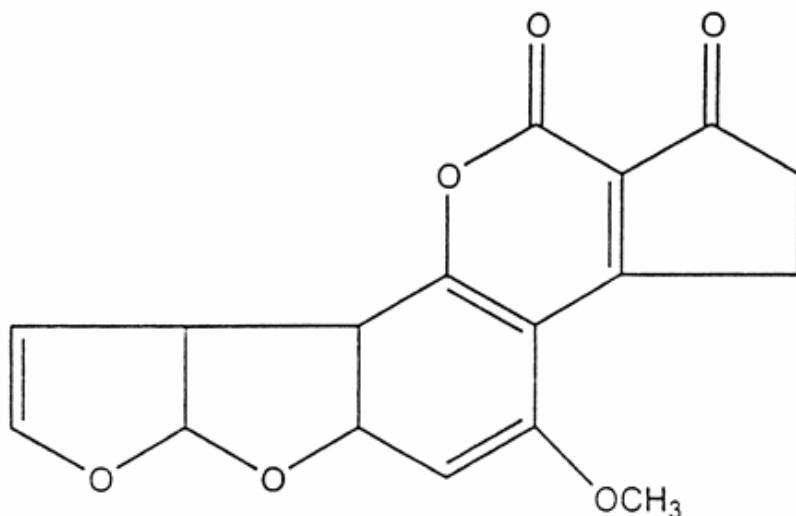
Istukassa tapahtuu aineiden passiivisen siirtymisen lisäksi myös aktiivista kuljetustoimintaa, joka perustuu istukkasolujen kykyyn tuottaa ja käyttää hyväkseen energiaa (Eskola ym. 1990). Aktiivisessa kuljetuksessa aine kulkee vastoin konsentraatiogradienttia, jolloin siirtyminen vaatii energiaa. Yksi mekanismi siirtää vain yhtä ainetta tai muutamia lähisukuisia aineita ja mekanismilla on maksimikapasiteettinsa (Kivistö ym. 2001).

Istukka toimii myös sulkuna, jolloin kemikaalit voivat kerääntyä sikiöön. Heikot emäkset, jotka hajoavat fysiologisella pH-alueella, saattavat istukan läpäistyään sikiön hieman happamammassa ympäristössä ionisoitua ja jäädä ioniloukkuun sikiön puolelle (Pasanen 1993).

Metabolian päätehtävä on muuttaa elimistöön tullut vierasaine erityskelpoiseen muotoon. Tämä tapahtuu useiden erilaisten entsyymattisten reaktioiden kautta, joissa aine muutetaan vesiliukoisemmaksi (Raunio 2001). Istukan metaboliakyky maksaan verrattuna on rajallinen: istukan vierasainemetabolia-aktiivisuudet ovat vain kymmenes- tai sadasosa maksan vastaavista arvoista (Pasanen 1993). Keskeisin metabolia elimistössä tapahtuu CYP-entsyymien kautta: istukassa on kuitenkin vähäinen määrä CYP-entsyymejä (esim. CYP 1A1). Eri entsyymien esiintyminen istukassa riippuu siitä, mikä raskauskolmannes on meneillään (Pasanen 1993), ja myös elintapatekijät, kuten alkoholi ja tupakka, vaikuttavat vierasaine-entsyymien aktiivisuuteen.

4.1 Esiintyminen ja altistuminen

Aflatoksiini B1 (AFB1) on mykotoksiini eli sienimyrkky, jota tuottavat *Aspergillus*-lajit ja näistä tärkeimpänä *Aspergillus Flavus* (Partanen ym. 2010). Muita merkittävimpiä aflatoksiineja ovat aflatoksiinit B2, G1 ja G2. Aflatoksiini B1 on yleisin ja kaikista luonnon tunnetuista karsinogeeneista potentiaalisin.



Kuva 3: Aflatoksiini B1 (Bennet & Klich 2003)

Aflatoksiinia muodostuu elintarvikkeisiin usealla eri tavalla ja eri vaiheessa. Vilja saattaa kontaminoitua jo pellolla ennen viljankorjuuta, mutta yleensä kontaminaatio tapahtuu varastoinnin aikana. Erityisesti viljan ja varastotilan kosteus ovat tärkeitä aflatoksiinin muodostumiselle altistavia tekijöitä (Bennet & Klich 2003). Aflatoksiineja voidaan löytää useista hyödykkeistä, kuten viljoista, öljyisistä siemenistä, mausteista, pähkinöistä, maidosta, lihasta ja kuivatusta hedelmistä. Eläinperäisiin tuotteisiin ja lihaan aflatoksiinia joutuu, kun esimerkiksi lehmille tai kanoille syötetään aflatoksiinia sisältäviä rehuja (Turkez & Geyikoglu 2010). Maissi ja maapähkinät ovat ihmisille yleisin aflatoksiininlähde, sillä ne ovat alttiita kontaminoitumaan ja niitä käytetään runsaasti ympäri maailman (Strosnider ym. 2006). Aflatoksiinialtistus voi tapahtua myös ilmaitse käsiteltäessä aflatoksiinia sisältä-

viä tuotteita (Sambo 2006).

4.2 Toksisuus

Ensimmäisen kerran aflatoksiinia eristettiin Englannissa vuonna 1962, kun arviolta 100 000 kalkkunaa kuoli tuntemattomaan tautiin (Turkey X Disease). Kun kuolleet jäljitettiin kalkkunoiden syömiin maapähkinöihin, löydettiin näistä *Aspergillus flavus*in metaboliitteja, aflatoksiineja (Bennet & Klich 2003). Sen jälkeen aflatoksiiniepideoita on todettu sekä ihmisissä että eläimissä ympäri maailmaa (Sambo 2006).

Akuutti aflatoksiinimyrkytys johtaa kuolemaan, krooninen altistus syöpään, immuniteettihäiriöihin ja muihin patologisiin vaikutuksiin (Bennet & Klich 2003). Erietyisesti Saharan eteläpuolisessa Afrikassa mytotoksinoosit lyhentävät ihmisten eliniänodotetta (Sambo 2006).

Viimeisin vakavista epideoista on Keniassa keväällä 2004 todettu aflatoksiinimyrkytys-epidemia. Aflatoksiinimyrkytyksiä raportoitiin kuuden kuukauden ajalta 341 ja kuolemia 123. Kuolleisuus aflatoksiinimyrkytyksiin oli 36 %. Keniassa raportoidaan 1,8 miljoonan ihmisen käyttävän aflatoksiinia sisältäviä tuotteita (Sambo 2006). Aflatoksiiniepidemiat ovat erityisen haastavia kuumilla ja kosteilla alueilla Saharan eteläpuolella Afrikassa ja Kiinassa, missä joudutaan varastoi-
maan ruokaa puutteellisissa, sienten kasvulle otollisissa oloissa. Lisäksi nälänhädästä kärsivissä maissa ei ruuan laatuun kiinnitetä paljon huomiota (Vähäkangas & Savolainen 2003).

On arvioitu, että aikuiselle 10,20 mg aflatoksiinia on tappava annos. Akuutin aflatoksiinimyrkytyksen seurauksena on maksan vajaatoiminta ja nopea kuolema. Kliininen kuva akuutissa aflatoksiinimyrkytyksessä on akuutti toksinen maksavaurio, ja maksan histologisissa näytteissä nähdään morfologisia muutoksia toksiseen hepatiittiin viitaten; mm. maksan keskilohkojen nekroosia, sappitien laajen-

tumista, sapen virtauksen estymistä ja maksan sidekudostumista. Akuutin aflatoksiinimyrkytyksen kuolleisuus on 10–60 %. Vuoden jälkeen eloonjääneillä ei ollut ikterusta eli keltatautia eikä muitakaan haittavaikutuksia (Peraica ym. 1999). Akuutin aflatoksiinimyrkytyksen arvioidaan kuitenkin olevan alidiagnosoitu maksavaurion aiheuttaja (Sambo 2006). Akuutit aflatoksiinimyrkytykset ovat paljon harvinaisempia kuin aflatoksiinin krooniset vaikutukset (Bennet & Klich 2003).

Kansainvälinen syöväntutkimuslaitos (International Agency for Research on Cancer, IARC) on luokitellut aflatoksiini B1:n ensimmäiseen luokkaan: "Ihmiselle syöpää aiheuttavat aineet" (Vähäkangas & Savolainen 2003). Aflatoksiini B1:n metaboliatuote M1 on luokiteltu "Ihmisille mahdollisesti syöpää aiheuttavat aineet" -luokkaan (Peraica ym. 1999). Aflatoksiini B1 vaurioittaa maksasoluja ja on voimakas mutageeni ja karsinogeeni. Koe-eläimissä aflatoksiini B1 aiheuttaa maksan, mahalaukun, suoliston, munuaisten ja sylkirauhasten kasvaimia (Elonen 2001). Eräillä Afrikan ja Kaukoidän alueilla (mm. Kenia ja Filippiinit), joissa ihmiset altistuvat aflatoksiinille, on myös maksasyöpä endeeminen tauti, joka ilmenee jo nuorilla. Samoilla alueilla myös hepatiitti B -viruksen aiheuttamat maksatulehdukset ovat yleisiä. Todennäköisesti nämä kaksi tekijää toimivat synergistisesti maksasyövän ilmaantuvuuden lisäämisessä (Vähäkangas & Savolainen 2003). On arvioitu, että tällaisissa maissa riski sairastua maksasyöpään on 11/100 000 kansalaista vuosittain. Aflatoksiinien korkeilla esiintymisalueilla maksasyövän riski on viisinkertainen. Jos henkilöllä on lisäksi hepatiitti B -virus, on riski kaksitoistakertainen (Sambo 2006). Saharan eteläpuolisessa Afrikassa ja Kaakkois-Aasiassa, joissa 80 % maailman maksasolusyövästä esiintyy, on myös korkein lasten osuus syöpään sairastuneista. Tämä johtunee geneettisten tekijöiden lisäksi aikaisesta alistuksesta ympäristön karsinogeneille (Partanen ym. 2010).

Aflatoksiini B1 on yhdistetty maksatoksisuuden lisäksi myös muiden kudosten kasvaimiin, esimerkiksi keuhkokasvaimiin. Lisäksi kroonisen altistuksen ajatellaan aiheuttavan immunitetin heikkenemistä ja kasvun hidastumista sekä häiritsevän ravinnonottoa (Strosnider ym. 2006). Kwashiorkor-taudin, vaikean lapsuu-

den aikaisen aliravitsemusta aiheuttavan taudin, arvellaan olevan yhteydessä lapsuuden aikaiseen aflatoksiinialtistukseen, kuten myös Reyen syndrooman (Bennet & Klich 2003). Lapsille aflatoksiinialtistuminen aiheuttaa alipainoisuutta, hidastunutta kehitystä, neurologisia vammoja, immunosuppressiota eli mm. alentuneita IgA-pitoisuuksia sekä lisää kuolleisuutta (Sambo 2006).

Aflatoksiini B1:n haitallisuudesta ihmiselle ei ole epävarmuutta. Vielä ei kuitenkaan tiedetä, millä mekanismilla aflatoksiini B1 aiheuttaa toksisuuden ihmisille. Aflatoksiinin aiheuttaman solukalvolle haitallisten lipidiperoksidejen muodostumisen arvellaan olevan pääasiallisesti vastuussa aflatoksiinin toksisuudesta. Tämän lisäksi aflatoksiini aiheuttaa kohdesoluissa mikrotumaisuutta, sisarkromatiidien muutoksia, tarkoituksetonta DNA-synteesiä ja kromosomisidosten katkeamia (Turkez & Geyikoglu 2010).

Aflatoksiinin vaikutuksia ihmisiin on ollut vaikea ennakoida. Kun vaikutuksia koe-eläimiin yritettiin selvittää, todettiin suuri vaihtelevaisuus eri lajien alttiudesta sairastua aflatoksiinin vaikutuksesta. (Bennet & Klich 2003).

4.3 Metabolia ihmisessä

Jotta aflatoksiini B1 olisi toksinen, sen täytyy aktivoitua metabolisesti elimistössä. Tärkein metabolinen elin on maksa. Aikuisen maksan entsyymeistä CYP1A2 ja 3A4 ovat tärkeimmät AFB1:tä metaboloivat entsyymit. Ne hajottavat aflatoksiini B1:n metaboliiteiksi, jotka eritetään elimistöstä tai jotka voivat reagoida makromolekyylien kanssa. Sikiökauden aikaisessa maksassa CYP3A7 on tärkein aflatoksiinia metaboloiva entsyymi (Partanen ym., 2010). Aflatoksiini B1 aktivoituu ihmiselimistössä sytokromi P450 –entsyymien (eli CYP-entsyymien) vaikutuksesta reaktiiviseksi AFB1-8,9-epoksidiksi. Samalla syntyy myös muita metaboliitteja, kuten AFM1 ja AFQ1. Reaktiivinen AFB1-8,9-epoksidi, joka on vastuussa aflatoksiini B1:n kyvystä aiheuttaa syöpää, pystyy sitoutumaan sekä DNA:han että proteiineihin. Reaktiivinen AFB1-8,9-epoksidi hapettuu ja sitoutuu DNA:n emäk-

sen, guaniinin, typpi-atomiin. Seurauksena voi olla emäsparin vaihtuminen (GC -> TA) DNA:ssa. Erityisesti kasvunrajoitegeenissä p53 tapahtuvaa pistemutaatiota pidetään karsinogeneesin kannalta tärkeänä (Bennet & Klich 2003; Elonen 2001). Aflatoksiini B1 voi metaboloitua myös karsinogeeniseksi aflatoksikoliksi (AFL) NADPH-riippuvaisen reduktaasin toimesta. AFL:n rooli on merkittävä, sillä se toimii aflatoksiinin varastomuotona. Aflatoksikoli voi muuttua takaisin aflatoksiiniksi, joka metaboloituu edelleen (Partanen ym. 2010).

Reaktiivinen glutationi-S-transferaasi-entsyymi ja mikrosomit solulimassa katalysoivat aktiivisen aflatoksiinin ja glutationin välisen konjugaation. Tämän jälkeen aflatoksiini eritetään ulos elimistöstä. Entsyymien eri määrän eri eläinlajeissa uskotaan johtavan eroihin aflatoksiinin haittavaikutusten asteissa (Bennet & Klich 2003).

Aflatoksiini B1:tä, sen metaboliitteja sekä AFB1-albumiini-addukteja on löydetty sekä altistuneiden äitien että niiden lasten napaverestä, joiden äidit ovat altistuneet aflatoksiinille. Näin tiedetään, että aflatoksiini kulkeutuu istukan läpi äidistä sikiöön ja myös, että istukka metaboloii aflatoksiini B1:tä (Partanen ym. 2010). Istukan rooli aflatoksiinin metaboloinnissa ja kuljetuksessa ei kuitenkaan ole selvä.

II KOKEELLINEN OSA

5 TYÖN TARKOITUS

Työn tarkoituksena oli tutkia aflatoksiinin kulkeutumista ja metaboliaa ihmisistukassa istukkaperfuusiomenetelmällä.

6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

6.1 Käytetyt kemikaalit

Käytetyt kemikaalit ja niiden valmistajat olivat seuraavat:

<u>Kemikaalit</u>	<u>Valmistaja, Valmistusmaa</u>
Aflatoksiini B ₁	Sigma, Saksa
Albumiini SPR	Sanquin, Hollanti
Antipyriini	Sigma, Saksa
Asetonitrili	J. T. Baker, Hollanti
CaCl ₂	Merck, Saksa
Dextraani	Sigma, Saksa
Dimetyylisulfaoksidi	Hybri-Max, Sigma, Saksa
Formaliini	Oy FF - Chemicals Ab, Suomi
Helium	Oy Woikoski Ab, Suomi
Heparin Leo	Leo Pharma, Tanska
Karbogeeni	Oy AGA Ab, Suomi
KCl	Merck, Saksa
K ₂ HPO ₄	J. T. Baker, Hollanti
L-Glutamiini	Gibco, Invitrogen, USA
Metanoli	J. T. Baker, Hollanti
MgSO ₄	Riedel de Haën, Saksa
Milli-Q-vesi	Milliopore, Ranska
NaCl	J. T. Baker, Hollanti
NaHCO ₃	Riedel de Haën, Saksa

Natriumpyruvaatti	Lonza, BioWhittaker, Belgia
NEAA	Cambrex, BioWhittaker, Belgia
Penisilliini-Streptomysiini	Cambrex, BioWhittaker, Belgia
Typpi-seoskaasu	Oy Woikoski Ab, Suomi

6.2 Laitteet

Käytetyt laitteet ja niiden valmistajat olivat seuraavat:

<u>Laite</u>	<u>Malli, Valmistaja, Valmistusmaa</u>
Esikoloni	Brownlee Columns, Perkin Elmer, USA
HPLC-korkit	Chromacol Ltd, USA
HPLC-laite	Shimadzu, USA
HPLC-pullot	Brown Chromatography Supplies, Saksa
Kanyylit	Vygon, Ranska
Koloni	Brownlee Columns, Perkin Elmer, USA
Magneettisekoittaja	Mini-M, Janke & Kunkel KG, Saksa
Paineenmittauslaite	World Precision Instruments, USA
Nova Stat Profile pHox Analyzer,	Nova Biomedical, USA
Pipetit	BioHit, Suomi
Pumput	Watson Marlow, Iso-Britannia
Sentrifuugi	Biofuge 17 RS, Heraeus, Saksa
Suodatin, esiperfuusioneste	Pall Corporation, USA
Suodattimet, HPLC	Ministart RC 4, Sartorius, Saksa
Verensokerimittari	MediSense, Iso-Britannia
Verensokeriliuskat	Abbott Diabetes Care Ltd, Iso-Britannia
Yläkuppivaaka	malli 1474, Sartorius, Saksa

6.3 Liuokset

Esiperfuusionesteen eli Krebs-Ringerin fosfaattipuskuriliuoksen valmistamiseen käytettiin suolaliuoksia (Taulukko 1). Suolaliuokset valmistettiin punnitsemalla kiinteät aineet, jotka liuotettiin pieneen määrään MQ-vettä. Liuokset sekoitettiin magneettisekoittajalla, täydennettiin mittapulloihin haluttuun tilavuuteen ja suodatettiin 0,2 µm:n ruiskusuodattimilla säilytyspulloihin. Esiperfuusioneste valmistettiin liuottamalla 1,68 g NaHCO₃:a 600 ml:aan vettä. Liuosta kuplitettiin karbogeeniä 15 minuutin ajan. Tämän jälkeen lisättiin erikseen valmistettuja suolaliuoksia taulukon 1 mukainen määrä. Tilavuus täydennettiin 800 ml:aan tislattulla vedellä. Valmiista esiperfuusionesteestä 80 ml otettiin mukaan synnytyslaitokselle ja loput laitettiin tippapulloon odottamaan istukan kanylointia.

Taulukko 1: Esiperfuusionesteen liuokset ja lopullinen koostumus

Määrä	Aine	Esiperfuusionesteeseen käytettyjen suolaliuosten konsentraatio	Lopullinen konsentraatio esiperfuusionesteessä
40 ml	NaCl	138,4 mg/ ml	6,92 mg/ ml
8 ml	KCl	35 mg/ ml	0,35 mg/ml
8 ml	KH ₂ PO ₄	16 mg/ ml	0,16 mg/ml
8 ml	MgSO ₄	29 mg/ ml	0,29 mg/ml
8 ml	CaCl ₂	37 mg/ ml	0,37 mg/ml
4 ml	hepariini	5000 IU/ ml	25 IU/ ml
ad 800 ml	vesi	-	-

Varsinainen perfuusioneste valmistettiin yhdistämällä taulukon 2 mukaisesti RPMI 1640-mediumia (soluviljelyliuos pohja), l-glutamiinia, penisilliini-streptomysiiniä, natriumpyruvaattia, non-ekstentielejä aminohappoja ja dekstraania. Liuosta kuplitettiin 15 minuuttia karbogeeniä, minkä jälkeen lisättiin hepariini ja albumiini. Perfuusioneste sekoitettiin hyvin ja jaettiin 250 ml maternaalipuolen nestekiertoön ja 120 ml sikiöpuolen nestekiertoön.

Taulukko 2: Perfuusionesteen liuokset ja lopullinen koostumus

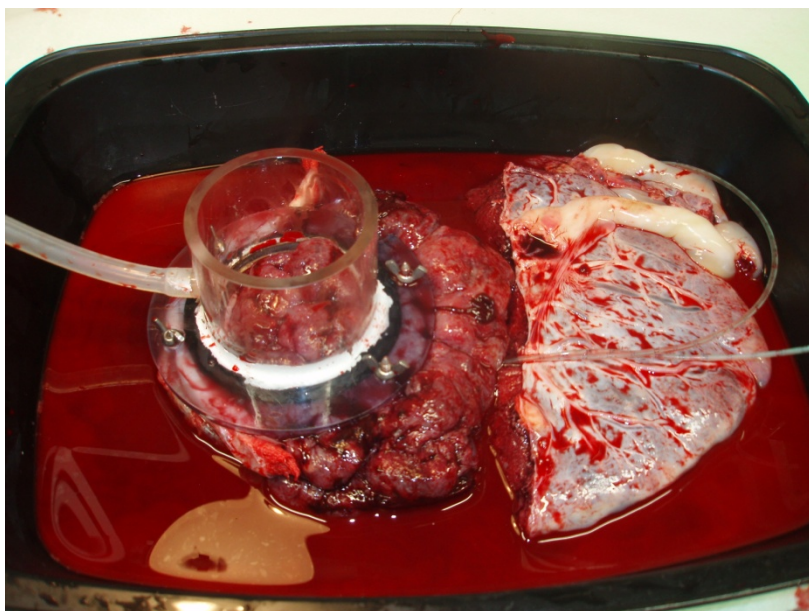
Määrä	Aine	Konsentraatio	Lopullinen konsentraatio
400 ml	RPMI 1640 medi- um	-	-
4 ml	L-glutamaatti	29,2 mg/ ml	0,29 mg/ ml
4 ml	penisilliini- sterptomysiini	10000 IU/ 10000 IU	100 IU/ ml / 100 IU/ ml
4 ml	natrium-pyruvaatti	100 mmol/ l	1 mmol/ l
4 ml	non-essentiaalit aminohapot	-	-
0,8 g	dekstraani	-	2 mg/ ml
2 ml	hepariini	5000 IU/ ml	25 IU/ ml
4 ml	albumiini	200 mg/ ml	2 mg/ ml

6.4 Istukkaperfuusiomenetelmä

Tutkimuksessa tehtiin kahden tunnin perfuusioita aflatoksiinilla. Istukkaperfuusiomenetelmässä äidin ja sikiön puolta perfusoidaan erikseen keinotekoisin verenkierroon avulla. Tutkimuslaitteisto on kuvattu kaavakuvana kuvassa 5. Tutkimukseen käytetyt istukat saatiin Kuopion yliopistollisesta sairaalasta. Istukan käyttöön tutkimuksessa kysyttiin aina kirjallisesti äidin lupa, ja sairaalahenkilökunta informoi äitejä tutkimuksesta. Äidit saivat myös kirjallisen tiedon tutkimuksesta sekä mahdollisuuden kieltäytyä luovuttamasta istukkaa. Istukka hyväksyttiin tutkimukseen, jos äiti ei tupakoinut eikä hänellä ollut lääkitystä vaativaa pitkäaikaissairautta ja raskaus oli kestänyt vähintään 36 viikkoa. Istukassa ei myöskään saanut olla makroskooppisesti havaittavia traumoja. Synnytyslaitoksella napasuoniin injektoidiin esiperfuusionestettä, jotta istukan suonet pysyisivät auki

perfuusion alkuun asti. Esiperfuusionestettä kaadettiin sangon pohjalle ja istukka kuljetettiin kannellisessa sangossa laboratorioon.

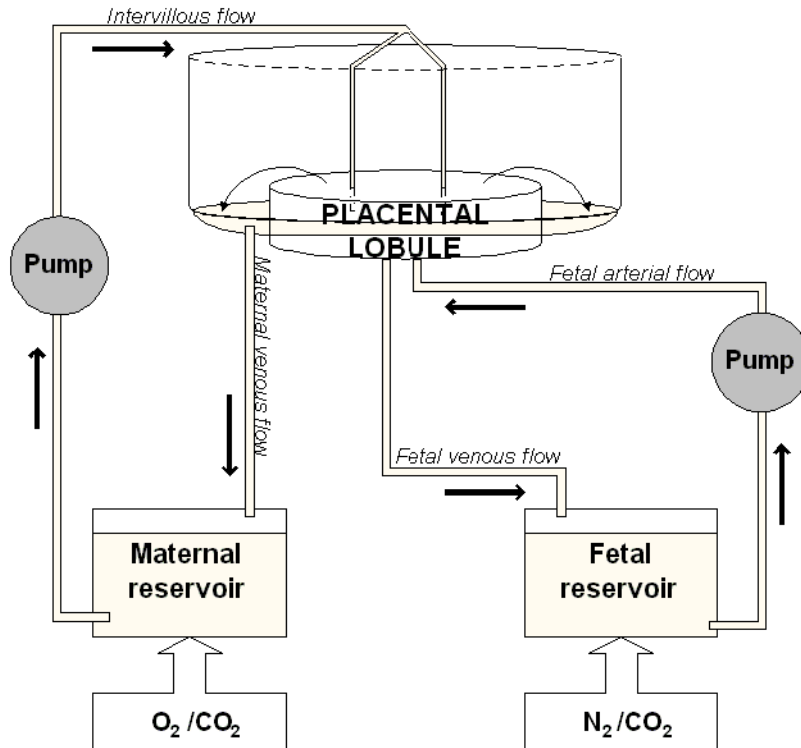
Istukasta etsittiin perifeerinen suonipari, valtimo ja laskimo, jotka menivät samansuuntaisesti samalle alueelle, eli samaan istukkalohkoon. Ensin kanyloitiin valtiomokanyyli, joka oli yhdistettynä esiperfuusionestettä sisältävään tippapulloon. Sitten kanyloitiin valtimon laskimopari. Jos esiperfuusioneste virtasi esteettömästi tippapuollosta valtimon kautta laskimoon niin, että 20 tippaa nestettä tippapuollosta vastasi 1 ml nestettä laskimokanyylistä, voitiin jatkaa istukkaperfuusion valmisteluja. Istukasta leikattiin tarpeeton osa pois. Istukka kiinnitettiin sideharson ja parafilmin sekä istukan omien kalvojen avulla kammioon (kuva 4).



Kuva 4: Istukkalohkon kiinnittäminen kammioon.

Maternaali- ja fetaalipuolen letkut täytettiin perfuusionesteellä ja perfuusiolaitteiston nestelämpökierto ja nestepumppu laitettiin päälle. Sikiön puolen nestekiertoon johdettiin koko perfuusion ajan typpi-seoskaasua, jossa oli 95 % N₂ ja 5 %

CO₂. Äidin puolen nestekiertoa hapetettiin karbogeeniä, jossa oli 95 % O₂ ja 5 % CO₂. Fysiologisia olosuhteita pyrittiin ylläpitämään (37°C ja pH 7,4).



Kuva 5: Istukkaperfuusiolaitteisto kaavakuvana (Myllynen 2003)

Istukkakammio asetettiin paikalleen perfuusiolaitteistoon sikiön puoli alaspäin. Sikiöpuolen nestekierto yhdistettiin valtimokanyyliin (fetal arterial flow). Laskimokanyyli (fetal venous flow) pantiin sikiöpuolen nestereservuaariin (fetal reservoir). Äidin puolen nestekierto (maternal reservoir) yhdistettiin istukkaan (placental lobule) pistämällä metallikanyylit istukan perfusoituneeseen alueeseen, joka näkyi istukkakudoksessa muuta kudosta vaaleampana. Äidin puolen nestekiertoa pidettiin avoimena, kunnes 50 ml nestettä oli vuotanut pois punasolujen poistamiseksi. Tämän jälkeen yhdistettiin kammiosta tuleva äidin puolen poistoletku (maternal venous flow) äidin reservuaariin. Pumpun avulla maternaalipuolen virtausnopeus oli koko perfuusion ajan 9 ml/h ja fetaalipuolen 3 ml/h. Istukalle an-

nettiin puoli tuntia aikaa toipua hypoksiasta eli hapenpuutteesta ennen tutkittavien aineiden lisäystä.

6.5 Tutkittavien aineiden lisääminen

Kun istukka oli tarpeeksi stabiloitunut (eli nesteitä ei vuotanut enempää kuin 3 ml/h sikiön nestekierrosta äidin nestekierto, mikä kertoi, että istukka oli säilynyt ehjänä ja pH oli fysiologisella alueella), voitiin lisätä tutkittavat aineet. Aflatoksiini B1 -liuos valmistettiin liuottamalla 10 mg aflatoksiini B1 -jauhetta 5 ml:aan liuosta, jossa oli 98 % bentseeniä ja 2 % asetonitriiniä. Liuosta otettiin 160 µl ja haihdutettiin kuiviin tyypellä. Sen jälkeen lisättiin 1 ml DMSO:ta ja annettiin liueta. Sekoitettiin vortexilla. Tämä liuos lisättiin perfuusionesteeseen, jossa lopullinen AFB1-konsentraatio oli 5 µM.

Jokaisessa perfuusiossa käytettiin kontrolliaineena antipyriiniä, sillä sen tiedetään siirtyvän passivisella diffuusiolla istukan läpi. Tällöin voitiin tutkia perfuusioiden onnistumista ja tutkittavan aineen läpäisymekanismeja sekä verrata perfuusioita toisiinsa. Antipyriiniä tarvittiin 20 mg/perfuusio. Koska tarvittava määrä oli niin pieni, ensin tehtiin liuos, jonka konsentraatio oli 0,1 g/ml. Tätä liuosta lisättiin 200 µl perfuusionesteeseen, jolloin antipyriinin lopullinen konsentraatio perfuusiossa oli 100 µg/ml. Tutkittavat aineet lisättiin äidin puolen nestekierto.

6.6 Näytteiden ottaminen

Perfuusion aikana otettiin 0,6 ml ja 0,5 ml näytteitä näytteenottoon tarkoitettujen kanyylien avulla molemmista reservuaareista. Nesteitä sekoitettiin lasisauvalla ennen näytteen ottoa. Ensimmäinen näyte (0-näyte) otettiin ennen tutkittavan aineen lisäystä ja seuraava näyte (1-näyte) 5 min tutkittavan aineen lisäämisen jälkeen. Tämän jälkeen näytteitä otettiin, kun aikaa oli kulunut 30 min, 1 h, 1,5 h ja 2 h tutkittavan aineen lisäyksestä. 0,5 ml:n näytteitä säilytettiin perfuusion ajan jäähauteessa eppendorf-putkissa. Perfuusion jälkeen näytteet sentrifugoitiin (12

000 rpm, 15 min, 20C) punasolujen poistamiseksi. Näytteistä otettiin talteen supernatantti, jota säilytettiin $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa antipyriinin määritykseen saakka. 0,6 ml -näytteet suodatettiin 0,45 μm ruiskusuodattimilla HPLC-putkiin ja vietiin heti HPLC-laitteeseen analysoitaviksi. Lisäksi otettiin 0,3 ml:n astrup-näytteitä. Jos pH oli kohonnut liikaa, lisättiin suolahappoa. Lopuksi mitattiin perfuusionesteestä loppuglukoosipitoisuus ja laskettiin molempien nestekiertojen loppuvolyymit. Glukoosin väheneminen osoitti, että istukkalohko käytti glukoosia ja siis toimi normaalisti.

6.7 Näytteiden analysointi

Näytteiden analysointiin käytettiin HPLC-laitteistoa (high-performance liquid chromatography) eli korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa. HPLC-laitteistossa pumppu siirtää ajoliuokseen liuotetun näytteen kulkemaan kolonnin läpi käyttäen korkeaa painetta. Kolonni on pakattu tiiviisti hienojakoisella täyteaineella. Näytteen eri yhdisteiden erottuminen perustuu niiden erilaisiin vuorovaikutuksiin sekä ajoliuoksen että täyteaineen kanssa. Kolonnissa erottuneet yhdisteet havaitaan detektorilla (Harris 2010).

Aflatoksiininäytteet analysoitiin aina välittömästi näytteen oton jälkeen HPLC-laitteella käyttäen fluoresenssidetektoria, jonka aallonpituus oli 363 nm. Ajoliuokseksi käytettiin vettä, asetonitriiniä ja metanolia suhteessa 60:30:10. Virtausnopeus oli 1 ml/min. Näytteitä injektoidiin 10 μl . Aflatoksiininäytteiden pitoisuudet määritettiin standardisuoran avulla. Standardisuoran aflatoksiininäytteiden pitoisuus tiedettiin, ja näytteet ajettiin HPLC-laitteen läpi. Kun näiden tunnettujen näytteiden kulkeutumisenopeus HPLC-laitteessa saatiin selville, pystyttiin standardisuoran avulla tunnistamaan aflatoksikolit ja laskemaan myös istukkaperfuusiosta saatujen aflatoksiininäytteiden pitoisuus. HPLC-laitteistolla oli lisäksi mahdollista selvittää mahdollisten aflatoksiinin metaboliittien muodostuminen.

Antipyriini-näytteitä ei tarvinnut analysoida heti, vaan näytteet pakastettiin -20°C :seen. Näytteet analysoitiin HPLC-laitteella, jossa on UV-detektori. Ajoliuoksesta käytettiin 20 mM:sta KH_2PO_4 -liuosta ja ACN:ää suhteessa 70:30. Ajoliuos valmistettiin liuottamalla 2,17 g KH_2PO_4 700 ml:aan vettä. Liuos suodatettiin ja siihen lisättiin 300 ml ACN:ää. Ennen ajoa liuosta kuplitettiin heliumilla 15 minuuttia. Pakastetut perfuusionestenäytteet sulatettiin ja vorteksoitiin. Tämän jälkeen jokaista näytettä otettiin 100 μl ja pipetoitiin eppendorf-putkiin. Näytteisiin lisättiin 100 μl metanolia, ja sitä vortexoitiin ja fuugattiin (12 000 rpm 15 min). Supernatantti (150 μl) siirrettiin uusiin putkiin ja lisättiin 150 μl asetonitriiliä. Nämä näytteet vortexoitiin ja fuugattiin myös (12 000 rpm 15 min). 100 μl liuosta siirrettiin HPLC-putkiin ja näytteet analysoitiin HPLC:llä. Myös antipyriinille määritettiin standardisuora, jonka perusteella laskettiin näytteiden antipyriinikonsentraatiot.

7 TULOKSET

Osallistuin vuoden 2007 kesä- ja elokuun aikana kymmeneen istukkaperfuusioon tutkija Heidi Partasen ohjauksessa Kuopion yliopiston (nyk. Itä-Suomen yliopisto) toksikologian laitoksella. Näistä kymmenestä tutkimukseen saadusta istukasta neljä istukkaa perfusoiitiin loppuun asti (2 h). Kuitenkin vain yksi istukkaperfuusio (AFB9) täytti kriteerit ja voitiin laskea onnistuneeksi. Perfuusiot on nimetty suoritusjärjestyksessä AFB 3–9.

Neljä perfuusiota (AFB 3-5, AFB9) tehtiin loppuun asti, niiden tiedot kerättiin ja niistä piirrettiin kuvaajat. Kuvaajia on kolme erilaista jokaiselle vastaavalle istukkaperfuusiolle: 1. kuvaaja aflatoksiinin pitoisuuden muutoksesta, 2. kuvaaja antipyriinin pitoisuuden muutoksesta ja 3. kuvaaja aflatoksiinin metaboliitin, aflatoksinin, muodostumisesta eli pitoisuudesta.

Kaikissa kokeissa emme pystyneet laittamaan istukkaa edes laitteistoon asti. Istukoiden kunto ja se, kuinka nopeasti ne saatiin käsiteltyä, vaikuttivat perfuusion onnistumiseen. Vaikka istukoiden hyväksymiselle oli omat kriteerinsä (äiti ei

tupakoinut, ei käyttänyt pysyvää lääkitystä, raskaus oli kestänyt vähintään 36 viikkoa eikä istukassa ollut makroskooppisesti havaittavia traumoja), eivät kriteeritkään täyttävät istukat olleet aina perfuusionkestäviä. Sektiolla tai alateitse syntyneiden istukoiden perfuusiokestävyydessä ei huomattu eroja.

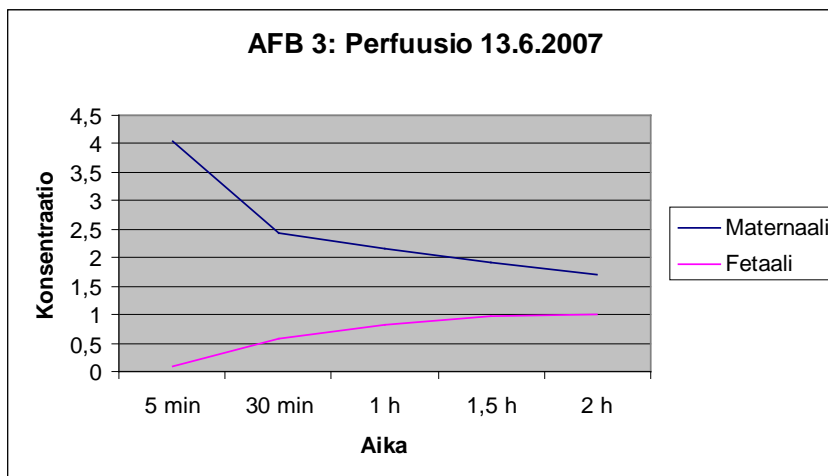
Perfuusion onnistumisen kriteereinä oli, että vuoto sikiön puolelta äidin kierto on oli < 4 ml/ h, antipyriini kulkeutui normaalisti ja perfusoitava istukkalohko kulutti glukoosia. Useimmissa perfuusioissa ongelmana oli juuri se, että vuoto oli liian suurta matemaalipuolelta fetaalipuolelle. Taulukoon 3 on koottu tiedot kaikista istukkaperfuusioista.

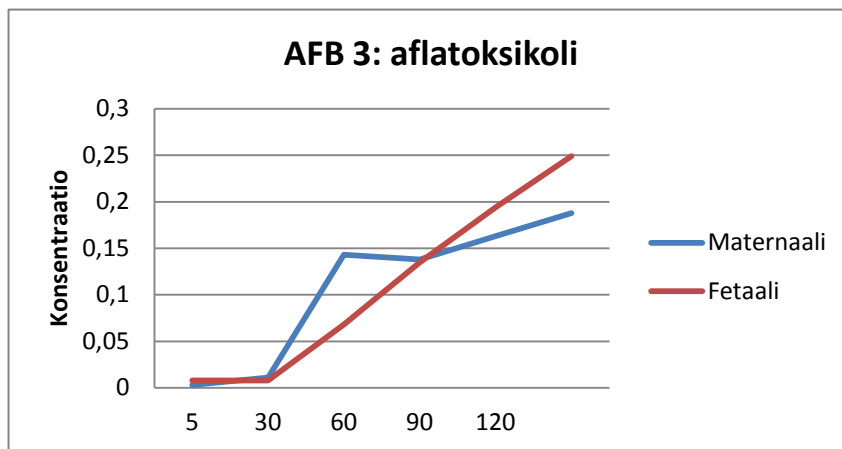
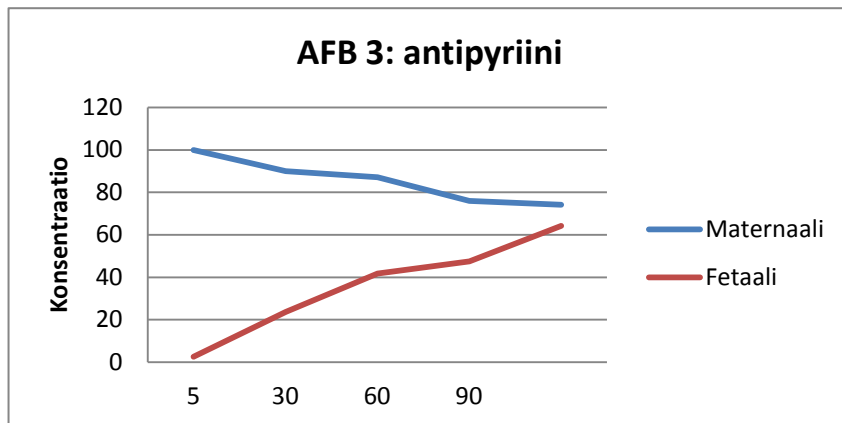
Taulukko 3: Istukkaperfuusiokoonti

Pvm	Nimi	Synn. tapa	Rv (vko)	Istukan paino (g)	Vuoto 1h (ml)	Vuoto 2h (ml)	Vuoto/h (ml)	Perf. Alue (g)	Kommentit
8.6.07	AFB2	sektio	39+3	980		1,4	1,55	16,51	Neste valui pöydälle
13.6.07	AFB3	alatie			8,3	16,8	8,15	14,14	Vuoti liikaa, istukassa infarkti. Perfuusio loppuun asti.
10.7.07	AFB4	alatie	41+5	780	5,3	10,8		17,66	Vuoti liikaa. Perfuusio loppuun asti.
17.7.07		alatie	41+2	850					Ei saatu nestettä suoniin
18.7.07	AFB5	sektio	40+2	500	6,3	11,5	6,35	13,51	Kokonaisvuoto liian suuri. Perfuusio loppuun asti.
30.7.07	AFB6	alatie	39+2	440					Letku vuoti
31.7.07	AFB7	sektio	39+4	580					Vuoti liikaa heti
7.8.07	AFB8	sektio	39+1	860					Vuoti liikaa heti
9.8.07		alatie	39+6	500					Ei saatu nestettä suoniin
9.8.07	AFB9	alatie	40+6	670	3,0	2,5	2,75	18,95	Onnistunut. Perfuusio loppuun asti.

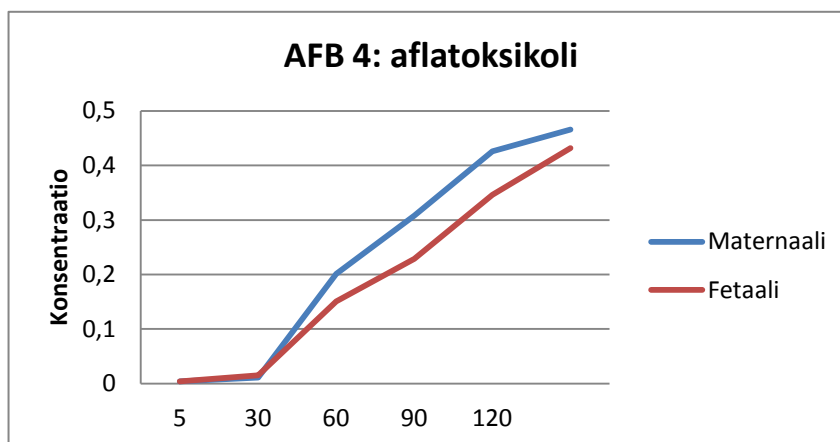
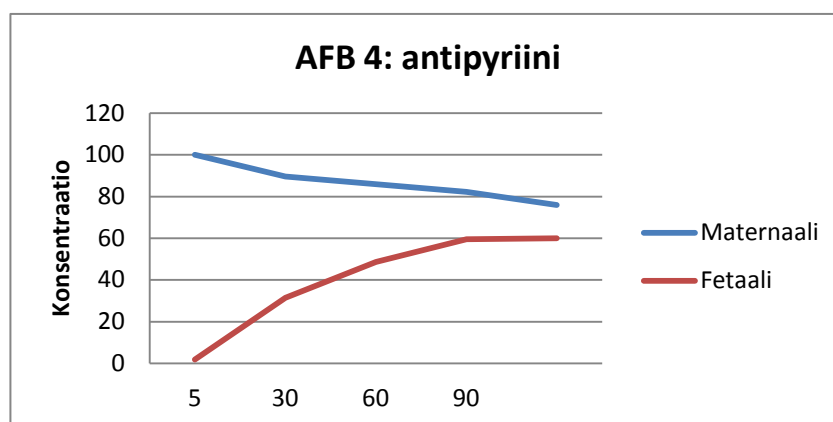
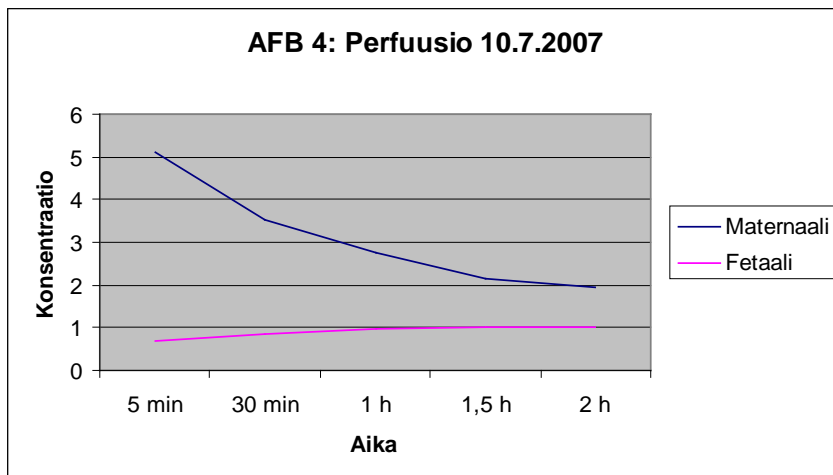
Seuraavaksi esitetään istukkaoperfuusioiden AF3, AF4, AF5 ja AF9 kuvaajat ja kuvaajien tulkinnot.

Perfuusiossa AF3 epäonnistumisen syyn pääteltiin olevan istukassa. Liian huonokuntoinen istukka ei enää toiminut perfuusiolaitteistossa, vaan vuoto kudoksen läpi oli liian suurta jo heti ensimmäisen tunnin jälkeen. Kuvaajassa (AFB 3: Perfuusio 13.6.2007) näkyy heti alussa jyrkästi alaspäin suuntautuva suora materaalipuolen ainemäärien nopeana hupenemisena, mutta aflatoksiinin määrä ei lisäännny fetaalipuolella. Istukassa oli halkaisijaltaan 4 cm:n levyinen kova valkoinen alue eli infarkti. Kuvaaja on kuitenkin oikeanmuotoinen, sillä vaikka istukka oli liian huonokuntoinen kestääkseen aflatoksiinia, on vuoto kudoksen läpi kuitenkin yhtenevää: ensimmäisen tunnin kohdalla 8 ml ja seuraavan 16 ml. Antipyriini- ja aflatoksikolikuvaajat (AFB b: antipyriini ja AFB 3: aflatoksikoli) ovat vastaavanlaisia muiden istukkaperfuusioiden kanssa.



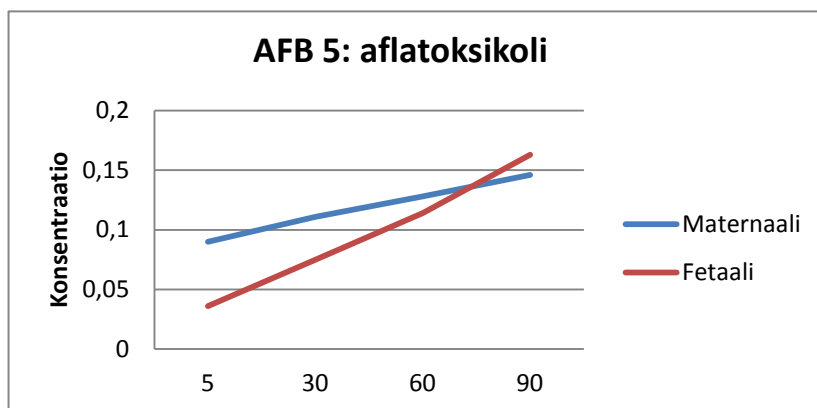
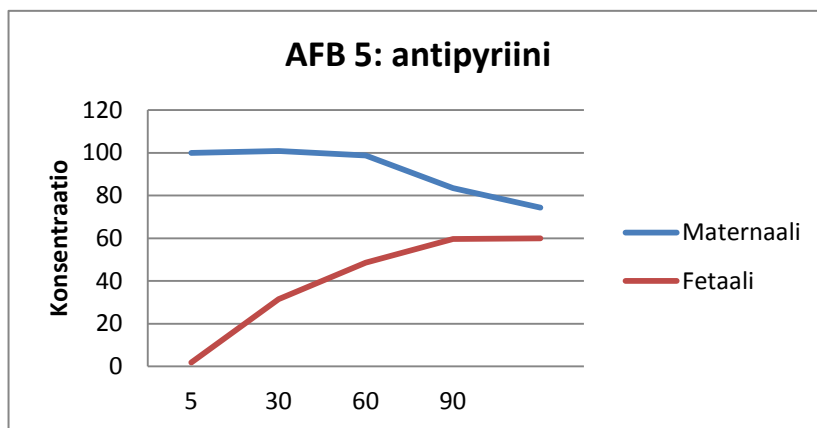
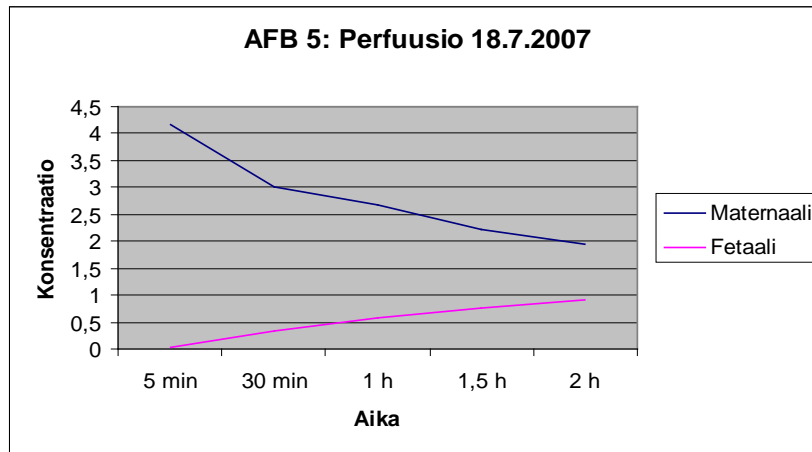


Myös neljännessä perfuusiossa AFB4 vuoto istukan läpi oli kokonaisuudessaan liian suurta, jotta perfuusiota voitaisiin pitää onnistuneena. Antipyriini siirtyi normaalisti kuvaajan mukaisesti (AFB 4: antipyriini). Aflatoksiini B1:n määrä väheni maternaali puolella, mutta fetaalipuolen aflatoksiini B1 konsentraatio nousi tuskin ollenkaan, kuten nähdään kuvaajassa (AFB4: Perfuusio 10.7.2007). Syynä tähän oli todennäköisesti aflatoksikolin muodostuminen. Aflatoksikolin määrä lisääntyi molemmissa kierroissa ajan kuluessa kuvaajan mukaan (AFB 4: aflatoksikoli).



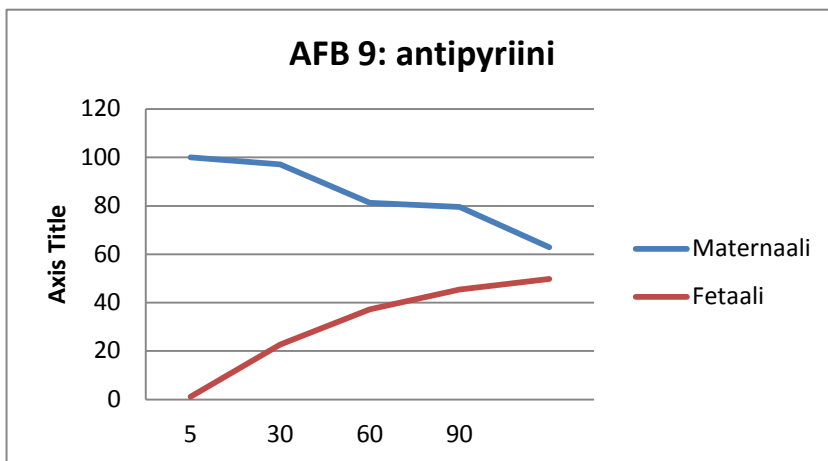
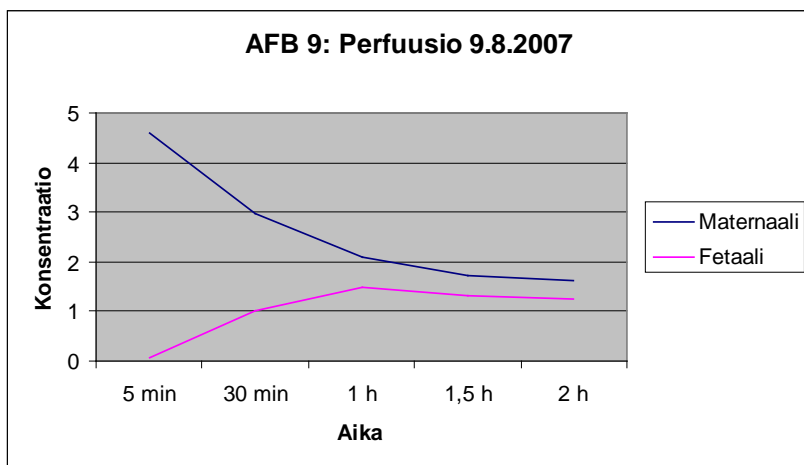
Perfuusiossa AFB5 kokonaisvuoto maternaalipuolelta fetaalipuolelle oli taas liian suurta heti ensimmäisestä mittauksesta lähtien. Aloimme jo pohtia, olisiko aflatoksiini niin voimakas myrky, ettei istukka yksinkertaisesti kestä sitä. Vaikka istukkaperfuusiota ei voitukaan laskea onnistuneiden joukkoon, olivat kaikki kolme

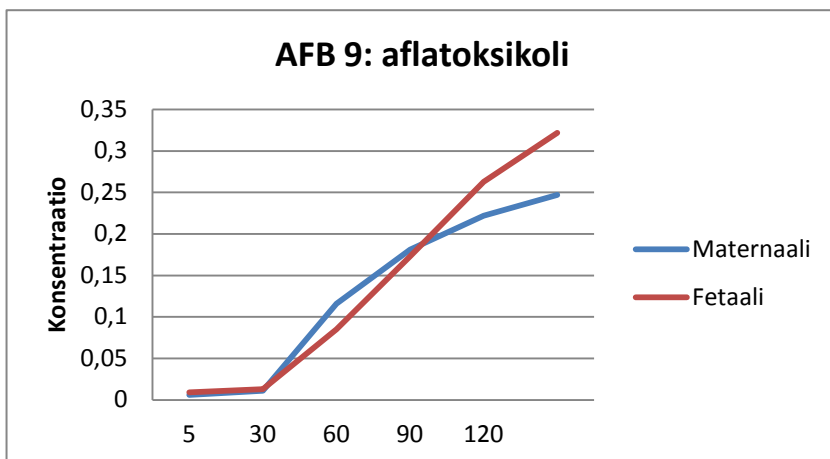
kuvaajaa (AFB 5: Perfuusio 18.7.2007, AFB 5: antipyriini ja AFB 5: aflatoksikoli) taas samansuuntaisia muiden perfuusioiden kanssa.



Onnistuneesta perfuusiosta AFB9 kuvaajassa (AFB 9: Perfuusio 9.8.2007) nähdään selkeimmin aineiden pitoisuuksien muutos maternaali- ja fetaalipuolella eli miten maternaalipuolelta siirtyy aflatoksiini B1:tä fetaalipuolelle. Kuvaajasta näh-

dään myös, ettei aflatoksiini B1 siirry kokonaisuudessaan fetaalipuolelle, vaan aflatoksiinisuurat jäävät lopulta kulkemaan rinnakkain. Vaikka osaksi aflatoksiinia sitoutuu istukkaan tai häviää tutkimusletkuihin, johtuu fetaalikierron pienempi aflatoksiinimäärä myös siitä, että istukka metaboloii aflatoksiinia aflatoksikoliksi. Perfuusion lopussa aflatoksikolin määrä oli korkeampi fetaalikierrossa kuvaajan (AFB 9: aflatoksikoli) mukaisesti.





Yhteenvedona kaikista istukkaperfuusioista todettiin, että antipyriini siirtyy istukan läpi lähinnä passiivisella diffuusiolla, toisin kuin aflatoksiini B1. Molemmat siirtyivät nopeasti: 5 minuutin kuluttua voitiin useimmissa tapauksissa havaita aflatoksiineja ja antipyriiniä fetaalikierrossa. Kuvaaajan mukaan aflatoksiinin siirtyminen fetaalipuolelle olisi saavuttanut huippunsa tunnin perfuusion jälkeen. Tämän jälkeen aflatoksiini B1:n konsentraatiot eivät juuri nousseet fetaalikierrossa. Antipyriinin kuluttua siirtymistä fetaalikiertoon tapahtui vielä 1,5 tunnin kuluttua perfuusion alusta. Aflatoksikolin muodostuminen on runsaampaa fetaalikierrossa kuin maternaalikierrossa. Aflatoksikolin määrä fetaalikierrossa ylittää maternaalikierron määrän kolmessa neljästä perfuusiosta n. 80–90 minuutin kohdalla.

8 POHDINTA

Istukkaperfuusioiden tekemiseen liittyi monenlaista vaikeutta. Istukat saatiin Kuopion yliopistollisesta sairaalasta. Istukkaan piti injektoida esiperfuusionestettä, jotta suonet pysyisivät auki puolen tunnin sisällä istukan syntymästä. Synnytukset ja tutkijoiden työajat eivät usein sattuneet samaan aikaan. Lisäksi istukan tutkimuskäytössä oli edellä mainittuja rajoitteita; äiti ei saanut tupakoida, hänellä ei saanut olla lääkitystä vaativaa pitkäaikaissairautta ja raskauden täytyi olla kestänyt vähintään 36 viikkoa. Istukassa ei myöskään saanut olla makroskooppisesti havaittavia trauma. Äidin täytyi antaa lupa istukan käyttöön tutkimustarkoituk-

siin. Jos lapsen syntymäpaino oli pienempi kuin raskausajan puolesta odotettiin, meni istukka sairaalan puolesta jatkotutkimuksiin. Tämän vuoksi tutkittavia istukoita oli vaikea saada riittävästi.

Istukoista oli vaikea sanoa päällepäin, mikä niistä kestäisi istukkaperfuusion. Kahdessa tapauksessa istukkaa ei saatu edes kanyloitua, joten ne selvästi eivät olleet kestäneet syntymästä johtuvaa traumaa. On myös todettu, että eri yksilöiden istukoiden välillä on eroja siinä, miten hyvin ne metaboloivat vierasaineita (Partanen ym. 2010). Lääkemetabolialla välittää elimistössä suuri joukko entsyymejä. Entsyymien toimintaa säätelevät monet ympäristöön mutta myös yksilöön liittyvät tekijät. Yksilöiden väliset erot lääkeaineiden aineenvaihdunnassa ovat hyvin suuria, jopa kymmenen- tai satakertaisia yksilön fysiologisesta tilanteesta ja perimästä riippuen (Pelkonen & Turpeinen 2008). Ei ole siis yllättävää, että myös istukan metaboliassa on yksilöistä johtuvia eroja.

Useimmissa tapauksissa vuoto oli liian suurta maternaalipuolelta fetaalipuolelle heti alusta alkaen. Tämä aiheutti jopa epäilyksen, että aflatoksiini olisi liian toksinen aine istukkaperfuusiomenetelmällä tutkittavaksi. Pohdittiin mahdollisesti aflatoksiini B1:n pitoisuuden laimentamista. Partanen ja kumppaneiden (Partanen 2010) eri aflatoksiinipitoisuuksilla tekemät tutkimukset (5 μM ja 0,5 μM) osoittivat, ettei konsentraatioiden välillä ollut eroa kulkeutumisen tai metabolian osalta.

Inhimillisiä ja laitteistosta johtuvia virheitä sattuu aina. Perfuusiolaitteisto koottiin käsin ja pestyt, nihkeät kumiletkut oli hankala kierittää tiiviisti lasisiin kappaleisiin. Kaikki raot pyrittiin tukkimaan, mutta kerran letku vuoti ja perfuusio jouduttiin keskeyttämään. Koska nestettä kerättiin letkulla keitinlasiin, saattoi letkun suu helposti lipsahtaa pois lasista, jolloin tuntematon määrä nestettä valui pois lasista, eivätkä tutkimustulokset olleet enää tarpeeksi tarkkoja.

Tässä tutkimuksessa esiintyneistä haasteista huolimatta istukkaperfuusio on erittäin hyvä tapa tutkia aineen tetrageneettisyyttä juuri ihmisille, sillä mikään ihmi-

sen elin ei ole niin lajille spesifinen kuin istukka. Eläinkokeiden määrää on pyritty vähentämään viime vuosina eikä eettisistä syistä toksikologisia tutkimuksia voida tehdä *in vivo* raskaana olevilla äideille. Suomessa istukan käyttöön ei ole liittynyt eettisiä ongelmia, joten istukkaperfuusioita on pystytty tekemään hyväksyttävästi (Halkoaho ym. 2010). Istukkaperfuusion haittana on, että perfuusiota voidaan tutkia vain raskauden loppuvaiheen istukoilla (Myllynen ym. 2010). Lisäksi istukkakudos kokee trauman sekä irrotessaan kohdusta että olleessaan ilman happea hetken ajan. On vaikea tietää, miten paljon nämä seikat vaikuttavat istukan toimintaan.

Vaikka istukkatutkimuksia on tehty neljäkymmentä vuotta, ei metodia ole koskaan virallisesti arvioitu. Kaksi erillistä tutkimusryhmää kolmessa eri laboratoriossa (Kööpenhamina, Kuopio ja Oulu) arvioi istukkaperfuusiota metodina vuonna 2010 (Myllynen ym. 2010). Tutkimuksessa todettiin, että eri laboratorioden tulokset olivat yhteneviä. Lisäksi todettiin, että antipyriini on hyvä mittari perfuusion onnistumiselle ja maternaalikanyylin paikka saattaa vaikuttaa antipyriinin siirtymiseen ja olla osana laboratorioden välisissä eroissa.

Tutkiessamme aflatoksiini B1:n kulkeutumista ja metaboliaa totesimme, että aflatoksiini kulkeutuu istukan läpi hyvin. Lisäksi totesimme istukan metaboloivan aflatoksiini B1:stä aflatoksikoliksi. Kun verrataan aflatoksiinin istukkaperfuusiota Woon ja kumppaneiden (Woo ym. 2011) tekemään istukkaperfuusioon toisella mytotoksiinilla, okratoksiinilla, voidaan todeta, että okratoksiini oli tuskin havaittavissa fetaalikierrossa ryhmän tekemissä perfuusioissa. Tutkimuksen perusteella mytotoksiinit eroavat toisistaan kyvyissään siirtyä istukan läpi.

Syventävien opintojeni tarkoituksena oli tehdä tutkimustyötä ja tutustua sen eri vaiheisiin. Koska niin monet istukkaperfuusiot epäonnistuivat, sain osallistua useampiin perfuusioihin ja nähdä tutkimustyön onnistumisen hetket kuin myös epäonnistumiset, jotka kuuluvat tutkimustyöhön.

LÄHTEET

- Abdulrazzaq Y, Osman N, Ibrahim. Fetal exposure to aflatoxins in the United Arab Emirates. *Ann Trop Paediatr* 2002;22:3. 2002
- Ala-Kokko TI, Myllynen P, Vähäkangas K. Ex vivo perfusion of the human placental cotyledon: implications for anesthetic pharmacology. *International Journal of Obstetric Anesthesia* (2000) 9, 26-38. 2000
- Bennet J. W., Klich M: Mycotoxins, *Clinical Microbiology Reviews*, July 2003, vol. 16 no. 3 497-516.
- Elonen E: Sienimyrkytykset. Kirjassa: Farmakologia ja toksikologia, toim. Koulu M, Tuomisto J. *Medicina Kuopio* 2001
- Eskola K, Hytönen E, Komulainen S: Äitiyshuolto ja naistentautien sairaanhoito, s. 30–36. WSOY, Porvoo 1990
- Halkoaho A, Pietilä AM, Dumez B, Van Damme K, Heinonen S, Vähäkangas K. Ethical aspects of human placental perfusion: interview of the mothers donating placenta. *Placenta*, 2010 Aug;31(8):686-90. Epub 2010 Jun9
- Halkoaho A, Pietilä AM, Vähäkangas K. Ethical aspects in placental perfusion studies: views of the researchers. *Placenta*. 2011 Jul;32(7):511-5
- Harris D: Quantitative chemical analysis, 2010. 8th edition
- Heiskanen N, Malm H, Sankilampi U, ym.: Mikrobilääkkeiden käyttö raskauden ja imetyksen aikana. *Lääkärilehti* 2006; 61 (51-52): 5323-5328
- Huupponen R, Raunio H: Farmakokinetiikka. Kirjassa Farmakologia ja Toksikologia. s. 67-78 2001
- Härkönen P, Väänänen K. Alkion varhaisvaiheet ja naisen sukupuolielinten kehitys. Kirjassa: Ylikorkala O, Kauppila A, toim. Naistentaudit ja synnytykset. *Kustannus Oy Duodecim* 2004
- Kivistö K, Neuvonen P.J. Farmakokinetiikka. Kirjassa: Koulu M, Tuomisto J, toim. Farmakologia ja toksikologia. *Kuopio: Medicina Kuopio* 2001
- Markusseen Linnet K, Wisborg K, Obel K. Smoking during pregnancy and the risk for hyperkinetic disorder in offspring. *PEDIATRICS* Vol. 116 No. 2 August 2005, pp. 462-467

- Myllynen P. In Search of Models for Hepatic and Placental Pharmacokinetics. Väitöskirja. Lääketieteellinen tiedekunta, Farmakologian ja toksikologian laitos, Oulun yliopisto 5/2003
- Myllynen P, Pasanen P, Pelkonen O. Human Placenta: a Human Organ for Developmental Toxicology Research and Biomonitoring, Placenta 26, 361-371 (2005)
- Myllynen P, Pasanen P, Vähäkangas K. The fate and effects of xenobiotics in human placenta. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2007
- Myllynen P, Pienimäki P, Vähäkangas K. Transplacental passage of lamotrigine in a human placental perfusion system in vitro and in maternal and cord blood in vivo. European Journal of Clinical Pharmacol 58: 677-682, 2003
- Partanen H, El-Nezami H, Leppänen J, Myllynen P, Woodhouse H, Vähäkangas K. Aflatoxin B1 Transfer and Metabolism in Human Placenta. Toxicological Sciences 113(1), 216-225 (2010)
- Pasanen M. Istukka ja vieraat aineet. Lääkärilehti 48(26): 2444, 1993
- Pelkonen O & Turpeinen M. Lääkeaineenvaihdunnan perinnölliset erot. Lääketieteellinen Aikakauskirja duodecim 2008;124(11):1275-82
- Peraica M, Radic B, Lucic A, Pavlovic M: Toxic effects of mycotoxins, Bulletin of the World Health Organization, 1999
- Pienimäki P. Karbamatsiinin ja okskarbatsiinin aineenvaihdunta ja läpäisevyys istukassa. Lääkärilehti 52 (26): 2977, 1997
- Sadler T W: Langman's Medical Embryology, s. 117–148. The Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore 2004
- Sandler T W: Langman's Medical Embryology. The Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore 1995
- Sambo L. G: Impacts of Aflatoxins on Health and Nutrition, Report of an Expert Group Meeting in Brazzaville 24-27.5.2005, World Health Organization, Regional Office for Africa, 2006
- Solunetti 2011, Istukan rakenne, kuva 1. Suomen virtuaaliyliopiston Solunetistä haettu 1.9.2011 (http://www.solunetti.fi/fi/kehitysbiologia/istukanja_sikiokalvojen_kehittyminen/)

Solunetti 2011. Istukan kehitys: 9. päivä. Suomen virtuaaliyliopiston Solunetistä haettu 1.9.2011 (http://www.solunetti.fi/fi/kehitysbiologia/vesikalvon_alkiolevyn_ ja_ruskuaispussin_muodostuminen/)

Strosnider H, Azziz-Baumgartner E, Banziger M. ym: Workgroup Report: Public Health Strategies for Reducing Aflatoxin Exposure in Developing Countries. 2006

Turkez H, Geyikoglu F: Boric acid: a potential chemoprotective agent against aflatoxin B1 toxicity in human blood, Cytotechnology. 2010 April; 62(2): 157-165

Vähäkangas K, Savolainen K. Toksikologian perusteet. Kirjassa: Pelkonen O, Ruskoaho H, toim. Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Hämeenlinna: Kustannus Oy Duodecim 2003.

Vähäkangas K, Myllynen P. Experimental methods to study human transplacental exposure to genotoxic agents. Mutation Research 608: 129-135, 2006.

Ylikorkala Y, Kauppila A: Naistentaudit ja synnytykset, s. 20-24. DUODECIM, Helsinki 2001