

**A TERHESSÉG ALATTI DOHÁNYZÁSSAL ÖSSZEFÜGGÉSBE HOZHATÓ ENDOTÉLIÁLIS
DISZFUNKCIÓ MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA KÖLDÖKZSINÓR MODELLRENDSZERBEN**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

ZAHORÁN SZABOLCS

TÉMAVEZETŐ

DR. HERMESZ EDIT

HABILITÁLT EGYETEMI DOCENS

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI TANSZÉK

SZEGED

2020.

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	5
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. A szív- és érrendszeri betegségek (CVD) és a dohányzás kapcsolata.....	6
2.1.1. A dohányfüst összetevői	7
2.1.2. Oxidatív stressz hatásai, markerei és a védekezés lehetőségei	10
2.2 A toxikus kitettség hatása az embrionális fejlődésre.....	14
2.2.1. A keringés szerveződése a méhen belüli élet során	15
2.2.2. A magzati oxidatív stressz általános következményei.....	19
2.2.3. Kemo-biológiai interakciók hatása az embrionális fejlődésre	20
2.2.4. A méhen belüli fejlődési zavarokra visszavezethető kardiovaszkuláris problémák	21
2.3 A NO szintézis szabályozása kardiovaszkuláris rendszerekben.....	23
2.3.1. A NOS enzimcsalád általános jellemzése	23
2.3.2. A NOS3 aktivitását befolyásoló főbb szabályozó mechanizmusok	26
2.3.3. A xantin – oxidoreduktáz (XOR), mint alternatív NO forrás.....	29
2.4 Az endotéliális diszfunkció (ED).....	30
2.4.1. A NO szerepe a kardiovaszkuláris rendszerben	30
2.4.2. Az ED kialakulásának háttere	31
2.4.3. Az ED következményei a sejtek és szövetek szintjén	32
3. Célkitűzések	35
4. Anyagok és módszerek	38
4.1. Mintagyűjtés.....	38
4.2. Fagyasztott köldökszinór metszetek és izolált HUVEC populáció fluoreszcens immunjelölése.....	38
4.3. Konfokális mikroszkópia és a felvételek értékelése	40

4.4. A köldökzsínór erek teljes nitrogén–oxid származék (tNOx) tartalmának meghatározása Griess-reakcióval	41
4.5 A $O_2^{\cdot -}$ <i>in situ</i> detektálása köldökzsínór metszeteken	42
4.6. Transzmissziós elektronmikroszkópia.....	43
4.7. Az endotél sejtek életképességének vizsgálata	43
4.8. <i>Ex vivo</i> reaktivitási teszt köldökzsínór vénákon	44
4.9. RNS kivonás, reverz transzkripció és valós idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR).....	44
4.10. Statisztika és az eredmények ábrázolása.....	45
5. Eredmények	47
5.1. Az anyai dohányzással összefüggésbe hozható ED-hoz vezető útvonalak karakterizálása a köldökzsínór erekben.....	47
5.1.1. NOS3-függő NO szintézis csökkenése oxidatív stressz körülmények között	47
5.1.2. A NO szintézist befolyásoló egyéb enzimek szerepének vizsgálata	53
5.1.3. A XOR lehetséges szerepe a NOS független NO szintézisben és az ED kompenzációjában	55
5.2. Az ED következményeinek / kialakulásának molekuláris háttere.....	57
5.2.1. A $O_2^{\cdot -}$ <i>in situ</i> detektálása endotél sejtekben	57
5.2.2. Membránkárosodáshoz köthető 4 – HNE vizsgálata.....	60
5.2.3. Nitrozatív stresszre és fehérje károsodásra utaló 3 – NT marker vizsgálata	62
5.2.4. Az örökítőanyagot érintő károsodások elemzése	63
5.3. Az endotél sejtek morfológiai változásának és a funkció vesztes összefüggésének vizsgálata	65
5.3.1. Az endotél réteg ultrastrukturális változásai	65
5.3.2. A morfológiai változás molekuláris hátterének vizsgálata	66
5.3.3. Az endotél sejtek viabilitásának elemzése	69
5.4. Izolált köldökzsínór erek reaktivitásának vizsgálata <i>ex vivo</i> rendszerben.....	71

5.4.1. A hő és nehézfém stressz indukált génexpressziós változások követése.....	71
5.4.2. Kontroll és dohányos eredetű köldökzsinór vénák mmp-9 és timp-1 expressziójának vizsgálata ex vivo rendszerben.....	78
6. Eredmények megbeszélése, diszkusszió	82
7. Köszönetnyilvánítás	96
8. Irodalomjegyzék	98
9. Összefoglalás.....	113
10. Summary.....	117

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3-NT	3-nitrotirozin
4-HNE	4-hidroxi-2-nonenal
ADMA	aszimmetrikus dimetil-arginin
Akt	fehérje kináz B
ARG1	argináz-1
BH4/BH2	tetrahidrobiopterin / oxidált BH4
CaM	kalmodulin
CASP	kaspáz
Cav1	kaveolin-1
Cd ²⁺	kadmium anion
Ct	áttörési küszöbérték
CVD	szív- és érrendszeri megbetegedések
DETCA	dietil-ditio-karbamát
DHE	dihidroetídium
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DNS-PKCs	DNS-függő protein kináz nagy katalitikus egysége
ED	endotéliális diszfunkció
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FMN	flavin-mononukleotid
γH2A.X	foszforilált hiszton 2A.X
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
HSP	hő sokk fehérje
HUVEC	humán köldökzsinór véna endotél sejtek

ICC	immuncitokémia
IHC	immunhisztokémia
MFI	átlag fluoreszcencia intenzitás
MMP	mátrix metalloproteináz
MT	metallotionein
NADPH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NO	nitrogén-monoxid
NO ₂ ⁻	nitrit anion
NO ₃ ⁻	nitrát anion
NOS	nitrogén-monoxid szintáz
NOS2	indukálható nitrogén-monoxid szintáz
NOS3	endotéliális nitrogén-monoxid szintáz
NOSIP	nitrogén-monoxid szintáz kölcsönható fehérje
O ₂ ⁻	szuperoxid anion
OH•	hidroxil-gyök
ONOO ⁻	peroxinitrit anion
P-NOS3	a szerin 1177-es pozícióban foszforilált (aktív) endotéliális nitrogén-monoxid szintáz
RNS	reaktív nitrogén fajták
ROS	reaktív oxigén fajták
TIMP	mátrix metalloproteináz szöveti inhibitor
tNOx	teljes nitrogén-oxid származékok
VVT	vörösvértest
vWF	von Willebrand faktor
XOR	xantin-oxidoreduktáz

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A szív- és érrendszeri betegségek (CVD) és a dohányzás kapcsolata

Az utóbbi években megjelent tanulmányok szerint a vezető halálok (évente mintegy 18 millió ember esetében világszerte) valamilyen kardiovaszkuláris problémára vezethető vissza. Ezen belül is leggyakrabban a koszorúér-betegséggel, agyi érkatasztrófával, valamint a magas vérnyomáshoz vagy szívelégtelenséghez köthető keringési zavarokkal találkozhatunk.^{1,2} Ezen megbetegedések közös hátterében a legtöbb esetben olyan rizikófaktorok állnak, melyeket változtatható, életmódbeli tényezőkként írhatunk le. A teljesség igénye nélkül, a leggyakrabban említett kockázatok közé sorolható a helytelen táplálkozásból eredő magas koleszterinszint, az elhízás, cukorbetegség és a dohányzás.³ A dohányzás önmagában is a második számú rizikófaktor jelenti a CVD kialakulásában, de számos más krónikus betegség kialakulásával is összefüggésbe hozható. Ezek közé tartozik a jól ismert krónikus obstruktív tüdőbetegség, valamint a légzőszervrendszer minden részét érintő tumoros elváltozások, melyek a dohányzás közvetlen következményeiként alakulnak ki.⁴ Mindezek mellett nem szabad elfeledkezni a dohányfüst egész szervezetre kiterjedő közvetett hatásairól sem. Továbbá epidemiológiai tanulmányok bizonyítják, hogy az aktív dohányzók körében mintegy 80%-al, a környezetükben élők passzív dohányzása révén pedig mintegy 30%-al nő meg a CVD kialakulásának kockázata.⁵⁻⁷

Annak ellenére, hogy a felnőtt szervezetre gyakorolt káros hatások régóta ismertek, és bizonyítottan negatívan befolyásolja a magzati fejlődést, továbbra is igen magas az aktív dohányosok száma szerte a világon. Az Egészségügyi Világszervezet adatai alapján 2015-ben a 15 éven felüliek körében globálisan 20.2%, Európában közel 30% volt az aktív dohányzás előfordulásának gyakorisága. Magyarország az európai átlagnak megfelelő adatokat mutatja, körülbelül azonos megoszlásban a férfiak és nők körében.¹ Ezen felül az utóbbi évtizedben megjelent statisztikai adatok azt mutatják, hogy a várandós nők mintegy 20 – 30%-a terhesség alatt sem hagy fel ezzel a szokással.⁸

2.1.1. A dohányfüst összetevői



1. ábra A dohányfüst hétköznapi életből is ismert összetevői (forrás: <https://bit.ly/3hF8HM6>)

A mindennapi életben jól ismert tényként kezeljük, hogy a dohányzás során a szervezetbe kerülő mérgeanyagok károsítják a szervezetünket, és hosszabb távon komolyabb egészségügyi problémákhoz vezethet (1. ábra). Ahhoz, hogy pontosan megértsük az ezzel összefüggésbe hozható betegségek kialakulását, érdemes áttekinteni a dohányfüst összetevőit, és azok lehetséges hatásait.

A dohányfüstöt általánosságban két részre oszthatjuk: kátrány és gáz fázis. A kátrány fázis azon szilárd részecskék összessége, amelyek 99.9%-a felfogható egy standard üvegszálás szűrővel, és méretük meghaladja a 100 nm-t. A gáz fázis pedig képes ezen a szűrőn akadály nélkül keresztülhaladni. Az aktív dohányzás során a szervezetbe kerülő komponensek aránya 8% és 92% a gáz fázis javára. A két fázis nagy mennyiségben tartalmaz szabadgyököket, amelyek olyan atomok vagy molekulák, amelyek a külső elektron héjon / pályán egy vagy több párosítatlan elektronnal rendelkeznek. Emiatt a szabadgyökök általában instabilak, rövid életűek, és minden esetben igen reaktívak. Utóbbi

tulajdonságuk miatt más molekuláktól vonnak el elektronokat, amelyek így maguk is szabadgyökké válnak, elindítva ezzel egy láncreakciót. A kátrány fázis grammonként több mint 10^{17} hosszabb életidejű (órák-hónapok) gyökös tulajdonságú molekulát tartalmaz. Ezzel szemben a gáz fázissal pedig rövid életidejű (másodpercek), 10^{15} -es nagyságrendet meghaladó mennyiségben kerülnek ilyen molekulák a légző traktusba.⁹

A kátrány fázis legjelentősebb képviselője a kátrányos mátrixba ágyazott kinon/hidrokinon komplex. Tulajdonságait tekintve ez egy olyan aktív redox rendszer, amely képes a molekuláris oxigént (O_2) szuperoxid anionná ($O_2^{\cdot-}$) redukálni, mely hidrogén-peroxid (H_2O_2) és hidroxilgyök ($OH^{\cdot}$) képződést katalizál. A gáz fázis kisméretű oxigén és szén központú szerves gyökei rövidebb életidejük miatt rendkívül reaktívak. Közülük a legjelentősebbek közé sorolható a nitrogén – monoxid (NO), reaktív olefinek és diének.⁹ A gáz fázis gyökös molekulái nem feltétlen a magas hőmérséklet ionizáló hatására keletkeznek, hanem a NO egyensúlyi oxidációjából képződő sokkal reaktívabb nitrogén – dioxid (NO_2) révén. A füstben található szintén reaktív izoprén (dién) molekulákkal addíciós reakcióban alakít ki szén központú szerves gyököket. A füstben jelenlévő O_2 -t befogva peroxil gyökök keletkeznek, melyek a NO által deoxigenálódnak, ezáltal alkoxil, alkil gyököket és NO_2 -ot képezve, ami újabb láncreakciót képes iniciálni. A láncreakció lehetséges terminációs lépései során peroxinitrát, alkil-nitrát és alkil-nitrit végtermékek képződhetnek, melyek a szervezetre kiemelt toxikológiai hatással bírnak.⁹

A dohányfüst magas prooxidáns tartalmán felül változó mennyiségben tartalmaz különböző fémeket is, valamilyen ionos formában. Alapvetően egyes fémek esszenciális szereppel bírnak a biológiai szervezetek működésében, de mennyiségük szigorúan szabályozott. Számos biológiai folyamathoz nélkülözhetetlenek, hiszen a szervezetünkben megtalálható enzimek körülbelül egyharmadának szüksége van valamilyen fém ionra a működéséhez. Azonban, egy bizonyos határérték felett előtérbe kerül az egészséget károsító hatásuk. Erre kiváló példa a vas (Fe), amely nélkülözhetetlen szereppel bír többek között az oxigénszállításban (hemo- és mioglobin), elektron transzportban (citokrómok), DNS építőköveinek szintézisében (ribonukleotid-reduktáz), azonban magas koncentrációja hosszú távon szívproblémákhoz és

érelmeszesedéshez vezethet.¹⁰⁻¹² Mindezek mellett a szervezetünkbe juthatnak olyan fémek is, amelyek kizárólag negatív hatással bírnak. Ilyenek például az olyan nehézfémek, mint a kadmium (Cd), higany (Hg), ólom (Pb), arzén (As). A bekerülésük egyik lehetséges módja többek között a rendszeres dohányzás. A dohánynövény azon növények közé tartozik, amely a talaj esszenciális elemeinek felvételére szolgáló mechanizmusai mellett képes felvenni és akkumulálni annak toxikus fémtartalmát is. Ennél fogva olyan toxikus fémek, mint az alumínium (Al), Cd, króm (Cr), réz (Cu), Pb, Hg, nikkel (Ni), vanádium (V) és cink (Zn) a talaj és légszennyezés révén bekerülnek a növény leveleibe, így magában a dohányfüstben is jelen lesznek.¹³

Dolgozatom szempontjából a fent említett fémek ionos formája közül kiemelném a Cd^{2+} -ot. Annak ellenére, hogy a nehézfémek között is kiemelkedő toxicitással rendelkezik, gyakran előfordul a mindennapi életben is. Általánosságban nézve legnagyobb beviteli forrását a táplálékláncban való halmozódása jelenti, de a dohányosok körében összességében ezt jóval meghaladja a csak dohányfogyasztásból származó Cd^{2+} mennyisége. Mivel sem a szájüregi, sem pedig a tüdő laphám sejtjei nem képesek kiszűrni az ilyen kisméretű toxikus anyagokat, azok akadály nélkül kerülnek be a környező szövetekbe, majd a keringésen keresztül más szövetekbe és szervekbe is.^{14,15} A Cd^{2+} szervezetre gyakorolt hatásai között tényként tartjuk számon, hogy proinflammatórikus citokinek indukciójával gyulladást okoz, karcinogén, illetve akkumulációjával számos szerv megbetegedését válthatja ki^{14,16}. A véráramba kerülését követően a felhalmozódás célzott helye a vesékben van, ahol a Cd^{2+} koncentráció 30-60-szorosa is lehet az elsődlegesen kitett tüdő szövettel szemben.¹⁷ Az Egészségügyi Világszervezet Nemzetközi Rákkutató Ügynöksége a Cd^{2+} -ot, illetve annak vegyületet az 1-es számú humán karcinogének csoportjába sorolja, mivel közvetlenül kapcsolatba hozható a tüdő, vese és prosztatara rákos megbetegedésével. Mindemellett közvetett rákkeltő hatása a szövetek és sejtek szintjén megvalósuló kompetitív Zn^{2+} helyettesítésen (DNS hibajavító enzimek gátlása), gyulladásos válaszreakciók indukálásán és az immunsejtek reaktív oxigén fajták (ROS) termelésének fokozásán alapszik.¹⁸ A vérkeringésbe kerülve azonban nemcsak a „célszerveket” károsíthatja, hanem a teljes szív- és érrendszert is érinthetik

ezek a hatások. Számos tanulmány támasztja alá, hogy a dohányosok körében előforduló CVD erős összefüggést mutat a vér megemelkedett $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ arányával. Ezen betegek körében gyakoribb volt a perifériás érbetegségek, a szívinfarktus és magas vérnyomás kialakulásának kockázata.^{19–23}

A Cd-on túlmutatóan azonban érdemes kiemelni, hogy a dohányfüstben is megtalálható más nehézfémek (Fe, Cu, Hg, Ni, Pb, As) is hozzájárulnak a reaktív gyökök termeléséhez. Az egyik legfontosabb szabadgyök képző útvonal a Haber-Weiss / Fenton-reakció, melyek során a O_2^- / H_2O_2 a két- vagy háromértékű átmeneti fémek által katalizált reakcióban hidroxil – gyököket termel.^{24,25}

A fentiek alapján tehát látható, hogy a dohányfüst nagy mennyiségben tartalmaz prooxidáns molekulákat és vegyületeket, amelyek közvetlen vagy közvetett hatásaikon keresztül felborítják a szervezet redox homeosztázisát.

2.1.2. Oxidatív stressz hatásai, markerei és a védekezés lehetőségei

A főbb prooxidánsokat két fő csoportba oszthatjuk: ROS és reaktív nitrogén fajták (RNS). Mindkettő termelődik normál anyagcsere folyamatokban is az élő szervezetekben, és alacsony, szabályozott koncentrációban hozzájárulnak a fiziológias folyamatok működéséhez. Azonban, ha a prooxidánsok és az őket ellensúlyozó antioxidáns molekulák közötti egyensúly felborul az oxidánsok javára, akkor oxidatív / nitrozatív stresszről beszélünk. Ezt egyaránt okozhatja belső vagy külső forrásból származó stressz faktor. A magas koncentrációban jelenlévő, nem szabályozott mennyiségű prooxidánsokkal kapcsolatos legfőbb probléma, hogy károsítják a sejtek / szövetek normál működésében szerepet játszó makromolekulákat (fehérjék, lipidek, DNS, cukrok).²⁶ A szabadgyök kutatás évtizedes eredményei számos olyan betegség patomechanizmusát írták le, ahol az oxidatív stressz kialakulása kulcsszereppel bír. A teljesség igénye nélkül vitathatatlanul ezek közé tartoznak: tumorok, diabétesz, asztma, szürke hályog, érlemezsedés és számos neurológiai kórkép.^{27,28} A makromolekulák károsodása nem tűnik el nyomtalanul, így számos olyan markert ismerünk, amelyek segítségével követhetjük vagy következtetni tudunk egy rendszer redox állapotára.

A fehérjék esetében a ROS/RNS okozhat polipeptidlánc feldarabolódást, megváltozhat a felületi ösztöltés, keresztkötések alakulhatnak ki, valamint egyes aminosavak specifikus oxidációs és / vagy nitrozilációs módosításokat kaphatnak. A szulfhidril csoportok és metionin oldalláncok oxidációja a makromolekula konformáció változásához, és denaturációjához vezet. A nitrozatív stressz esetében a NO-ból származtatható oxidánsok, főként a peroxinitrit (ONOO^-) gyakori támadáspontja a fehérjék tirozin oldallánca, melynek eredményeként többek között 3 – nitrotirozin (3-NT) alakul ki. Legvégül ez a fehérjék funkcióvesztésével, degradációjával jár.^{29,30}

A lipidek károsodása elsősorban azért jelent problémát, mert a sejtek kettős membránjának építő elemei. A ROS/RNS által kiváltott destruktív láncreakciót lipid peroxidációnak nevezzük. Ennek következtében meg bomlik a foszfolipidek kettős rétege, így inaktiválódhatnak a membrán-kötött receptorok, enzimek, és megnő a sejtek áteresztőképessége. A lipid peroxidáció termékei között tartjuk számon a malondialdehidet és különböző telítetlen aldehideket, izoprosztánokat, tiobarbitursavat, melyek a károsodás mértékének indirekt markerei. A lipid peroxidációs termékek a citoplazma fehérjeivel keresztkötést alakíthatnak ki, gátolva azok funkcióját. Ez utóbbi hatás szempontjából külön kiemelném a 4 – hidroxil – 2 – nonenal (4-HNE) molekulát, mely a lipid peroxidáció egyik legjelentősebb végterméke. A közreműködésével képződő irreverzibilis fehérje – 4-HNE addíciók (ún. Michael – adduktok) jelenlétét és mennyiségét a lipid peroxidáció egyik legjobb markereként tartják számon.^{31–33}

A reaktív vegyületek DNS-t károsító hatása igen sokféle lehet: a nitrogén tartalmú bázisok oxidatív degradációja, egyes és kettősszalú törések indukciója, a purin, pirimidin bázisokon és a cukorfoszfát gerincen bekövetkező változások, valamint az ezekkel járó deléciók, átrendeződések, és keresztkötések kialakítása. Az ezzel járó következmények nem meglepő módon erős összefüggést mutatnak a rákos megbetegedésekkel, öregedéssel, neurodegeneratív kórképekkel, szív- és érrendszeri problémákkal és autoimmun betegségekkel. A DNS károsodások nyomon követése leginkább a kettős spirál töréseinek vizsgálatával, vagy az oxidatív stressz hatására bekövetkező leggyakoribb bázismódosítás, a 8-hidroxiguanin képződésén alapszik.³¹

A különféle stresszhatások elleni védekezés lehetőségei legalább annyira sokszínűek, mint maguk a károsító hatások. Az élő szervezetekben az oxidánsok hatásait az úgynevezett antioxidánsok ellensúlyozzák. A részletes bemutatásokat elkerülendő, ezeket két fő csoportra oszthatjuk: enzimatis és nem-enzimatis antioxidánsok. Az első csoportba tartoznak többek között olyan jól ismert enzimek, mint a $O_2^{\cdot-}$ semlegesítését végző szuperoxid – dizmutáz család tagjai, a H_2O_2 specifikus kataláz és peroxidázok, illetve a szintén fontos szerepet betöltő hem – oxigenázok, és olyan redox fehérjék mint a tioredoxinok, peroxiredoxinok és glutaredoxinok. A sokféleségük egyfelől a szubsztrát specificitásukon, másrészt pedig a sejten belüli és / vagy szövetspecifikus lokalizációjukból adódik.³⁴ A másik (nem enzimatis) antioxidánsok csoportjába pedig olyan kis molekulású képviselők tartoznak, mint a vitaminok (C, E), béta – karotin, húgysav és a szulfhidril csoportot tartalmazó glutation oligopeptid, illetve a metallotionein (MT) fehérjék családja.³⁵

A fémterhelés ellensúlyozásában nemcsak a konvencionális antioxidáns molekulák, hanem speciálisan erre szakosodott fehérjék is részt vesznek. Szervezetünk fém homeosztázisának fő szabályozói az előbb említett kisméretű, ciszteinben gazdag úgynevezett MT-ek. Legfőbb feladatuk, hogy fenntartsák a sejtek, szövetek fémháztartásának egyensúlyát, de emellett $O_2^{\cdot-}$ semlegesítő kapacitásuk is jelentős. A MT-ek családjába 6-7 kDa méretű fehérjék tartoznak. Közös tulajdonságuk, hogy nagy arányban (~30%) tartalmaznak cisztein aminosavakat, melyek a fémek/szabadgyökök megkötését biztosítják. A kapacitásuk kiterjed egyfelől a fiziológiás (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Se), másfelől pedig a szervezet számára idegen eredetű (Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{2+} és As^{3+} ionok) fémek befogására is. A detoxifikáló képességük a speciális szerkezeti tulajdonságuknak köszönhető, ami lehetővé teszi a megkötött fémek stabilizálását, szállítását. Az elmúlt évtizedek során 4 különböző izoformájukat sikerült azonosítani (MT1-4), melyből az MT1 izoformán belül 8 különböző gén által kódolt aktív MT1 alfajtát sikerült elkülöníteni. A fennmaradó 3 MT izoformát pedig egy-egy önálló gén kódolja.^{36,37} Ezen túlmutatóan az MT-k számos más élettani folyamatban is részt vesznek. Általánosságban közvetetten is védenek az oxidatív stresszel szemben, azáltal, hogy gátolják egyes ROS termelő enzimek, például az indukálható nitrogén-monoxid szintáz és ciklooxygenáz-2

enzimek működését. Ezen felül szerepüket már felfedezték többek között a hipoxia által indukált érékezésben, az erek endotél sejtjeinek proliferációjában, migrációjában és funkcionális összerendeződésében, így a differenciálódó fiatal sejtek anti-apoptotikus fenntartásában. A kardiovaszkuláris rendszer és az endotél sejtek szempontjából a legfontosabb izoformák közé az MT1E, MT2A és az MT3 tartozik.³⁸ Promóter régiójuk többféle stimuláns válasz elemét tartalmazza, mint például fém, glükokortikoid, valamint antioxidáns, és gyulladásos mediátorokkal összefüggésbe hozható szabályozó elemek. Kifejeződésük tehát könnyen indukálható a megnövekedett ROS, főként H₂O₂ hatására, illetve olyan fémionokkal, mint pl. a Cd²⁺ és Pb²⁺.³⁹

Érdemes még kiemelni a védekezésnek egy másik speciális szintjét, ahol a fehérjék minőségellenőrző és a proteotoxikus stressz elleni védekezésben résztvevő mechanizmusok érvényesülnek. A korábban taglalt stressz hatások és annak következményei a biológiai folyamatokat irányító fehérjéket nagymértékben érintheti. A sejt szintű stressz, ami a fehérjék károsodásával jár, olyan speciális válasz útvonalakat aktivál, melyek a sérülések kijavításán igyekeznek. A legismertebb stresszválasz gének által kódolt fehérjék az úgynevezett stressz- vagy dajkafehérjék. Alap funkciójukat tekintve segítik az újonnan szintetizált polipeptidek helyes feltekeredését, aktiválását és célba juttatását a rendeltetési helyükre. A stresszválaszban betöltött fontos szerepüket mutatja, hogy a rendszer hibái a sejtek öregedéséhez és különböző betegségek kialakulásához vezet. Ha a károsodás együtt jár a fehérjék denaturációjával, akkor a dajkafehérjék igyekeznek ezt helyrehozni, ha pedig nem járnak sikerrel, akkor az adott fehérjét lebontásra jelölik ki. A dajkafehérjék megnevezés egy sok tagból álló szupercsaládot takar, amelyeknek egy része valamilyen stresszor hatására indukálható. Tudománytörténeti szempontból azon géneket / fehérjéket, amelyek hőhatásra fejeződnek ki hősokk fehérjéknek (HSP) nevezzük. A manapság azonban már tudjuk, hogy a HSP-k indukciója nem csak és kizárólag hőmérsékletfüggő, hanem számos más külső és belső forrásból származó ingerre reagálnak (fertőzés, gyulladás, alkohol, fémek, UV sugárzás, oxigén hiány, éhezés, stb.).^{40–42} Mivel a stressz hatások leküzdése az élő szervezetek kialakulásával egyidős problémát jelent, a stresszválasz egy nagyon ősi, konzervált, ám alapjaiban véve egy egyszerű molekuláris folyamat.

Akut vagy krónikus stressz hatására a monomer formájú úgynevezett hősokk faktorok (transzkripciós faktorok) a sejtmagba áthelyeződő foszforilált trimereket képeznek. Ezek kapcsolódnak a promóter régióban elhelyezkedő hősokk-válasz elemekhez, amely aktiválni, illetve fokozni fogja a génátírást. A stressz válasz csendesítése pedig egy negatív visszacsatolással valósul meg, az előzőleg leírt lépések ellentétes irányú lezajlásával.^{43–47}

A HSP-ket általánosan elfogadott módon a molekulatömeg szerint csoportosíthatjuk (nagy molekulásúlyú HSP-k, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 és a kis molekulásúlyú HSP-k). Ezek közül néhány mondat erejéig a HSP90-et szeretném bemutatni, amely a doktori értekezésem szempontjából kiemelt fontossággal bír. A HSP90 a molekuláris dajkafehérjék közül a legnagyobb mennyiségben található meg a sejtekben. Megközelítőleg a proteom 2%-át teszi ki normál körülmények között. Sejten belüli lokalizációjuk alapján a családon belül négy képviselőt különböztetünk meg. A legjelentősebbek a HSP90AA (alfa) indukálható, és a HSP90AB (béta) konstitutív izoforma a citoplazmában és a sejtmagban található, míg a másik két izoforma az endoplazmatikus retikulumra, illetőleg a mitokondriumokra korlátozódik.⁴⁸ Sejten belül betöltött szerepük sokfélesége a számos más fehérjével kialakított kölcsönhatásokon alapszik, amely igen széles skálán mozog. Az úgynevezett HSP90 kliens fehérjék között azonosítottak foszforilációért felelős fehérje kinázokat, sejtmagi receptorokat, és különféle transzkripciós faktorokat is. Emiatt kiemelten fontosak az általános jelátviteli folyamatokban is.^{49–55} Központi szerepük miatt nem meglepő módon számos betegség kialakulásával is összefüggésbe hozhatóak.^{41,56}

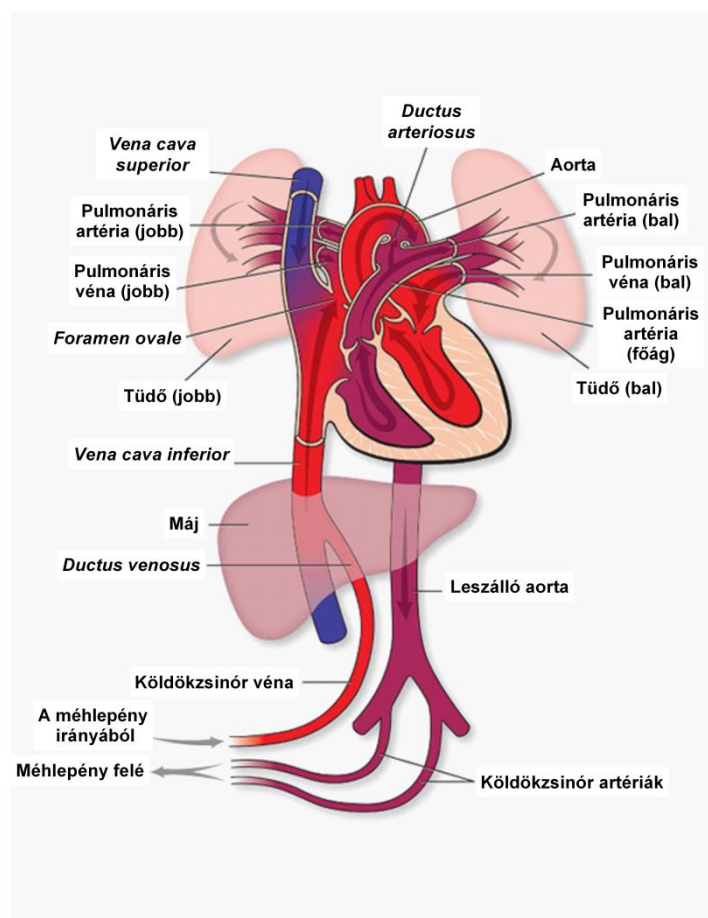
2.2 A toxikus kitettség hatása az embrionális fejlődésre

A dohányzás felnőtt szervezetekre gyakorolt negatív hatása behatóan tanulmányozott. A fentiekben részletezett problémák azonban adott esetben hatással vannak a fejlődő embrióra / magzatra is. Az is régóta ismeretes, hogy a terhes édesanyák helytelen életmódja közvetlen hatással bír a gyermekük fejlődésre. Mindezekkel szemben a toxikus terhelés méhen belüli életre gyakorolt hatásainak molekuláris hátteréről még nem rendelkezünk elég információval, illetve a későbbi életszakaszokban kialakuló, de erre a

problémára visszavezethető betegségek pontos mechanizmusáról sincs egyértelmű képünk. Ahhoz, hogy megértsük a kapcsolatot az anyai életmód és a magzati fejlődés között, érdemes közelebbről is megvizsgálni a méhen belüli tápanyag és oxigénellátás folyamatát.

2.2.1. A keringés szerveződése a méhen belüli élet során

A magzati keringés felépítése a felnőtt szervezeteknél megszokottakhoz képest számos ponton különbözik, mivel igazodnia kell a méhen belüli élet különleges szükségleteihez (**2. ábra**). Alapvetően már a terhesség korai szakaszában kialakul az a kezdetleges struktúra, amely lehetővé teszi a megfelelő tápanyag és oxigénellátást. Magzati keringésről körülbelül a terhesség 22. napjától beszélhetünk, ami az első szívveréssel egyenlő. A kezdeti oxigén és tápanyag ellátás a szikhólyagon keresztül történik, majd a 10. héttől ezt a szerepet teljes egészében a méhlepény (placenta) veszi át.^{57,58}



2. ábra A magzati keringés vázlata (American Heart Association – Fetal circulation - <https://bit.ly/3c4CXyC>)

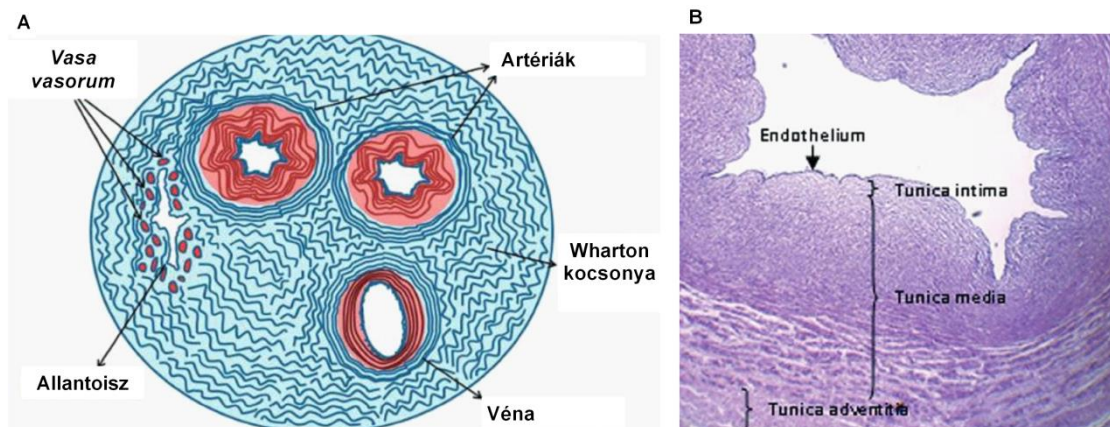
A méhlepény egy önálló szerv, melynek állapota kiemelt fontossággal bír a magzati fejlődésben. Kialakulását tekintve az extraembrionális membránok, valamint az anyaméh endometriumának kapcsolatából jön létre. Ebből következően két részre osztható: a magzati és az anyai részre, így biztosítva kapcsolatot a két szervezet között. Funkcionálisan három fő feladatot lát el: tápanyagok és légzési gázok szállítása/cseréje, hormonális szabályozás, illetve egy szelektív, fizikai gát képzése az anya és a magzat között. Emiatt az anyai és a magzati keringés sosem kerül közvetlen kapcsolatba. Az anyag- és gázcsera a több rétegből álló, ún. interhemális membránon keresztül történik. A kicserélődési mechanizmusok három módon történhetnek. Diffúzió útján a kisméretű hidrofób molekulák (gázok, urea, egyes zsírsav molekulák) passzívan utaznak oda – vissza a koncentráció függvényében. Transzporter / pumpa aktivitással rendelkező fehérjék segítségével (facilitált, kicserélő, aktív) a nagyobb zsírsavak, glükóz és az aminosavak szállítódnak. Emellett az immunitás kialakításában szerepet játszó immunoglobulinok, valamint a folsav, egyéb vitaminok és a hormonok vezikulába csomagoltan endo- és exocitózis útján vándorolnak a placentán keresztül.^{59–63}

Dolgozatom szempontjából fontos kiemelten foglalkozni a méhlepény magzati védelemben betöltött szerepeivel. A fizikai gát három fő elemből tevődik össze: szinciciotrofoblaszt, citotrofoblaszt és a magzati endotél sejtek, melyek együttesen egyfajta szűrőként működnek. Ez a szeparáló réteg felelős a káros anyagok és a fertőző ágensek visszatartásért.⁶⁴ Emellett a placenta detoxifikáló mechanizmusai is nagy jelentőséggel bírnak, amely egyfajta molekuláris barrierként értelmezhető. Mivel a magzat még nem rendelkezik fejlett antioxidáns védelmi rendszerrel, így a méhlepény jelentős szerepet tölt be a szabadgyökökkel szembeni védelemben. A magzati védelmi rendszer érése egészen a terhesség végéig tart. Ezzel párhuzamosan a gesztáció előrehaladtával a méhlepény antioxidáns enzimaktivitása növekszik. Ezek közül a legjelentősebb a szuperoxid-dizmutáz, kataláz és glutation-peroxidáz enzimek aktivitása. Az enzimatis védelmi vonal mellett kimutatták, hogy a placenta jelentős MT expresszióval is rendelkezik. Cd²⁺ terhelés esetén a méhlepény akkumulálja, és igyekszik visszatartani a nehézfémet, amely közvetetten egy negatív hatást is jelent a magzat számára. Ennek hátterében az áll, hogy a Cd²⁺

által indukált MT expresszió, nem csak a nehézfémek megkötését fogja kiváltani, hanem olyan esszenciális nyomelemek átjutását is gátolni fogja, mint például a Zn^{2+} .^{65–69} Tekintettel arra, hogy ez a védelmi vonal a terhesség korai szakaszától kezdődően erős igénybevételnek van kitéve, és ezalatt nagy mennyiségű toxikus terhelést halmaz fel nem meglepő, hogy a méhlepény nem nyújt teljeskörű védelmet, és a fejlődő magzat szervezetébe jelentős mértékben kerülhetnek káros anyagok. Ilyenek például egyes gyógyszer hatóanyagok is, melyek teratogén hatása ma már jól ismert. A hatékonysága a placentális rétegek vastagságának, ezáltal a kétirányú transzport folyamatokat leíró áteresztőképesség függvénye. Azonban a szakirodalomban jól alátámasztott adatokból tudjuk, hogy méhlepény struktúrája a terhesség előrehaladtával degradálódik. Ezzel teret engedve egy idő után bizonyos anyagok könnyebb átjutásának. Ennek hátterében a placentális gát vékonyodása áll, mely az első trimeszter 20 – 30 μm -es vastagságáról, 2 – 4 μm -re csökken a harmadik trimeszter végére.^{70,71}

A méhlepény és a fejlődő magzat közötti összeköttetést, ezáltal a megfelelő tápanyag és oxigén ellátást a köldökzsinór biztosítja. Ebből következően, állapota meghatározó szereppel bír a megfelelő méhen belüli fejlődésben. A köldökzsinór és a méhlepény együtt olyan átmeneti szervekként funkcionálnak a terhesség alatt, amelyek ha károsodást szenvednek, akkor közvetlen vagy közvetett módon veszélybe kerülhet a magzat oxigén és tápanyag ellátottsága vagy keringési zavar alakulhat ki.^{72–74} A köldökzsinór a placentával ellentétben, teljes mértékben embrionális eredetű. A teljes hossza körülbelül 50 – 60 cm, átmérője 1,5 – 2 cm. Felépítését tekintve két artériát és egy vénát tartalmaz spirális lefutásban, amelyek egy speciális kötőszövetbe, az úgynevezett Wharton-kocsonyába ágyazva foglalnak helyet (**3. ábra**). A Wharton – kocsonya kollagénben gazdag extracelluláris mátrixában miofibroblaszt sejteket találunk, amelyek egyfelől biztosítják a szerv kontraktilis és rugalmas tulajdonságait, másfelől pedig a kötőszövet termelésért felelősek. Az extracelluláris mátrix a kollagén rostnyalábok mellett jelentős mennyiségben tartalmaz nagy vízkötő kapacitással rendelkező hialuronsavat, sókat, metabolitokat és plazmafehérjéket, amelyek biztosítják a köldökzsinór transzportfolyamatainak dinamikáját és a megfelelő ozmotikus viszonyokat. A

szöveti rugalmasságnak köszönhetően a beágyazódott erek védelme biztosított a terhesség és a szülés során fellépő mechanikai behatásoktól (csavarodás, összenyomódás).⁷⁵⁻⁷⁷ Alapvetően a köldökzsinór véna oxigénben és tápanyagokban dús vért szállít a placenta felől a fejlődő magzathoz, a két artéria pedig az oxigénben szegény vért szállítja visszafelé a méhlepényhez, ahol az felfrissül. A pontosság kedvéért azonban érdemes kitérni arra, hogy a magzat felől visszaáramló vér tulajdonságai eltérnek a megszokott keringési rendszerben ismertektől. Ennek oka, hogy a méhen belüli fejlődés egy relatíve hipoxiás környezetet jelent, és nem működik a tüdő funkcionális keringési rendszere (kisvérkör) sem. Ebből következően a vénából a magzatba és onnan visszafelé áramló vér számos ponton találkozik egymással. Ezek az úgynevezett prenatális *shunt*-ök (a máj és a szív területén) biztosítják a vénás vér oxigén tartalmának csökkenését, amely így a szövetek fejlődéséhez optimális értékekre szabályozódik. Ennél fogva tehát a köldökzsinór artériákban áramló vér inkább kevertnek tekinthető.⁷⁸ Mindazonáltal ez a rendszer önmagában zártnak tekinthető, így a köldökzsinórban foglalt erek a magzat keringési rendszerének meghosszabbításaiként is értelmezhetők.



3. ábra (A) A köldökzsinór keresztmetszetének sematikus rajza (B) A köldökzsinórban foglalt erek általános felépítése (Barrios alapján módosítva)⁷⁹

Ennek következtében a köldökzsinór vénák hordozzák az anyai keringésből érkező és a méhlepény által átengedett károsító hatások lenyomatait, az artériák pedig leginkább a magzati állapotról adhatnak képet. Ezáltal a méhlepényen átkerülő toxikus anyagokkal szemben a vénák

elsődlegesen és közvetlenül érintettek, míg az artériák esetében egy közvetett kitétségről beszélhetünk. Az erek nem meglepő módon a magzati vérkeringéshez hasonlóan egyedi felépítéssel rendelkeznek, és bizonyos mértékben különböznek a testet behálózó más erektől. A legbelső réteget (*tunica intima*) az endotélsejtek szorosan egymáshoz illeszkedő rétege alkotja. A középső réteg (*tunica media*) a simaizmok csoportja. Az izomsejtek két vastagabb rétegbe rendeződnek: belső, hosszanti irányultságú izomsejtek és a külső burkolatot képző keresztirányban spirálisan futó simaizom réteg. Az erek abszolút egyedi tulajdonsága, hogy teljes egészében hiányzik a megszokott külső rétegük (*tunica adventitia*). Emiatt nem rendelkeznek a más ereket burkoló rugalmas rostokkal sem. Ennek a hiánynak másik, korábban említett velejárója, hogy nem rendelkeznek ún. tápláló erecskével (*vasa vasorum*) és nincs érfalat ellátó beidegzésük sem (*nervi vasculares*).^{80,81} Az erek tónusának szabályozása lokális tényezőkön alapuló és közvetlen környezetük hatásaitól függő, főként autogén rendszer (endokrin faktorok, nyíróerő, oxigén koncentráció, stb.).⁸² Ebben az egyik legfontosabb szerep az endotél sejteké, amelyek szorosan egymáshoz illeszkedve alkotnak egy zárt réteget, ami a vérrel folyamatos, közvetlen kapcsolatban van. Ennek megfelelően a méhlepény által ki nem szűrt káros anyagokkal szemben is elsődlegesen kitéttek. Az endotélium feladata valójában egy széleskörű és integratív érzékelési-válaszadási folyamat. Az adekvát reakciók pedig érintik magukat az endotél sejteket (autokrin), illetve közvetlen környezetüket (parakrin), amelyet főként a simaizom sejtekre lehet vonatkoztatni. A simaizom sejtekkel való együttműködés eredményeként adaptívan változik az erek keresztmetszete, így a benne áramló vér sebessége.

2.2.2. A magzati oxidatív stressz általános következményei

A méhen belüli élet olyan adaptív folyamatok összessége, amelyek egy állandó strukturális, fiziológiai és anyagcsere változással járnak, ezzel felkészítve a magzatot a születés utáni életre. Ezek a folyamatok szigorúan szabályozottak, és amennyiben zavart szenvednek, az számos szinten kihat a fejlődésre, és a későbbi életszakaszokban (akár felnőtt korban is) számos betegség hajlamosító tényezőiként jelentkezhetnek.

Az előző fejezetek alapján kijelenthetjük, hogy a dohányzás jelentősen hozzájárul a ROS/RNS koncentráció megemelkedéshez és mindemellett a toxikus fémek szervezetbe jutása is nagy kockázatot jelent. Mivel a magzati fejlődés az anya állapotával szoros összefüggésben áll, így az oxidatív stressz ok-okozati összefüggései itt is megnyilvánulnak. Maga terhesség alapvetően egy olyan fiziológias állapot, ahol az oxidatív stressz természetes velejárója lehet az anyagcsere megnövekedett oxigén és tápanyag igényének. A dohányfüstben megtalálható kémiai anyagok a placentán átjutva közvetlenül és közvetetten is hatással lehetnek a magzat oxigén és tápanyag ellátottságára.^{83,84} Szakirodalmi adatok támasztják alá, hogy a megemelkedett lipidperoxidáció és a prooxidáns-antioxidáns egyensúly felborulása nem csak a dohányzó édesanyák, hanem az újszülöttek szervezetében is kimutatható.^{85,86} Emellett a már említett nehézfém terhelés nyomai is kimutathatóak, ahol a rövidtávú kitettséget a vérben, míg a terhesség teljes időszakára vonatkozó terhelést a placentában mért Cd^{2+} , és Pb^{2+} koncentrációk tükrözik.⁸⁴ Ennek következtében az újszülöttnak megnő az érzékenysége az oxidatív stresszel szemben, amely növelheti a későbbiekben kialakuló betegségek kockázatát.⁸⁷

2.2.3. Kemo-biológiai interakciók hatása az embrionális fejlődésre

Fontos negatív következményként tartjuk számon a dohányzás fejlődésbiológiai hatásait is. Ilyen ok-okozati összefüggések között említhetjük például az epigenetikai változásokat, amelyeket az utóbbi évtized kutatásai alapján a potenciális rizikófaktorokat jelentenek, akár több generációra is továbbörökítve. Az örökletes epigenetikai változásoknak fontos szerepe van az egyedek közti variabilitásban, amely növelheti egyes betegségekre hajlam/érzékenység kockázatát. Mindemellett ne feledjük el, hogy ezeknek a változásoknak adaptív szerepe van a sejtek fejlődésében és funkciójában. Ezen programozott folyamatok sérülése a méhen belüli fejlődés kulcs szakaszaiban egy életre szóló funkcionális változásokkal járnak.^{88–91}

Az elmúlt évek nagyszámú, mélyreható és rendszerszintű vizsgálatainak adatai bizonyítják, hogy a dohányzás (beleértve a passzív dohányzást is) számtalan fejlődési rendellenességhez vezethet.^{92–95} 2013-ban Feltes és munkatársai jelentették meg az első olyan közleményt, amely a nikotin és 50

egyéb más dohányfüst összetevő kemo-biológiai kapcsolatait vizsgálta. Ezzel betekintést engedve abba, hogy a potenciálisan veszélyesnek ítélt anyagok miként, milyen molekuláris útvonalakon hatnak olyan fejlődést befolyásoló tényezőkre, mint az abnormális sejt proliferáció, differenciáció és az oxidatív stressz. Eszerint a biológiai folyamatok olyan széles köre válhat érintetté, mint a sejtek közötti kommunikáció és jelátvitel, hormon szintézis, DNS hibajavítás és metabolizmus, valamint a gyulladásos válaszreakciók. A negatív hatások összetettségén belüli kapcsolatok vizsgálatával két főbb útvonal különíthető el. Az egyik a gyulladásos folyamatok növekedése, valamint ezzel párhuzamosan a génexpresszió, differenciáció és a jelátvitel folyamatainak negatív irányú szabályozása. Ezek a mechanizmusok a továbbiakban kapcsolatba hozhatóak a csökkent születési súllyal, a vetélések gyakoriságának növekedésével, a vázizom rendszert érintő deformitásokkal, csökkent immunitással és tumorok kialakulásában is szerepet játszó megnövekedett proliferációs rátával.⁹⁶ A dohányzás során szervezetbe kerülő anyagok közül a nikotin a legismertebb, de a fejlődésre gyakorolt hatásainak pontos mechanizmusáról eddig keveset tudunk. Ugyanezen kutatás eredményei kimutatták, hogy a nikotin elsősorban a sejtek differenciációját befolyásolja markánsan, a retinolsav jelátviteli útvonalon keresztül. A retinolsav egy lipofil molekula, amely az embriogenezis korai szakaszában a sejtek közötti jelátvitelért felelős. A membránokon keresztüljutva olyan sejtmagi receptorokhoz kapcsolódik, amelyek kulcsfontosságúak a homeobox-gének expressziójában, és a vázrendszer korai fejlődésében.^{97,98} A nikotin ezen receptorokat közvetetten gátolja, és ezzel egy időben olyan sejt proliferációs fehérjéket stimulál, amelyek antagonizálják a retinolsav aktivitását. Mindemellett gátolja azon fehérjéket is, amik a csontszövetek normál fejlődéséhez szükségesek, indukálja a gyulladást serkentő folyamatokat, valamint az egész szervezetre hatást gyakorló sejtszintű stressz folyamatok láncreakcióit indítja el.⁹⁶

2.2.4. A méhen belüli fejlődési zavarokra visszavezethető kardiovaszkuláris problémák

A dohányzás káros hatásai ellen a magzat csak részlegesen védett, és a méhlepény által ki nem szűrt káros vegyületek, fémek a magzat fejlődését és a

születés utáni életét is nagyban befolyásolhatja. A dohányos anyáktól született utódok és a CVD kapcsolatáról számos tanulmány látott napvilágot.

Epidemiológiai tanulmányokból ismeretes, hogy az anyai dohányzás növeli a hirtelen csecsemőhalál kockázatát, és olyan később megnyilvánuló betegségekkel hozható összefüggésbe, mint a magas vérnyomás és számos egyéb CVD.^{99–101} Az előző fejezetben említett nikotin tehető főként felelőssé a szív- és érrendszeri problémák kialakulásáért. Ennek okai között tartjuk számon, hogy a nikotin képes akadálytalanul áthaladni a méhlepényen, és a fejletlen detoxifikáló képességgel rendelkező magzati keringésben felhalmozódni. Ezt mi sem bizonyítja jobban, mint hogy az aktív dohányos édesanyák vérében mért nikotin koncentrációkat a magzati vérből mért koncentrációk általában meghaladják. Hatását tekintve a keringési rendszer nikotinos acetilkolin receptorainak agonistája. Ez a korai fejlődés szakaszában olyan visszafordíthatatlan változásokat indukál, amely hosszú távon változtatja meg egyes sejtek működését, valamint az érfunkció befolyásolásával kardiovaszkuláris komplikációkat indukálhat akár felnőtt korban is.^{102–105} Továbbá állatkísérletes adatok is bizonyítják, hogy az *intrauterin* nikotin terheltség felnőttkori szív működési zavarokat okoz és növeli az érzékenységet az iszkémia / reperfüziós károsodásokkal szemben.¹⁰⁵

Más szemszögből megközelítve, a megnövekedett magzati oxidatív stressz összefüggésbe hozható az elégtelen oxigén és tápanyag ellátással, ennél fogva a normálisnál alacsonyabb születési súllyal is. Amikor a méhen belüli fejlődés nem éri el a genetikailag meghatározott növekedési potenciált, akkor *intrauterin* növekedési retardációról beszélünk. Ez a fenotípus az újszülöttek ~15%-át érinti szerte a világon, és az ezt okozó rizikó faktorok közül kiemelendő a terhesség alatti dohányzás ténye.¹⁰⁶ Ebben az esetben a prenatális hipoxia oxidatív stresszt idéz elő a méhlepényben, ami további RNS termelődést indukál és abnormális placentális funkciót eredményezve a magzat elégtelen fejlődéséhez vezet.¹⁰⁷ Az oxigén hiánya a túlélés érdekében magzati adaptív reakciót vált ki, amely a fejlődő szervek (vese, szív, érrendszer) terhére történik. Ezen folyamatok a vérnyomás szabályozásban részt vevő renin-angiotenzin rendszer receptorainak expresszióján és aktivitásán keresztül vesefunkció változásokat eredményeznek. Mindezek mellett hatással van a

normál érrendszeri funkciókra is (vazokonstrikció, dilatáció). Ennek következményeként növekszik az érfalak merevsége, és visszaesnek az érképző (vaszkularizációs) folyamatok. A felsorolt fejlődés zavarok a későbbi, akár felnőtt életben is nagyban növelik a magas vérnyomás kialakulásának, illetve az ehhez kapcsolódó súlyosabb szövődmények progressziójának kockázatát.¹⁰⁸

2.3 A NO szintézis szabályozása kardiovaszkuláris rendszerekben

Általánosságban az erek feladata a szervek, szövetek megfelelő tápanyag és oxigén ellátása. A szervezetben áramló vér ezen felül számos bioaktív molekulát is szállít, amely nélkülözhetetlen a normál biológiai folyamatok fenntartásában. Ennél fogva az értónus szabályozása kulcsfontosságú az élő szervezetek homeosztázisának fenntartásában. Az endotélium által előállított egyik legfontosabb szabályozó molekula a NO, amelynek termeléséért elsősorban a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) enzimcsalád felelős.¹⁰⁹

2.3.1. A NOS enzimcsalád általános jellemzése

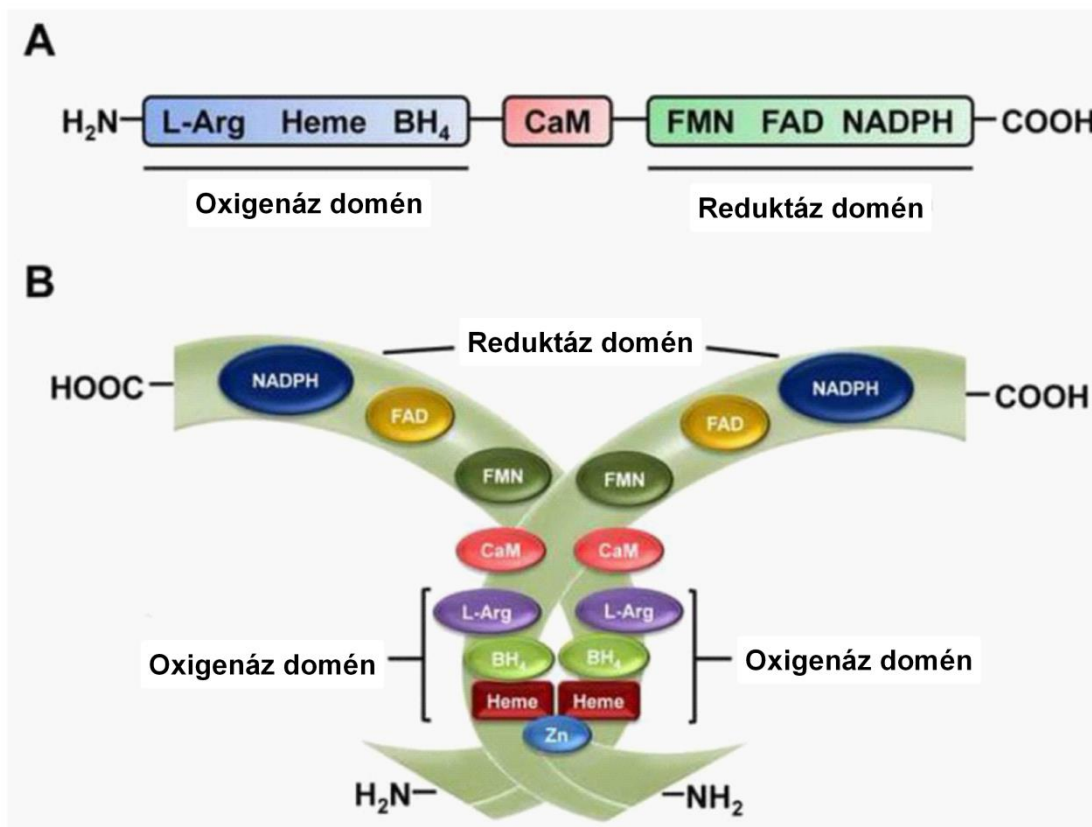
A NO szerepének felismerése („endotéliumból származó relaxáns faktor”) egészen 1987-ig nyúlik vissza. Azóta ennek a kicsi, gáz halmazállapotú, erősen diffúzibilis molekulának biológiai folyamatokban betöltött kulcs szerepéről számos felfedezés született, melyek közül jelen dolgozatban az értónus szabályozást (vazodilatáció) szeretném kiemelni.^{110–112}

A NOS enzimcsaládon belül jelenleg három izoformát ismerünk a magasabb rendű szervezetekben.¹¹³ A három enzim alapvető tulajdonságaiban megegyezik, de szövet specifikus expressziójuk miatt és szabályozásuk egyes elemeiben némileg eltérnek egymástól. Tudománytörténeti szempontból az elnevezésük az alábbi módokon elfogadott: neuronális NOS (nNOS/NOS1), indukálható NOS (iNOS/NOS2), endotéliális NOS (eNOS/NOS3). Azonban fontos megemlíteni, hogy behatóbb vizsgálatuk világossá tette, hogy kifejeződésük helye és szerepük ennél sokkal szélesebb körű. A NOS1 és NOS3 alapvetően konstitutívan expresszálódik. Előbbi főként a központi és a bélidegrendszerben, valamint sima- és vázizom sejtekben, míg utóbbi leginkább

az endotél sejtekhez, epítél sejtekhez, vázizom sejtekhez, májsejtekhez és a méhlepény szinciotrofoblaszt sejtjeihez köthető. Ezzel szemben a NOS2 lokalizációjától függően lehet indukálható (endotél sejtek, immunsejtek, váz- és simaizom sejtek) vagy konstitutív (légzőtraktus epitélium, vastagbél mukóza, neuronok, hepato- és keratinociták).^{114–118} A továbbiakban a disszertációm szempontjából fontosabb NOS2 és NOS3 jellemzésével szeretném folytatni.

A humán NOS2 és NOS3 fehérjéket külön gének kódolják, egy-egy kópiában, eltérő kromoszómákon. A gének hasonló genomi struktúrája miatt, alapvető felépítésüket tekintve megegyeznek. Funkcionális formájukban homodimert alkotnak, amelyben a monomerek kettős domén struktúrát mutatnak. Az N-terminális oxigenáz domén tartalmazza a hem, tetrahidrobiopterin (BH4), L-arginin kötőhelyeket, a C-terminális reduktáz domén pedig a flavin-adenin-dinukleotid (FAD), a flavin-mononukleotid (FMN) és a redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) kötőhelyeket. A két domén közötti összeköttetést egy calmodulin (CaM) felismerő hely biztosítja.¹¹⁹ A két enzim emiatt lényegében hasonló katalitikus aktivitással bír, ami valószínűleg a konvergens evolúció eredménye. A különbségek összességében a kismértékben eltérő aminosav szekvenciák és negyedleges szerkezetek eredményei, amely főként a szubsztrát kötő oxigenáz domént érinti.¹²⁰ A homodimer kialakításában és stabilizálásában a kofaktorok elengedhetetlenek. Az oxigenáz doménhez kötődő Zn^{2+} a szerkezet strukturális stabilitását biztosítja, a BH4 pedig az aktivitás szempontjából fontos. Kötődése a hem és a dimer felületek közé koordinált, ezzel mintegy modulálva a hem prosztetikus csoport redox potenciálját. Az enzimek által katalizált reakció lépcsőzetes elektron transzferen alapszik. Kezdeti lépésként a dimer egyik monomerjének reduktáz doménjéhez kötődik a NADPH, és megtörténik az elektron átadása a FAD, majd a FMN irányába. Ezt követően az elektron továbbítódik a másik monomer oxigenáz doménjének hem csoportjára, feltételezetten egy konformáció váltás segítségével. Végso lépésként a redukált hem prosztetikus csoport részvételével megtörténik a NO szintézise L-arginin szubsztrátból molekuláris oxigén jelenlétében, melléktermékként pedig L-citrullin keletkezik. A folyamatból világosan látszik, hogy az egyes alegységek közti elektron átvitel miatt az enzim aktivitásához elengedhetetlen a dimer struktúra kialakítása.

Érdekes módon a NOS2 és NOS3 dimer képzése is mutat eltéréseket. A NOS2 esetében feltételezhetően csak az oxigenáz, míg a NOS3 esetében mindkét alegység részt vesz a dimer képzésében. Továbbá fontos, hogy mindkét izoforma esetében kulcsfontosságú a CaM kötés, de a NOS2 esetében az aktivációhoz nem szükséges a sejten belüli kalcium szint megemelkedése. Ennek előnye, hogy a NOS2 a szorosan kötött CaM-nal teljes mértékben aktív marad alapszintű kalcium koncentráció mellett is.^{121–124} A NOS2 által termelt NO mennyisége így elsősorban a *de novo* transzlálódó enzim mennyiségének függvénye. Mindemellett a NOS2 hatékonyabb a NOS3-nál a NO forgalom tekintetében, és ez a konstans aktivitással párosulva összességében nagyobb kimenő teljesítményt biztosít.¹²⁵ Mindazonáltal ez leginkább a patogén mikrobák elleni immunválaszban vagy a gyulladásos folyamatokban bizonyul leginkább hasznosnak.¹²⁶ **(4. ábra)**



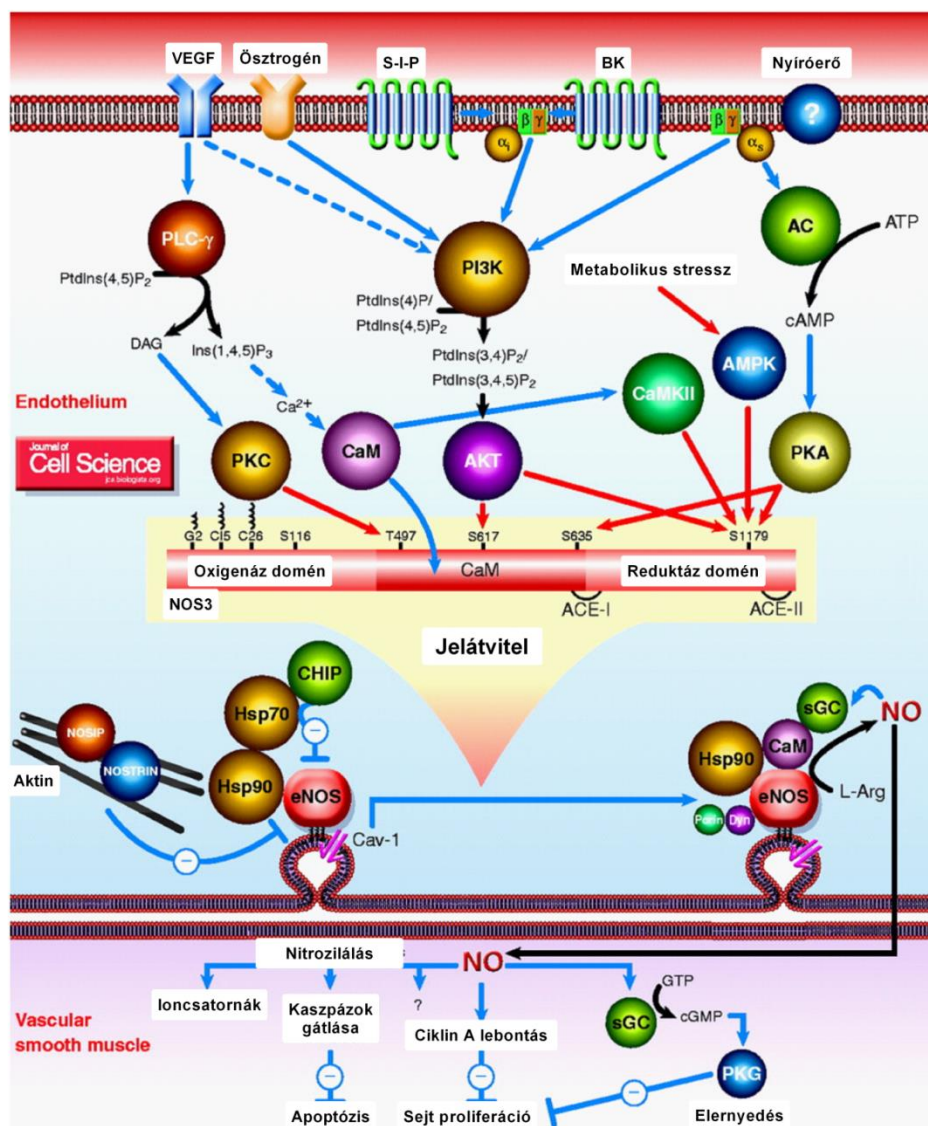
4. ábra (A) A NOS monomer általános szerkezete, felépítése (B) A funkcionálisan aktív NOS homodimer szerkezete (Oliveira és mtsai munkája nyomán módosítva)¹¹⁹

2.3.2. A NOS3 aktivitását befolyásoló főbb szabályozó mechanizmusok

Fiziológias körülmények között az érrendszer endotél sejtjei által termelt NO elsődleges forrása a NOS3.¹²⁷ A NOS3 strukturális tulajdonságai alapján két fő módját különíthetjük el az enzim aktivitás szabályozásának. Az egyik a dimerizáción, a másik pedig a már aktív enzim domének közötti elektron átvitelének befolyásolásán alapszik. Mindkettőre számos változatos példát ismerünk, egészen a kofaktor depléciótól kezdve a poszttranszlációs módosításokon és a sejten belüli lokalizáción át, egészen a fehérje-fehérje kölcsönhatásokig.

A különböző fehérjékkel kialakított kölcsönhatások igen nagy száma miatt most csak a leglényegesebbeket emelném ki. A korábban említett

aktivációhoz nélkülözhetetlen CaM-nal ellentétes hatású az egyik legismertebb gátló hatású fehérjepartner, a kaveolin-1 (Cav1).



5. ábra A NOS3-hoz kapcsolódó jelátviteli útvonalak vázlata (Sessa munkája alapján módosítva)¹²⁸

Ez a fehérje a sejtek membránjának intracelluláris betüremkedéseinek (kaveolák) fő eleme. Ezekben a membrán üregekben a Cav1 közvetlenül kapcsolódik a NOS3 CaM-kötő szekvenciája közelében, ezzel sztérikusán gátolva a CaM általi aktiválás lehetőségét és a NO termelést.^{129,130} További fontos fehérje partnereket is ismerünk, amelyek fő feladata a NOS3 transzlokációja a plazmamembrán területéről, amely az aktiválás egyik kulcslépése. Egy korábbi fejezetben már bemutatott HSP90 például a Cav1

közelében kötődik a NOS3-hoz, amely ennek következményeként felszabadul a Cav1 gátlás alól. A HSP90 segíti a dimert stabilizáló CaM kötődését, és a fehérje kináz B (Akt) toborzást, amely a NOS3-at közvetlen aktiváló foszforilációért felelős. Az úgynevezett NOS kölcsönható protein (NOSIP) ezzel szemben az oxigenáz doménhez kötődve ubikvitin-ligáz aktivitásával degradációra jelöli ki a fehérjét (5. ábra).¹²⁸ Ezzel közvetlenül befolyásolva a NOS enzimek életidejét, amely a NO szint térben és időben való szabályozásának egy speciálisan koordinált megvalósítása. Az is ismert, hogy a béta-aktinnal való kölcsönhatás stabilizálja a dimer aktív formáját, és hiperoxémiás környezetben növeli a NO szintézist, ezzel szabályozva az adott terület vérnyomását. A legutóbb felfedezett alfa-globinnal (hemoglobin lánc) való kapcsolat kialakítása pedig az erek összehúzódását (vazokonstriktió) segíti. Ennek során az alfa-globin a NOS3 oxigenáz doménjéhez kötődik, amellyel egyfelől közvetlenül akadályozza a NO szintézist, másfelől a hem csoportja révén megköti a biológiailag aktív NO-t.^{131–137}

A NOS3 számos poszttranszlációs módosításon is áteshet (pl. mirisztoiláció, palmitoiláció, ubikvitináció, stb.), amelyek közül a legfontosabb az aktivitás szempontjából meghatározó jelentőségű foszforilációk. A foszforilációk különféle stimulusok hatására következnek be. Ennek megfelelően többféle kináz vehet benne részt, amelyek a fehérje tirozin (Tyr), treonin (Thr) vagy szerin (Ser) oldalláncait célozzák, amely meghatározza a NO szintézis sorsát. A kiváltó hatások között megemlíthetjük a nyíróerőt, a bradikininint, a vaszkuláris endotéliális növekedési faktort, különböző hormonokat és az angiotenzint.¹³⁸ Jelenleg hét ilyen pozíciót ismerünk biztosan a humán NOS3 aminosav szekvenciájában, amelyek aktiválják vagy inaktiválják az enzimet. A gátló hatást kiváltó foszforilációk (Ser114, Thr495, Tyr657) során megszűnhet a két domén közötti elektron átadás, akadályoztatottá válik a más aktiváló fehérjékkel való interakciók kialakítása, vagy nő a gátlást kiváltó Cav1-hez való affinitás.^{139–141} Az aktiváló foszforilációs események (Tyr81, Ser615, Ser633, Ser1177) esetén feltételezhetően a felületi töltés megváltozásának hatására gátlódik a reduktáz domén autoinhibitoros aktivitása.^{142–145}

A NOS3 katalitikus aktivitása elsődlegesen az enzim homodimer formájától függ, ahol az elektronok áramlása a két monomer között kapcsoltn

megy végbe. Ez a kapcsoltság általában a szükséges mennyiségben jelen lévő L-arginin szubsztrát, a BH4 és egyéb kofaktorok jelenlétének függvénye. Ha a redox állapot megváltozása hiányt teremt bármelyik előfeltétellel kapcsolatban, akkor a NOS3 úgynevezett szétkapcsolt állapotba kerül. Ennek következtében az elektronok a molekuláris oxigénnel reagálva, $O_2^{\bullet-}$ termelődést fognak indukálni.^{146,147} Az L-arginin szubsztrát normál körülmények között nem limitáló tényező, és fenntartja ezt a kapcsoltságot, azonban egy bizonyos szint alatt bekövetkezik a szétkapcsolás.¹⁴⁸ Az L-arginin más enzimeknek is szubsztrátként szolgálhat, például argináz-1 (ARG1), mely így a NOS3-mal kompetitív viszonyban áll. Az ARG1 által katalizált reakció eredményeként L-ornitin vagy aszimmetrikus dimetil-arginin (ADMA) és urea keletkezik. Az ADMA jól ismert NOS inhibitor. Az L-argininnel verseng a NOS3 kötőhelyeiért, ami ebben az esetben a NO termelés helyet a NOS3 szétkapcsolásához vezet.¹⁴⁹ Ezen tényekre alapozva az endotéliális funkció vizsgálatában mind az argináz aktivitás, mind pedig a vérplazma ADMA koncentrációja kiváló klinikai biomarkerként szolgálhat.^{150,151} A BH4 hozzáférhetőség szintén kritikus szereppel bír a szabályozásban a homodimert stabilizáló hatása miatt. Kedvezőtlen redox körülmények között a BH4 oxidálódik (BH2), és a hem csoporthoz kötődve eltolja az elektron transzportot a molekuláris oxigén irányába, ami szintén $O_2^{\bullet-}$ képzéshez vezet. Emiatt a BH4/BH2 arány fontossága a NOS3 szétkapcsolás tekintetében szintén meghatározó klinikai tényező.^{152,153}

2.3.3. A xantin – oxidoreduktáz (XOR), mint alternatív NO forrás

Az NO hiány kompenzálásának több módja is lehetséges, amennyiben a NOS enzimek megfelelő működése valamilyen oknál fogva gátlódik. Ennek egyik lehetséges módja az S-nitrozotiol vegyületek képzése. A hemoglobin és mioglobin ennél fogva nagy szereppel bír a NO raktározásában és újraelosztásában.

Ennél azonban meglepőbbek az utóbbi években napvilágot látott eredmények, amelyek a XOR kedvező hatásait írják le. A XOR a purin anyagcsere egyik enzime, amely a hipoxantin-xantin-húgysav reakciót katalizálja. Alapvetően ennek a molibdén tartalmú enzimnek az oxidatív

működése olyan redukciós lépésekkel párhuzamosan történik, amik NADH vagy RNS képződéssel járnak.¹⁵⁴ Emiatt korábban úgy vélték, hogy a XOR leginkább egy ártalmas enzim, amely a CVD-k súlyosbodásában kulcsszerepet játszik.¹⁵⁵

Azonban a legújabb eredmények azt sugallják, hogy a XOR reduktáz aktivitása, nitrát (NO_3^-) és nitrit (NO_2^-) szubsztrátot használva hozzájárul a NOS független NO szintézishez bizonyos körülmények között.^{156–159} A XOR által katalizált $\text{NO}_3^- - \text{NO}_2^- - \text{NO}$ út *in vivo* állatkísérletekkel alátámasztva bizonyítja, hogy teljes NOS3 deficiencia esetén az enzim aktivitása megnő, és ezzel párhuzamosan csökken a O_2^- termelés, de növekszik a bevitt NO_3^- -ből származó NO_2^- és NO mennyisége.¹⁶⁰ A XOR expresszió indukálható és aktivitásnövekedés érhető el hipoxiás és gyulladást kiváltó körülményekkel, amit a magasabb oxigén koncentráció gátol. Működésének hátterében feltételezhetően az áll, hogy felépítését tekintve az enzim emlékeztet a bakterális nitrát-reduktázokra, amely megmagyarázza a hasonló aktivitást.¹⁶¹ Ezen felül kimutatták, hogy súlyos iszkémia esetén a szívizom XOR és NO_2^- szintje elegendő ahhoz, hogy annyi NO termelődjön, amely akár meg is haladja a NOS aktivitásból származó értékeket. Ennek megfelelően a XOR aktivitása egy potens bioaktív NO forrás lehet, ha a NOS-függő útvonalak sérülnek.^{162,163}

2.4 Az endotéliális diszfunkció (ED)

2.4.1. A NO szerepe a kardiovaszkuláris rendszerben

A NO lipofil tulajdonságainak köszönhetően könnyen átdiffundál a membránokon. Az endotél sejtekből parakrin módon eljut a simaizom sejtekhez, ahol a szolubilis guanilat-cikláz célfehérjére hatva vazodilatációt vált ki. A radiális diffúzió során nagy mennyiségben az erek lumenébe is átkerül, ahol a vörösvértestek hemoglobinja megköti a szabad NO-t.^{164–168}

A NO sorsának egy izgalmas aspektusa a bizonyos célfehérjék úgynevezett, korábban említett S-nitrozilálása. Ennek során a fehérjék cisztein aminosavjainak tiol csoportjai megkötik a NO-t, és ezzel S-nitrozotiol csoportot alakítanak ki. Az utóbbi években a témakör kiemelt figyelmet kapott a kardiovaszkuláris funkciók területén. A kardioprotektív hatás érvényesülésében is szerepet játszhat a fent említett csoportok kialakítása. Amellett, hogy ez

megváltoztathatja egyes fehérjék funkcióját, védi a fehérje tiol csoportjait az irreverzibilis oxidatív károsodásoktól. Proteomikai eredmények számos célfehérjét azonosítottak, amelyeknek többek között szerepe van a mitokondriális funkciókban, Ca^{2+} homeosztázisban és az izomműködésben. Emellett ilyen a többek között vörösvértestekben (VVT) is megtalálható hemoglobin is, amelynek így nagy szerepe van a NO passzív szállításában és újraelosztásában.^{169–172}

2.4.2. Az ED kialakulásának háttere

Normál helyzetben az endotél sejtek biztosítják az erek relaxációját, gátolják a vérlemezek aggregálódását és a simaizom proliferációt, valamint szabályozzák az érfal permeabilitását. A nem megfelelő endotéliális funkció ezzel szemben érszűkülettel, ezáltal keringési elégtelenséggel, a vérlemezek összecsapzódásával, abnormálisan átjárható érfalakkal és gyulladásos reakciókkal jár együtt. Manapság számos olyan hatást ismerünk, amelyek a normál endotél funkciót negatívan befolyásolják. Minden konvencionális CVD rizikófaktor (diszlipidémia, magas vérnyomás, diabétesz, dohányzás) összefüggésbe hozható az ED kialakulásával, ami közös kiindulópontja a komplexebb megbetegedéseknek.

Az elhúzódó negatív hatásokra adott válaszként az endotélium egy nem adaptív fenotípusváltozáson megy át, melyet a normál funkciók kiesése kísér. Az ED együtt jár a sejtek homeosztázisának teljes felborulásával. Ennek során megemelkedik az adhézións molekulák expressziója, és a gyulladásos és trombotikus faktorok szintézise, abnormálissá válik az értónus szabályozása, végül pedig megszűnik az endotél által mediált vazodilatáció. A NO-függő diszfunkció az érrelmeszesedés felé vezető út egyik első lépése, illetve humán és állatkísérletes adatok alapján előrevetíti a magas vérnyomás kockázatát.^{173–}

¹⁷⁹ Molekuláris szempontból legegyszerűbben a biológiailag hozzáférhető NO csökkenésével írható le a jelenség, amely az oxidatív stressz eredményeként NO inaktivációból és/vagy NOS3 szétkapcsolásból eredeztethető.^{178,180,181} Érdekes módon a megnövekedett NOS2 aktivitás szintén hozzájárul az ED kialakulásához, súlyosbodásához. A NOS2 rövid időn belül nagy mennyiségű NO termelésére képes, de ez kompenzáció helyett fokozza a károsodást és

nitro-oxidatív stresszhez vezet, ha a rendszerben nagy mennyiségű prooxidáns (főként $O_2^{\cdot-}$) van jelen. Ezen felül a NOS2 és az ED kapcsolatából ismeretes, hogy fokozódik egyes kináz fehérjék endocitózisa és lizoszómális degradációja, ezáltal sérül a NOS3–HSP90–Akt-kináz kapcsolati rendszer, ami a NOS3 aktiválását gátolja, végül pedig a homodimer szétkapcsolásához vezet.^{182,183}

2.4.3. Az ED következményei a sejtek és szövetek szintjén

Az ED során megbomló homeosztatikus szabályozás, a fokozott szabadgyök képződés és a makromolekulák károsodása nemcsak a NO termelést és egyéb jelátviteli útvonalakat érint. A hosszabb távon fennálló terhelés hatására olyan progresszív folyamatok indulnak el, amelyek egy kritikus pontot követően a sejtek halálához és szövetszintű degradációhoz vezetnek.

A sejtek halála szigorúan szabályozott folyamat, amelynek általánosságban két fő esemény, az apoptózis és nekrozis köré csoportosítható. A két folyamat között általában megfigyelhetőek átfedések, de maguk a folyamatok alapjaiban térnek el egymástól. A legfőbb különbség, hogy az apoptózis egy programozott folyamat, ezzel szemben a nekrozist egy rendezetlenségbe tartó, passzív sejtpusztulásnak tekinthetjük, amely egy akut vagy túlzott traumára adott válaszreakció. A nekrotikus sejtek morfológiájára a sejtalkotók zsugorodása, a plazmamembrán feltöredezése, és a sejtek lizálódása jellemző.^{184,185} Az apoptózis a sejthalál leggyakoribb formája, mivel nem csak stresszhatás során aktiválódik, hanem szükséges a normál fejlődéshez és morfogenezishez is. Ezáltal az apoptózist kiváltó események érkehetnek külső, és belső forrásból is. Az ide tartozó folyamatok közös vonása a cisztein-aszparagin proteázok, a kaspázok (CASP) láncreakciószerű aktiválása.¹⁸⁶ A kaspáz-kaskád a kiváltó tényezőkre specifikus, úgynevezett iniciátorokkal (CASP8/9/10) kezdődik, amelyek végső soron aktiválják a kivégző funkcióval rendelkező effektor CASP-okat. Ez utóbbiak közül a legismertebb a CASP3, amely alapvetően inaktív prokaspáz dimerként van jelen a sejtek citoplazmájában. Aktiválása az iniciátor CASP-ok által végzett limitált proteolitikus hasításnak köszönhető.¹⁸⁷ Az aktív CASP3 ezután képes a sejtmagba transzlokálódni, ahol a szubsztrát fehérjéinek hasításával kiváltja a

sejtek halálát.¹⁸⁸ Az apoptózist egyedi fenotipikus változások jellemzik. A sejtek alakja piknotikus, a kromatin állomány kondenzálódik, a sejtmag fragmentálódik/lebenyessé válik, apoptotikus testek jelennek meg, illetve degradálódott sejtalkotókat tartalmazó intracelluláris vakuólák. Ezek mellett az apoptózis előrehaladottságával arányosan a sejtmembrán is változik. A folyamat korai szakaszában a lipid kettősréteg egyik alkotója, a foszfatidil-szerin a membrán belső oldaláról exponálódik a külső felszínre, a kései szakaszokban pedig a membrán struktúra teljes mértékben felbomlik. A foszfatidil-szerin specifikus jelölése és a membrán-permeabilitás vizsgálatára kidolgozott kombinált módszerekkel a sejtek életképessége jól nyomon követhető.^{189,190}

A magasabb szinten bekövetkező degradáció nemcsak a sejtek pusztulását foglalja magába, hanem a sejtek közötti kapcsolatok felbomlásával is jár, ami a rendezett szöveti struktúrák megszűnését jelenti. A degradációs folyamatokat a mátrix metalloproteinázok (MMP) és a metalloproteinázok szöveti inhibitorainak (TIMP) egyensúlya szabályozza. Az MMP család tagjai szubsztrát-specifikus endopeptidáz aktivitással rendelkeznek, amellyel az extracelluláris mátrix elemeinek lebontását végzik.¹⁹¹ Az MMP – TIMP egyensúly kulcsfontosságú a homeosztázis fenntartásában, és a kiegyenlített viszony megváltozása számos CVD alapját képezheti. Ennek alapja, hogy az MMP-k a kardiovaszkuláris rendszerben szabályozzák az endotél, a simaizom és az immunsejtek proliferációját, migrációját, apoptózisát. Az apoptózishoz hasonlóan az MMP aktivitás növekedését is egyaránt kiválthatják külső vagy belső ingerek (gyulladásos citokinek, hormonok, fizikális sejt-sejt/sejt-mátrix kapcsolatok), és a stressz folyamatokat leszámítva fontos élettani szerepet töltenek be a normál szöveti átrendeződés, morfogenezis és az egyedfejlődés különböző szakaszaiban.^{192–195} Eddigi ismereteink alapján 23 MMP-t különböztetünk meg, amelyek nagyfokú homológiával rendelkeznek. Mindemellett gátlásuk mindössze 4 különböző TIMP-en keresztül valósul meg. Az MMP-k legfőbb közös tulajdonsága, hogy propeptidként szintetizálódva, egy proteolitikus hasítást követően érik el aktív állapotokat. Felépítésüket tekintve közös pont a katalitikus doménhez és az ún. prodomén „cisztein-kapcsolójához” koordinált Zn^{2+} . A Zn^{2+} kulcsfontosságú az MMP-k aktivitásának meghatározásában. A cisztein- Zn^{2+} kapcsolat az MMP-ket mindaddig inaktív

formában tartja, amíg meg nem történik (általában más MMP-k által katalizált) a prodomén hasítása. A TIMP-ek speciális struktúrával rendelkező N-terminális doménje az MMP katalitikus doménon belüli Zn^{2+} -t kelátolja, ezzel gátolva az aktivitását.^{196–198} Dolgozatomban a zselatináz aktivitással rendelkező MMP alcsalád MMP-2 és MMP-9 enzimeivel és az ezek gátlásában részt vevő TIMP-1 és TIMP-2-vel foglalkoztam részletesebben.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A felnőttkori szív- és érrendszeri betegségek kialakulásának hátterében jól ismert kockázati tényezőként említhetjük meg a dohányzást. A terhesség alatti dohányzás, az anya egészségi állapotára gyakorolt hatása mellett, nagyban befolyásolja a méh vérellátottságát, hatással van a magzat oxigén és tápanyag ellátottságára, így annak fejlődésére. A placenta által ki nem szűrt toxikus anyagoknak elsődlegesen a vér alakos elemei és a velük folyamatos fizikai kapcsolatban lévő ér endotélsejtek vannak kitéve. Az alakos elemek legnagyobb hányadát képező vörösvértestek általános szerepéről alkotott megítélésünk az utóbbi évtizedben jelentősen megváltozott. A klasszikus funkciók mellett egyre több meggyőző bizonyíték szól amellett, hogy jelentős szerepük lehet az endotél sejtek funkcionális szabályozásában is, és az endoteliális diszfunkció közvetítésében.

Párhuzamos munkáink során a magzati vörösvértest populáció részletes elemzése egyértelműen rámutatott az anyai dohányzás indukálta súlyos következményekre; megnövekedett a morfológiai variánsok száma, fokozódott a ROS képződés és a membránkárosodás mértéke, valamint jelentős visszaesést mutattunk ki a NO szintézis aktivitásában. Feltételezve, hogy a magzati vörösvértestek és az endotél sejtek között is fennáll egyfajta "intimate crosstalk" a vérsejtek károsodása alapján valószínűsíthető a köldökzsinór erek sérülése is, így az endoteliális diszfunkció kialakulása. A köldökzsinór erek a magzati keringés meghosszabbításának tekinthetők, fiziológiás állapotuk, annak bármilyen károsodása közvetlenül is kihat a magzati fejlődésre. Munkánk során feltételeztük, hogy a helytelen anyai életmód indukálhatja a köldökzsinór erek morfológiai és funkcionális jellemzőinek változását, mintegy lenyomatként jelezve a fejlődő magzatot ért káros hatásokat. Ennek megfelelően kerestük azokat a paramétereket, melyek korai nyomjelzőként szolgálhatnak, nem csupán a köldökzsinór ereket ért közvetlen károsodásra, hanem az újszülöttek vaszkuláris rendszerének általános állapotára is. Munkánk jelentőségét abban látjuk, hogy a szakirodalomban fellelhető főként méhlepényen, véren vagy *in vitro* sejt kultúrákon végzett kutatásokat kiegészíthetjük egy olyan megközelítéssel, ami teljes egészében az erek *in vivo* állapotát tükrözi, részletezve a molekuláris mechanizmusokat is.

Munkánk során a dohányos és nem-dohányos édesanyák újszülöttjeitől származó köldökzsínór artériák és vénák összehasonlító vizsgálatát tűztük ki célul. A projekt vázlatát, illetőleg főbb kérdéseit az alábbiak szerint foglaltuk össze:

1) A köldökzsínór erek tónusának szempontjából kulcsfontosságú NO termelést meghatározó/befolyásoló paraméterek vizsgálatával szerettünk volna választ kapni arra, hogy:

- Milyen különbségeket találunk a NOS3 expressziója, illetve aktivitásának szempontjából alapvető 1177-es SER foszforilációjában
- Az L-arginin szubsztrátért folytatott kompetíció ismeretében hogyan változik a stressz hatásra indukálódó ARG1 expresszió
- A NOS3-függő NO termelés sérülése esetén a NOS2 vagy a XOR figyelembe vehető-e lehetséges menekítő útvonalként
- Az előző pontok eredményei összefüggésbe hozhatóak-e az artériák és vénák eltérő mértékű toxikus kitettségével

2) Az endotéliális diszfunkció molekuláris hátterének vizsgálatával kerestük a választ arra, hogy:

- Milyen mértékű oxidatív/nitrozatív stresszt feltételezhetünk az endotél rétegben a központi szerepet betöltő $O_2^{\cdot -}$ anion *in situ* detektálása alapján
- Milyen mértékű membránkárosodást tapasztalunk a lipid peroxidációra utaló markerek vizsgálatával
- Hogyan változik a rendszer fehérjeinek nitrozatív stresszre utaló nitroziláltsági markere
- Milyen mértékben érinti az örökítőanyagot, így esetlegesen a transzkripciós mechanizmusokat a hosszú távú kitettség, illetve indukálódnak-e a DNS hibajavító mechanizmusai

3) A funkcióvesztéssel összefüggésbe hozható morfológiai eltérések vizsgálatával:

- Elemeztük, hogy az endotéliális diszfunkció milyen ultrastrukturális változásokkal jár együtt a sejtek szintjén
- Kerestük a választ arra, hogy a strukturális változások milyen mértékben köthetőek a TIMP-MMP rendszer működésének megváltozása
- Kíváncsiak voltunk arra, hogy a negatív irányú funkcionális és strukturális változások összefüggésbe hozhatóak-e az endotél sejtek életképességének populáció szintű csökkenésével

4) Kontroll és dohányos eredetű vénák akut stressz hatásra adott válaszreakciójának tanulmányozása során:

- Kíváncsiak voltunk arra, hogy általánosságban tapasztalunk-e különbségeket a mintacsoportok reakció készségében
- Vizsgáltuk, hogy a hőmérsékleti és nehézfém stresszt követően a hsp90 és metallothionein gének indukciója alapján feltételezhetünk-e a dohányos mintáink esetében nehézfém-specifikus adaptációt
- Kerestük a választ arra, hogy az akut stressz terhelés milyen mértékben indukálhatja a szövet strukturális dinamikáját befolyásoló MMP-TIMP rendszer egyes képviselőit

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Mintagyűjtés

A köldökzsinór mintákat Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikája bocsátotta a rendelkezésünkre. A mintaanyag feldolgozása a Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Regionális Humán Orvosbiológiai Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyásával (engedélyszám: 16/2016), a Helsinkai deklaráció által meghatározott irányelvek szerint, a tájékoztatott édesanyák hozzájárulásával történt.

Dolgozatomban olyan köldökzsinórokat használtunk, amelyek esetében az újszülött édesanyja „erős” dohányosnak számít, azaz a terhesség teljes ideje alatt naponta elszívott minimum 10 szál cigarettát ($n_D=12$). Kontrollként gesztációs hét szerint egyező „age-matched”, újszülöttektől származó mintákat használtunk fel ($n_K=12$) olyan terhességből ahol az édesanyák minden káros szenvedélytől mentesek voltak. A szigorúan rögzített kísérleti protokollunk alapján kizártunk minden olyan mintát a gyűjtés során, ahol: az anya nem töltötte be a 18. életévét, a gesztációs hetek száma nem érte el a 37-et, a terhesség során vagy közvetlenül utána fertőzés vagy gyulladásos állapot vagy a várandósság ideje alatt terhességi cukorbetegség alakult ki. További kizáró okok voltak (a teljesség igénye nélkül): magas vérnyomás, agyérkatasztrófa, érelmeszesedés, szívelégtelenség, tartós gyógyszeres kezelés, méhen belüli distressz, a magzatnál/újszülöttnél jelentkező fejlődési vagy genetikai rendellenességek. A köldökzsinór mintákat közvetlenül a világra jövetelt követően, hűtve a laboratóriumunkba szállítottuk, és előkészítettük a további felhasználásra.

4.2. Fagyasztott köldökzsinór metszetek és izolált HUVEC populáció fluoreszcens immunjelölése

A köldökzsinór minták ~ 1-2 cm-es darabját 0,9%-os (w/v) fiziológias sóoldattal leöblítettük, az erekből kimostuk a vért. A darabokat 4%-os (w/v) 0,05M-os foszfát pufferben (PB) oldott paraformaldehid oldatban fixáltuk, majd a metszet készítést megelőzően 30%-os (w/v) nátrium-aziddal (0,1 w/v%)

kiegészített szukróz oldattal krioprotekciót végeztünk. A mintákat Tissue-Tek O.C.T (Sakura Europe) médiumba ágyasztuk, majd 16 µm-es kriosztátos metszeteket készítettünk SuperFrost (Thermo Scientific) tárgylemezekre rögzítve. A lemezeket a további felhasználásig fagyasztva (-20/-80°C) tároltuk.

Az immunhisztokémiai módszer során, a szobahőmérsékleten „kiengedett” metszetekről először lemostuk a beágyazó médiumot, majd a szöveteket permeabilizáltuk PB-ben hígított 0,1%-os (v/v) Triton X-100 detergenssel. A nem specifikus antitestkötő helyeket PB-ben oldott 4%-os (w/v) marha szérum albumin, és 5%-os (w/v) normál kecske szérummal blokkoltuk. Az elsődleges és másodlagos ellenanyagokat egységesen 1:100, illetve 1:1000 arányban hígítottuk 1% (w/v) marha szérum albumint és 5% normál kecske szérumot tartalmazó PB-ben. Az elsődleges ellenanyagokkal egy éjszakán át nedves kamrában inkubáltuk a metszeteket 4°C-on, másnap pedig a PB-vel történő mosást követően a másodlagos ellenanyagokkal további 2 órán át, szobahőmérsékleten (**1. táblázat**). A sejtmagokat PB-ben oldott 1 µg/mL-es 4', 6-diamidino-2-phenylindollal (DAPI) jelöltük. A metszeteket Antifading BrightMount/Plus vízbázisú médiummal együtt fedtük le, és az eredményeket ZEISS LSM 880 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

A frissen izolált köldökszinór véna endotél sejteken (HUVEC) végzett immuncitokémia (ICC) módszert az IHC eredményeink kvantitatív megerősítésére használtuk. A statisztikailag releváns sejtmennyiség eléréséhez egy nagyobb (~8-10 cm) köldökszinór darab szükséges. Ezáltal az egy mintán belül vizsgálható paraméterek száma nagymértékben limitált az IHC módszeréhez képest. A sejtek izolálását mechanikai módszerrel végeztük, miután egy erre a célra speciálisan kialakított kapilláris kanült vezettünk be a köldökszinór véna lumenébe, aminek segítségével leválasztottuk az endotél sejtek rétegét. A sejteket 0,9%-os (w/v) fiziológiás sóoldatban szuszpendáltuk, és centrifugálással gyűjtöttük össze (4°C, 2,400g, 10 perc). Az ICC során használt protokoll és paraméterek az IHC-nál leírtakkal megegyezően történt. Az egyes lépések között a sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (4°C, 2,400g, 10 perc). A másodlagos ellenanyagokkal történő inkubációt követően a sejteket összegyűjtöttük, majd a csapadék méretétől függően 15-20 µL PB-ben

szuszpendáltuk fel őket. Az eredményeket kvantitatív áramlási citometriával (FACS) (BD FACSCalibur™, BD Biosciences) vizsgáltuk, és FlowJo™ szoftverrel értékeltük. A nyers adat eseményei közül a méret és denzitás (*ForwardSCatter* vs *SideSCatter*) alapján kijelöltük az endotél sejtek helyét.¹⁹⁹ A fluoreszcencia küszöbértékét a jelöletlen sejtuszuszenziók háttér fluoreszcenciája alapján határoztuk meg. Az izolált sejtpopuláció tisztaságát endotél specifikus anti-NOS3 és anti-von Willebrand-faktor kettős immunjelöléssel igazoltuk (1. táblázat).

Elsődleges ellenanyagok	Gazdafaj	Klonalitás	Hígítás	Gyártó	Referenciaszám
anti-3-NT (39B6)	egér	monoklonális	1:100	Abcam	ab61392
anti-4-HNE	egér	monoklonális	1:100	Abcam	ab48506
anti-ARG1 (C-2)	egér	monoklonális	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-166920
anti-CASP3 (hasított)	nyúl	poliklonális	1:100	Abcam	ab2302
anti-DNS PKcs (phospho S2056)	nyúl	poliklonális	1:100	Abcam	ab18192
anti-foszfo-NOS3 (pSER1177)	nyúl	poliklonális	1:100	Sigma-Aldrich	SAB4300128
anti-gamma H2A.X (phospho S139)	egér	monoklonális	1:100	Sigma-Aldrich	05636i
anti-MMP-2 (4D3)	egér	monoklonális	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-53630
anti-MMP-9 (2C3)	egér	monoklonális	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-21733
anti-NOS2 (C-11)	egér	monoklonális	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-7271
anti-NOS3 (A-9)	egér	monoklonális	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-376751
anti-TIMP-1 (G-6)	egér	monoklonális	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-365905
anti-TIMP-2 (3A4)	egér	monoklonális	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-21735
anti-vWF (F8/86)	egér	monoklonális	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-53466
anti-XOR (A-3)	egér	monoklonális	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-398548
Másodlagos ellenanyagok	Gazdafaj	Klonalitás	Hígítás	Gyártó	Referenciaszám
anti-egér IgG H&L (Alexa 488)	kecske	poliklonális	1:1000	Abcam	ab150113
anti-egér IgG H&L (Alexa 647)	kecske	poliklonális	1:1000	Abcam	ab150115
anti-nyúl IgG H&L (Alexa 488)	kecske	poliklonális	1:1000	Abcam	ab150077
anti-nyúl IgG H&L (Alexa 647)	kecske	poliklonális	1:1000	Abcam	ab150079

1. táblázat Az IHC és ICC során felhasznált elsődleges és másodlagos ellenanyagok

4.3. Konfokális mikroszkópia és a felvételek értékelése

A metszetek immunjelölésének eredményét Axiocam 503 mono kamerával felszerelt, ZEISS LSM 880 konfokális lézerpasztázó mikroszkóppal vizsgáltuk (Carl Zeiss Microscopy GmbH). A felvételeket Zen 2.1 (black) szoftverrel készítettük. A képkötés során az artériákról és a vénákról legalább 3-5 egymástól független látótérben készítettünk felvételeket a következő állandó paraméterekkel: 8-bites képek; objektív: Plan-Apochromat 40x/1.4 Oil DIC M27; gerjesztés: argon (488 nm) lézer Alexa 488 fluorofór és hélium-neon (633 nm) lézer az Alexa 647 fluorofór, illetve ultraibolya (405 nm) lézer a DAPI esetében. A detektor filter beállításait az egyes emissziós hullámhosszok alapján választottuk meg, elkerülve az egyes fluorofórok közötti átfolyást: Alexa 488 –

493 nm – 591 nm; Alexa 647 – 630 nm – 755 nm, DAPI – 410 nm – 479 nm, *pinhole: 1 airy unit.*

A felvételek szemikvantitatív értékelését ImageJ 1.50i szoftverrel (NIH, USA) végeztük.²⁰⁰ Ennek során a 8-bites kompozit képeket szétbontottuk az egyes ellenanyagoknak megfeleltethető csatornákra. Az endotél sejtek rétegét szabadkézzel jelöltük ki, és a szoftver egy előzetesen rögzített makró futtatásával elemezte a releváns jelrészecskéket. A kiértékelések során minden minta esetében ugyanazokat a rögzített makró paramétereket alkalmaztuk, amelyeket korábban a vizsgálati protokollunknak megfelelően optimalizáltunk. Ennek eredményeként megkaptuk azokat a releváns területeket, amelyeket az eredeti felvételekre rávetítve megmértük az átlag fluoreszcencia intenzitásokat (MFI). Ezeket az értékeket minden egyes látótér esetében normalizáltuk a minta autofluoreszcenciájára, amelyet öt egymástól és az antitest jelöléstől független terület kvantifikálásával kaptunk meg. Az adatokat MS® Excel-ben összesítettük, és a végeredményeket a kontroll mintáinkhoz viszonyítva adtuk meg.

A módszer nyilvánvaló szemikvantitatív hátrányaival tisztában vagyunk, ám figyelembe véve a klinikai minták mennyiségének korlátozottságát, a nagyszámú paraméter vizsgálata más megközelítésben nem lenne lehetséges. Ezt ellensúlyozza a kvantifikált régiók kielégítően nagy száma, amely így erősíti az eredményeink hitelességét. Továbbá a konfokális képalkotó eljárás lehetővé teszi, hogy specifikusan az endotél rétegre fókuszálhassunk. Mindazonáltal az IHC kiértékelési protokolljának hitelesítésére egy kisebb számú, reprezentatív mintacsoporton ICC-t követő FACS analízist végeztünk NOS3 és P-NOS3 specifikus immunjelöléssel.

4.4. A köldökzsínór erek teljes nitrogén–oxid származék (tNOx) tartalmának meghatározása Griess-reakcióval

Az artériákat és vénákat közvetlenül a laboratóriumba érkezést követően frissen izoláltuk, 4°C-on. Ezt követően az ereket folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd porítottuk. A port jéghideg 0,9%-os (w/v) fiziológiás sóoldatban homogenizáltuk, majd centrifugálással szabadultunk meg a

szövettermeléstől (4°C; 17,000g, 20 perc). A felülúszót a mérésig -80°C-on tároltuk.

A tNOx koncentráció meghatározásánál a Schmidt és Kelm által leírt módszert alkalmaztuk, kisebb módosításokkal.²⁰¹ A homogenizátum felülúszóját ötszöröse hígítottuk 100 mM-os EDTA vizes oldatával, majd a fehérjétől egy rövid, 75°C-os hőkezeléssel majd jégen hűtéssel szabadultunk meg. A csapadékot centrifugálással (4°C; 17,000g, 20 perc) üleptítettük. A felülúszóval dolgoztunk tovább, amelynek NO₃⁻ tartalmát 0,1 U/mL koncentrációjú nitrát-reduktáz enzimmel alakítottunk át NO₂⁻-té. Az enzim megfelelő működésének érdekében a reakció elegyünkhöz kofaktorként adtunk még 30 µM-os végkoncentrációban NADPH-t és 5 µM-os végkoncentrációban FAD-ot, majd 15 percen át inkubáltuk 37°C-os vízfürdőben. A reakciót 1 mM-os végkoncentrációjú kálium-ferricianiddal állítottuk le (37°C, 5 perc), amely oxidálta az enzimműködéshez szükséges kofaktorokat. Ezt követően a mintáinkat lehűtöttük és a protokoll végéig hűtve, fénytől védve dolgoztunk velük tovább. A diazo-só képzést 1 mM-os szulfanilamiddal végeztük, 0,6 M-nyi sósav jelenlétében. 10 perc elteltével a mintákat újból centrifugáltuk (4°C; 3,500g, 15 perc). A felülúszóval tovább dolgozva végeztük el az azokapcsolási reakciót 1mM-os N-(1-Naftil)etiléndiamin segítségével. Ugyanezt a sémát követve kalibrációs egyenest készítettünk 1 mM-os NaNO₂ törzsoldatból készített hígítási sorral (100 µM – 6,25 µM). A reakció utolsó lépésében keletkezett lila színű, stabil azo-vegyület fényelnyelését 540 nm-en mértük GENESYS 10S UV-Vis spektrofotométeren. A tNOx koncentrációkat a kalibrációs egyenes segítségével számoltuk ki, figyelembe véve a minták kezdeti hígítását. A végeredményeket a minták eredeti fehérje koncentrációjára vonatkoztatva adtuk meg (nmol/mg fehérje).²⁰²

4.5 A O₂⁻ *in situ* detektálása köldökzsínór metszeteken

A termelődött O₂⁻ mennyiségét dihidroetídium (DHE) (Invitrogen) felhasználásával követtük. A DHE egy olyan redox marker, amivel szemben a sejtek áteresztőek, a citoplazmában főként O₂⁻, illetve egyéb erős prooxidánsok hatására oxidálódik. Az így keletkezett termék a sejtmag DNS-be interkalálódva erős vörös fluoreszcenciát mutat. Kísérleteink során 10 µM-os koncentrációjú

DHE oldattal fedtük be a metszeteket, és 30 percen át inkubáltunk sötétben, 37°C-os nedves kamrában. Az inkubáció leteltével a lemezeket PB-vel mostuk, majd a lefedést követően rövid időn belül konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A módszer rutinszerű alkalmazását megelőző próbakísérletek során igazoltuk a DHE specificitását dietil-ditio-karbamát (DETCA) (Sigma Aldrich) előkezeléssel. A DETCA vegyület réz-kelátorként működik, ebből fakadóan gátolja a szövetek szuperoxid-dizmutáz aktivitását, aminek hatására megemelkedik a $O_2^{\cdot-}$ koncentráció. A teszteléshez egymást követő metszeteket inkubáltunk DETCA+PB-vel, illetve csak PB-vel 1 órán át sötétben, 37°C-os nedves kamrában. Ezt követően minden metszeten a fent részletezett módon alkalmaztuk a DHE-t.²⁰³

4.6. Transzmissziós elektronmikroszkópia

A köldökzsínórok egy-egy kisebb darabját felosztottuk az erek mentén, majd egy éjszakán át fixáltunk 4°C-on, 2% (w/v) paraformaldehid és 2% (v/v) glutáraldehid oldatában, majd ezt követően további egy órán át 1%-os (w/v) ozmium-tetroxidban. A szöveteket a pufferes mosást és felszálló alkohol sorban való dehidratálását követően Embed812 médiumba (Electron Microscopy Sciences) ágyaztunk. A blokkból félvékony (0,7 μ m) metszeteket készítettünk, amelyeken toluidin-kék festést követően mikroszkóp alatt kiválasztottuk az erek endotél rétegéhez tartozó területeket. Ezek alapján ultra-vékony (70 nm) metszetek készültek, amik nikkel lemezre rögzítettünk. A metszetek kontrasztosítását uranil-acetát és ólom-citrát alkalmazásával végeztük. A képalkotás és elemzés JEOL 1400 transzmissziós elektronmikroszkóppal történt.

4.7. Az endotél sejtek életképességének vizsgálata

Frissen izolált HUVEC sejteken viabilitási tesztet is végeztünk Annexin V-FITC Apoptosis Staining/Detection Kit (Abcam) segítségével, a gyártói utasításoknak megfelelően. Az izolálás során kapott szuszpenzió sejtjeit centrifugálással gyűjtöttük össze (4°C; 2,400g; 10 perc). A csapadékot 200 μ L gyártó által biztosított 1x pufferben szuszpendáltuk, majd hozzáadtunk 2 μ L Annexin V-FITC és 5 μ L propídium-jodidot. A szuszpenziót 5 percen át inkubáltuk szobahőn, fénytől védve. Az eredményt kvantitatív áramlási

citometriával (FACS) (BD FACSCalibur™, BD Biosciences) vizsgáltuk, és FlowJo™ szoftverrel értékeltük. A nyers adat eseményei közül a méret és denzitás (ForwardSCatter vs SideSCatter) alapján kijelöltük az endotél sejtek helyét. A fluoreszcencia küszöbértékét a jelöletlen sejtszuspenziók háttér fluoreszcenciája alapján határoztuk meg. Az apoptotikus és egészséges sejteket az FL-1 (FITC) és FL-3 (propídium-jodid) csatornák által kijelölt kvadránsokon belüli százalékos megoszlások alapján különítettük el.^{199,204}

4.8. Ex vivo reaktivitási teszt köldökszinór vénákon

A kontroll és dohányos csoportokból származó köldökszinór vénákat jégen izoláltuk a születést követő 1 órán belül. Az ereket 2-3 cm-es szakaszokra osztottuk, ezekből egy-egy darabot rögtön lefagyasztottunk folyékony nitrogénben. Később ezek szolgáltak az ex vivo kísérlet abszolút kezeletlen kontrolljainak. Az akut nehézfém terhelés modellezéséhez a véna darabokat 12-lyukú sejt kultúra plate-ekben inkubáltuk (5% CO₂ 37°C). A minták inkubálása a Dulbecco Modified Eagle Médiumban történt (DMEM - 4,5 g/L glükóz + L-glutamin) 0,5 ng/μL illetve 2,5 ng/μL- Cd²⁺, jelenlétében vagy a nélkül. A megfelelő Cd²⁺ koncentrációkat előzetes próbakísérletek és a csoportunk által korábban elvégzett hasonló kísérletek alapján határoztuk meg. A munkaadatok elkészítéséhez kadmium-acetát-dihidrát oldatot használtunk, a végkoncentrációkat a Cd²⁺-ra vonatkoztatva adtuk meg. A nehézfém terhelést 30 percen át végeztük, majd a véna darabokat tiszta DMEM-mel átöblítettük és további 30 percig inkubáltuk őket Cd²⁺-mentes médiumban. Azon szöveteket, amelyeket 1 órán keresztül inkubáltuk Cd²⁺-mentes DMEM-ben tekintettük a hősokkolt mintáknak. A kezelések végén az ereket folyékony nitrogénben fagyasztottunk, és az RNS izolálásig -80°C-on tároltuk őket.²⁰⁵

4.9. RNS kivonás, reverz transzkripció és valós idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR)

Az ex vivo kísérletből származó ereket folyékony nitrogénben porítottuk, és TRI-reagenssel (Zymo Research) homogenizáltuk, majd kétszer kloroformos extrahálást végeztünk, az egyes lépések között centrifugálással szétválasztva a fázisokat (szobahő, 17,000g, 20 perc). A felülúszó totál RNS tartalmát Direct-Zol RNA kit-tel (Zymo Research) nyertük ki a gyártói utasításoknak megfelelően,

amely magában foglalta a genomiális DNS eliminálást is. Az RNS oldat tisztaságát és koncentrációját NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (Thermo Scientific) ellenőriztük. A reverz transzkripciókat Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) utasításai végeztük, reakciónként 500 ng-nyi totál RNS-t és oligo(dT)₁₈ primert használtunk. A reakciókat 96-lyukú lemezekbe mértük össze 15 µL-ben. A fluoreszcens riporter SYBR green-t a Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix, Low Rox (Thermo Scientific) tartalmazta. Az RT-qPCR-hez az Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time rendszerét használtuk a következő programon: 95°C 10 perc, majd 40 ciklusnyi 15 másodperc 95°C-on és 60 másodperc 60°C-on. Az 1 ciklusnyi disszociációs szakasz (15 másodperc 95°C-on, 60 másodperc 60°C-on, 15 másodperc 95°C-on, végül 15 másodperc 60°C-on) jelezte a célgén-primer specificitást. Az áttörési küszöbértékeket (Ct) a 18SrRNS belső kontrollra normalizáltuk és az mRNS szintek változását a $\Delta\Delta C_t$ módszerrel számoltuk ki.²⁰⁶ Az amplifikált termékek méretét 2%-os (w/v) agaróz gélen ellenőriztük.

Primer	Forward (5' → 3')	Reverz (5' → 3')
18S rRNS	GAAACGGCTACCACATCCAAGG	CCGCTCCCAAGATCCAACACTACG
HSP90 α	CCGTTTCTGAGAAGCAGGGCA	CCTTGGCTCTGTCTGAAGGC
MMP-9 HS_7	CGCAGACATCGTCATCCAGT	AACCGAGTTGGAACACGAC
MT1E_HS	CATTCTGCTTTCCAACCTGCCTG	GCAGCWCTTCTTGCAAGGAGG
MT2A_HS	CAACTGCTCCTGCGCCG	CAGCAGCTGCACTTGTCCG
MT3_HS	CTCCTGCAAGTGCGAGGG	GCCTCAGCTGCCTCTCCG
TIMP-1 HS_4	TGTGAGGAATGCACAGTGTTT	CGGGACTGGAAGCCCTTTTC

2. táblázat Az RT-qPCR-hez használt primer szekvenciák

4.10. Statisztika és az eredmények ábrázolása

A statisztikai analíziseket és a grafikonokat GraphPad Prism 6.00 szoftverrel végeztük. Az IHC eredményeinek statisztikai analízisét az eredetileg kvantifikált, nem normalizált értékeken végeztük el. Az adatsorokat, melyek a szemikvantitált IHC-ből, a DHE mérésekből és a tNOx koncentrációkból származnak párosítatlan t-próba és Mann-Whitney *post-hoc* teszttel értékeltük. A viabilitás tesztek esetén csoportosított, 2 szempontos variancia analízist (ANOVA) és Holm-Sidak *post hoc* tesztet alkalmaztunk. Az RT-qPCR

eredményeinek statisztikai elemzését a ΔC_t értékeken végeztük el, és ebben az esetben egyszempontos variancia analízist (ANOVA) és Tukey *post hoc* tesztet használtunk. A különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$ and $****p \leq 0.0001$.

5. EREDMÉNYEK

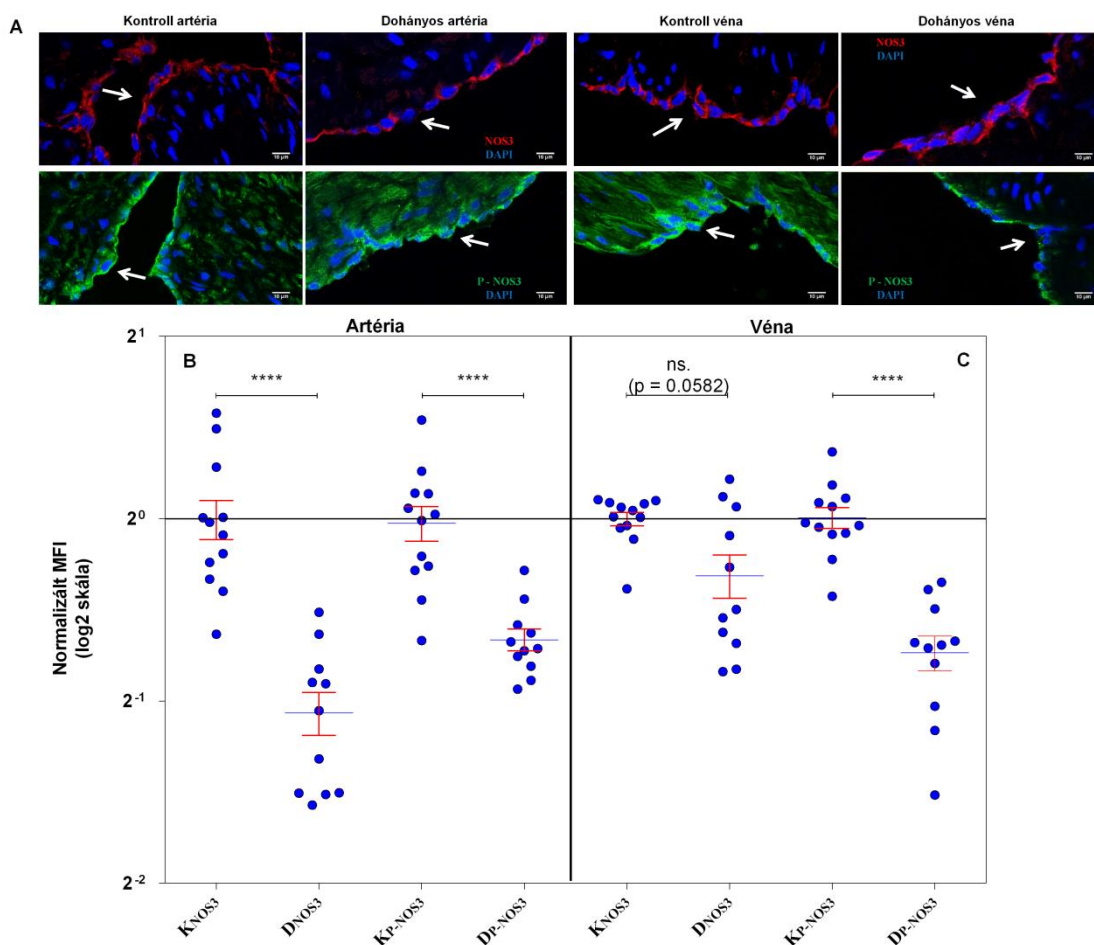
5.1. Az anyai dohányzással összefüggésbe hozható ED-hoz vezető útvonalak karakterizálása a köldökszínér ereken

A dohányzással összefüggésbe hozható károsító hatások közvetlen / közvetett módon kihathatnak a méhen belüli fejlődésre is. Az ED-t körvonalazó NO hiányhoz számos molekuláris mechanizmus hibás működése hozzájárulhat, melyek közül kiemelten fontos a NOS3 és interakcióinak vizsgálata.

5.1.1. NOS3-függő NO szintézis csökkenése oxidatív stressz körülmények között

A köldökszínér erek nem rendelkeznek beidegzéssel, ennél fogva az endotél sejtek NOS3 függő NO termelése kulcsfontosságú az értónus szabályozásában, a magzati fejlődéshez szükséges megfelelő tápanyag és oxigén ellátáshoz. A NOS3 expressziója és az aktivitásához szükséges SER1177-es foszforiláció (P-NOS3) követésével a NO szintézis hatékonyságára tudunk következtetni. Munkánk során a NOS3 mennyiségének és foszforilációs szintjének meghatározására specifikus immunjelölést alkalmaztunk fagyasztott köldökszínér metszeteken (**6. ábra, A panel**). Az eredményeinket az endotél rétegre vonatkoztatva, kontroll (n=12) – dohányos (n=12), illetve artéria – véna viszonylatban értékeltük.

Általánosságban azt tapasztaltuk, hogy dohányos mintáink esetében mind a NOS3 expresszió, mind pedig annak foszforilációja csökkent a kontrollokhoz viszonyítva. Ezen belül artériák esetében a NOS3 fehérje szinten egy drasztikus, hozzávetőlegesen 55%-os csökkentést mutatott, mialatt a vénákban ez a tendencia nem volt szignifikánsnak tekinthető (~2%) (**6. ábra, B panel**). A SER1177-es aktiváló foszforiláció vizsgálata során a dohányos artériák esetében 37%-os, a vénák esetében pedig 45%-os visszaesést tapasztaltunk a kontroll mintákhoz viszonyítva (**6. ábra, C panel**).

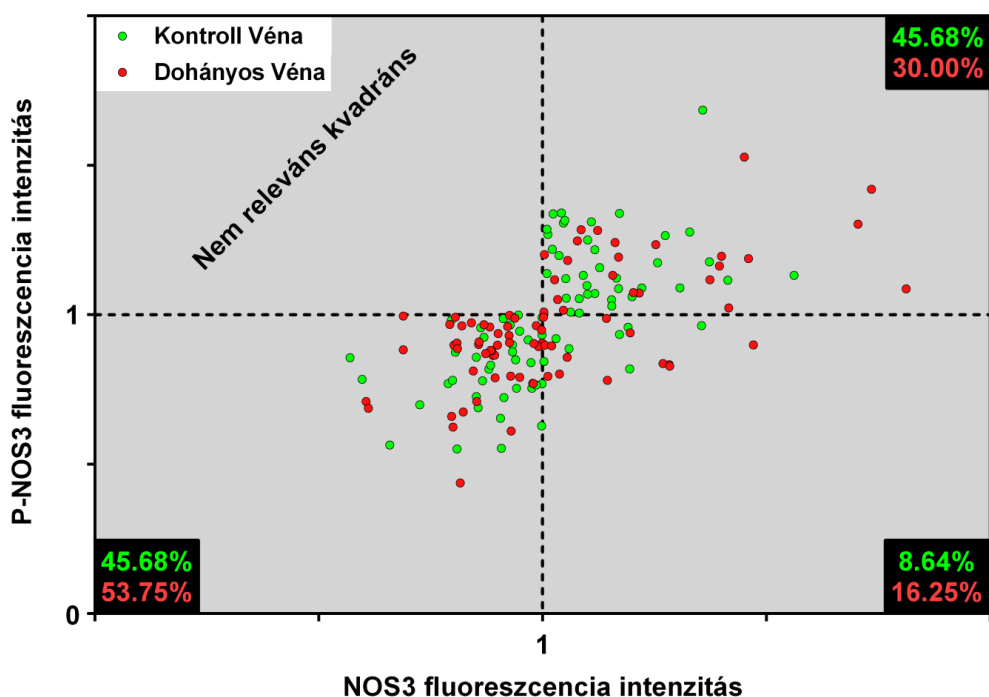


6. ábra A NOS3 és foszforilációjának alakulása kontroll és dohányos eredetű köldökzsinór ereken.

Reprezentatív konfokális felvételek kontroll és dohányos artériák és vénák NOS3 / P-NOS3 immunjelölését követően (A). A fehér nyilak mutatják az endothél réteget, a lépték 10 μ m. Ellenanyagok: monoklonális egér anti – NOS3 (1:100), poliklonális nyúl anti – P-NOS3, illetve Alexa 647 (vörös) és Alexa 488 (zöld) konjugáltatott anti-egér/nyúl IgG másodlagos ellenanyagok (1:1000). A sejtmagokat DAPI (kék) jelöli. Az immunjelölések összesített eredményének grafikus reprezentációja az átlag fluoreszcencia intenzitások (MFI) eltéréseit mutatja a kontroll – dohányos minták artériái (B), illetve vénái (C) között log2-es skála mentén (átlag $\pm$ SEM). A grafikon egy-egy pontja egymástól független mintákat jelöl. Az egymástól független kvantifikált régiók és a minták száma: K_{NOS3} (n = 95 artéria és 112 véna régió, 12 mintából); D_{NOS3} (n = 53 artéria és 102 véna régió, 11 mintából); K_{P-NOS3} (n = 42 artéria és 82 véna régió, 12 mintából); D_{P-NOS3} (n = 46 artéria és 67 véna régió, 11 mintából). Statisztika: párosítatlan t-próba és Mann-Whitney *post-hoc* teszt. (ns. = nem szignifikáns, ****p $\leq$ 0,0001).

Ezen eredményeink képezik a dolgozat alapját, ezért szerettük volna ezt más megközelítésekkel is alátámasztani. A továbbiakban elsődlegesen a vénákra fókuszáltunk. Ennek oka, hogy a vénák állapota kulcsfontosságú a

magzati fejlődés szempontjából, és a károsító hatásoknak közvetlenül kitettek. További kontroll (n=6) és dohányos (n=5) minták metszetein kettős immunjelölést alkalmaztunk (NOS3 – P-NOS3). Az endotél rétegre vonatkoztatott átlag fluoreszcencia intenzitásokat mintánként meghatároztuk, és a kvantifikált régiók egyéni eltéréseit vizsgáltuk és ábrázoltuk, NOS3 – P-NOS3 értékpárokat kialakítva. Az értékpárok az adott régió NOS3 értékeihez tartozó P-NOS3 változásokat mutatják (7. ábra).



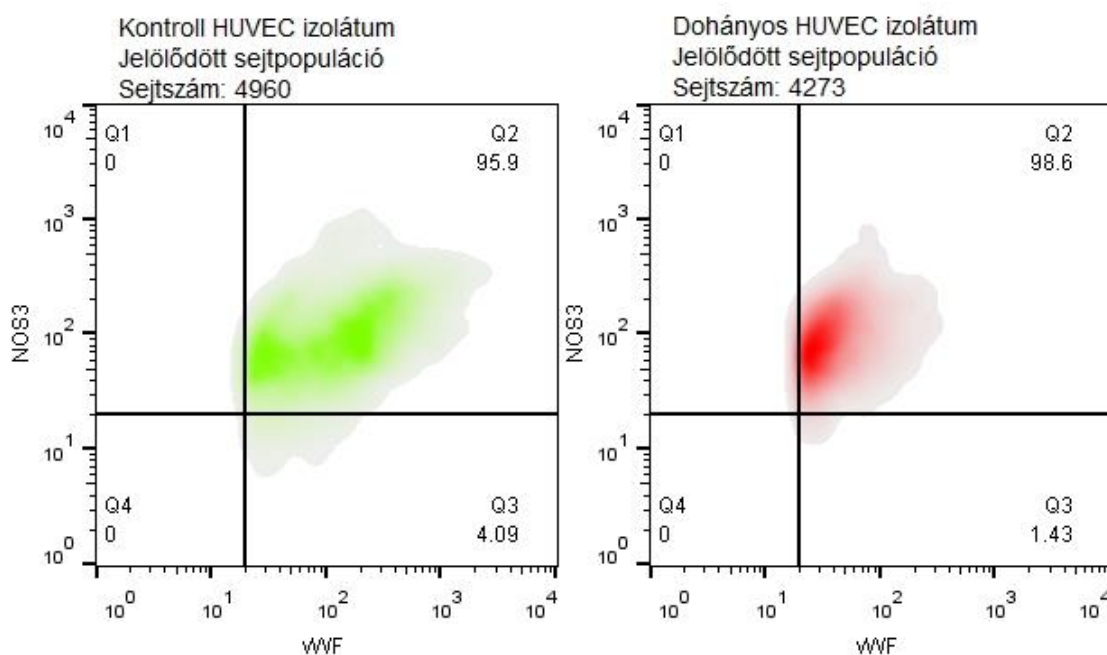
7. ábra Az egyes régiókra lebontott NOS3 pozitív területek és azok foszforilációjának átlaghoz viszonyított eloszlása kontroll és dohányos eredetű köldökszínór vénákban.

Felhasznált ellenanyagok: monoklonális egér anti – NOS3 (1:100), poliklonális nyúl anti – P-NOS3, illetve Alexa 647 és Alexa 488 konjugáltatott anti-egér/nyúl IgG másodlagos ellenanyagok (1:1000). Az immunjelölések összesített eredményének grafikus reprezentációja az egyedi régiók fluoreszcencia intenzitás átlagtól való eltéréseit mutatja a kontroll (zöld) és dohányos (vörös) vénákban. A grafikon egy-egy pontja az egymástól független régiók NOS3 – P-NOS3 értékpárjait mutatja. A kvadráns határokat az átlag érték = 1 jelöli, és az egyes negyedekbe eső pontok gyakorisága %-osan van kifejezve. Az egymástól független kvantifikált régiók és a minták száma: K_{NOS3} (n = 115 régió, 6 mintából); D_{NOS3} (n = 102 régió, 5 mintából); K_{P-NOS3} (n = 115 régió, 6 mintából); D_{P-NOS3} (n = 102 régió, 5 mintából).

A két paraméter szoros kapcsolata miatt az együttesen változó tendenciákat vettük figyelembe. Ennek értelmében a NOS3 növekedésének vagy csökkenésének függvényében vizsgálható a foszforiláció szintje. Az önmagában átlag felettinek minősülő P-NOS3 értékek ebben az elrendezésben nem értelmezhetőek. Az eredmények azt mutatják, hogy a kontroll minták egyedi régióiban az értékpárok azonos mértékben oszlanak el az átlagérték felett / alatt (~46 – 46%). Ezzel szemben a dohányos mintáink esetében az értékpárok megoszlása inkább az átlag alatti értékek felé tolódik el. Ennek következtében az értékpárok ~54 – 30 %-os arányban oszlanak meg. Továbbá látható, hogy a dohányos minták esetében az átlagot meghaladó NOS3 pozitív területek alul-foszforiláltsága közel kétszer gyakoribb a kontroll mintákhoz viszonyítva (~16% - 9%) (**7. ábra**). A továbbiakban kíváncsiak voltunk arra is, hogy a két mintacsoportban a NOS3 és foszforiláltságának aránya hogyan alakul az endotél populáció egyedi sejtjeit vizsgálva.

Az IHC eredmények kiértékelésekre használt protokollunk lehetővé teszi, hogy specifikusan az endotél rétegre vonatkozó adatokat nyerhessük ki. Hátránya azonban, hogy a módszert önmagában szemikvantitatívnak kell tekinteni. Annak igazolására, hogy a megközelítésünk helyes és reprodukálható. 3 kontroll és 2 dohányos minta bevonásával HUVEC izolálást végeztünk. Az izolált sejteket ICC-t követő FACS analízisre használtuk fel. Ezen folyamat módszertani hátránya, hogy az izolálással kinyert sejtszuspenzióba kerülhetnek az eredményt negatívan befolyásoló egyéb sejtípusok is (pl. vörösvértestek, simaizom sejtek). További hátránya a módszernek a fizikai korlátozottság. A FACS analízis statisztikai értékeléséhez szükséges sejtszám eléréséhez egy nagyobb méretű köldökzsínór darab szükséges. Ezáltal az egy mintán vizsgálható paraméterek száma limitáltabb, mint az IHC esetén. Az izolált sejtszuspenzió tisztaságát kettős immunjelöléssel igazoltuk. Az ICC során alkalmazott endotél-specifikus anti – vWF és anti – NOS3 ellenanyagok együttes használatával a kettős pozitív események nagy biztonsággal jelölik ki az endotél populációt. Az eseményeken belül először kijelöltük az endotél sejtek hozzávetőleges méretének megfelelő területet (SSC vs. FSC), majd meghatároztuk az autofluoreszcencia küszöbértékét. Az ellenanyagoknak

megfeleltethető fluoreszcencia intenzitásokat vWF-NOS3 citogramon ábrázoltuk (8. ábra).



8. ábra Köldökszinór vénából izolált sejtpopuláció tisztaságának ellenőrzése endotél-specifikus markerekkel.

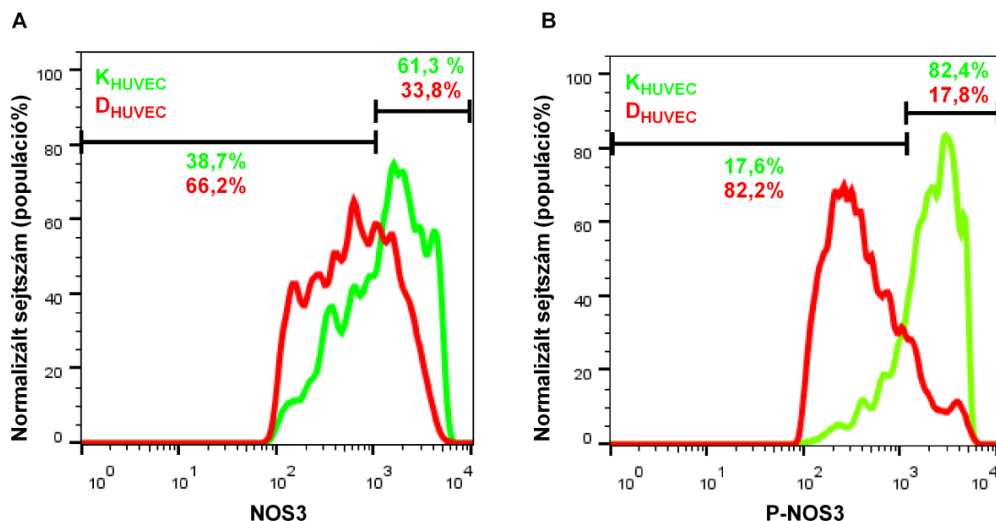
Felhasznált ellenanyagok: monoklonális egér anti – von Willebrand factor (1:100), monoklonális egér anti – NOS3, illetve Alexa 488 és Alexa 647 konjugáltatott anti-egér/nyúl IgG másodlagos ellenanyagok (1:1000). Az ICC-t követő FACS analízis eredményét a citogramok mutatják, a kontroll (zöld) és dohányos (vörös) vénából származó sejtsuszpenzióknak megfelelően. Az ábrák X és Y tengelyein az adott ellenanyagnak megfelelő fluoreszcencia intenzitásokat jelöli. A kvadráns határokat egy jelöletlen minta autofluoreszcenciája alapján határoztuk meg.

Mintaszám: Kontroll (n = 3); Dohányos (n = 2).

Az eredmények alapján láthatjuk, hogy a kettős pozitív sejtek (Q2 kvadráns) az immunjelölt sejtek több mint 90%-át teszik ki mind a kontroll, mind a dohányos mintánkban. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy az általunk alkalmazott HUVEC izolálási módszerrel nyert sejtsuszpenzió tiszta endotél populációként kezelhető. Mindemellett a sejtszámok (~5000 – 4000) is megfelelnek annak, hogy releváns következtetéseket vonhassunk le.

Ezt a HUVEC izolálási protokollt rutinszerűen alkalmazva, további 2 kontroll és 2 dohányos mintát készítettünk elő ICC-re és FACS analízisre, NOS3 és P-NOS3 specifikus kettős jelöléssel. Ahogy korábban is, egy

párhuzamosan kezelt, jelöletlen mintát használtunk a sejtek autofluoreszcenciájának megállapítására (intenzitás $< 10^2$). A NOS3 – P-NOS3 jelölt endotélsejt populáció kiértékelése során önkényesen, 10^3 intenzitás értéknél választottuk meg az alacsony és magas NOS3 expresszió és foszforiláltság határát (**9. ábra**). A NOS3 expresszió esetében azt tapasztaltuk, hogy a kontroll mintákból (n=2) származó véna endotél sejtek túlnyomó többsége „magasan” (~61%) expresszáló, és alig több mint egyharmaduk (~39%) mutat gyengébb NOS3 kifejeződést. A dohányos mintákban (n=2) ennek épp az ellenkezőjét tapasztaltuk, ahol a NOS3-at gyengén expresszáló sejtek voltak túlnyomó többségben (~66%) (**9. ábra, A panel**). A P-NOS3 tekintetében ennél nagyobb aránybeli eltolódást figyeltünk meg. A kontroll endotél sejtek NOS3 populációjának, kb. 82%-a tekinthető teljes mértékben foszforiláltnak, azaz aktívnak, és csak ~18%-uk alul-foszforilált. Ezzel szemben a dohányos endotél populációban ennek az aránynak épp a fordítottját láthatjuk, ahol a NOS3 pozitív sejtek többsége (~82%) alul-foszforilált, és csak ~18%-uk utal kifejezett aktivitásra (**9. ábra, B panel**).



9. ábra A NOS3 expresszió és a foszforiláltsági szint vizsgálata izolált HUVEC populáción

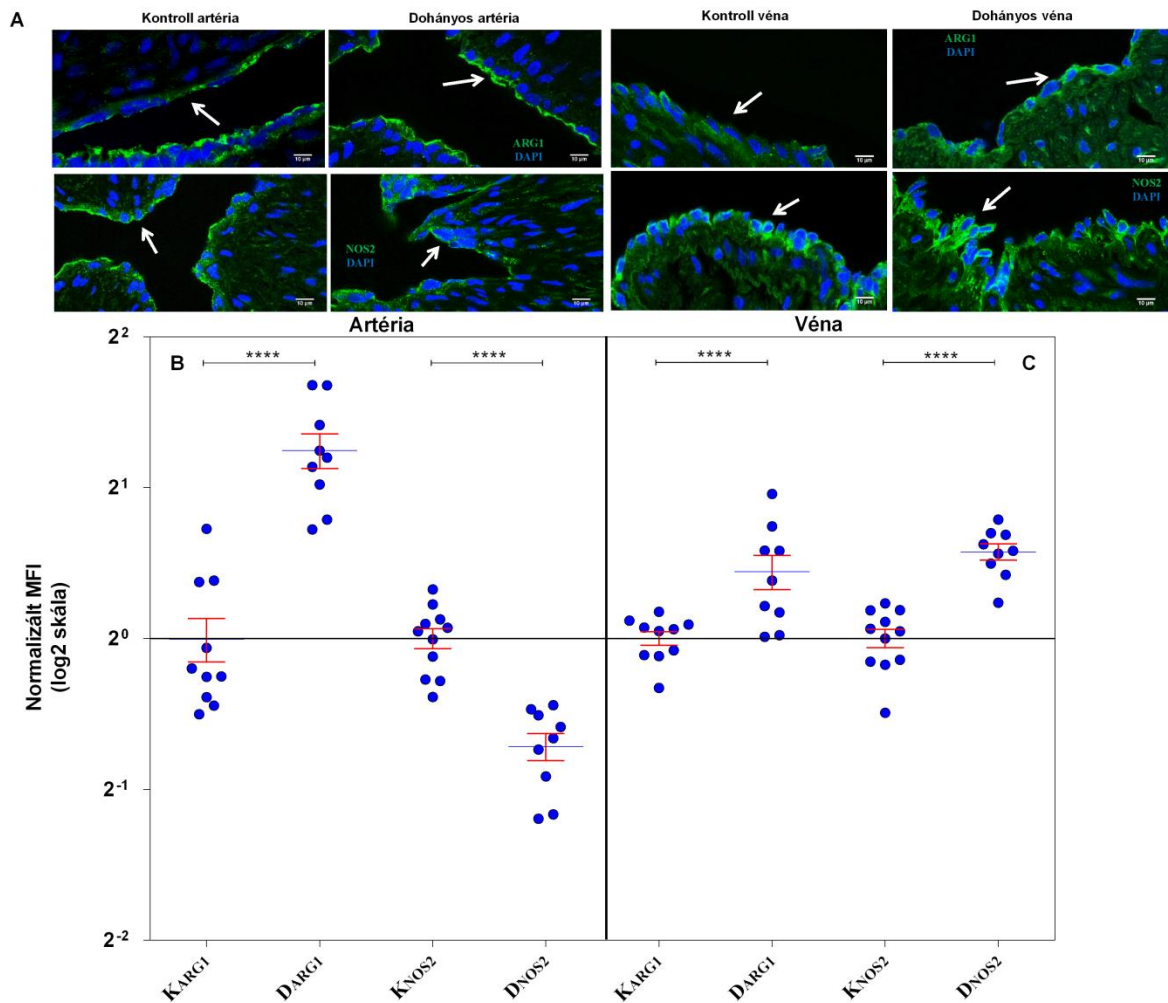
Felhasznált ellenanyagok: **(A)** monoklonális egér anti – NOS3 (1:100), **(B)** poliklonális egér anti – P-NOS3, illetve Alexa 488 és Alexa 647 konjugáltatott anti-egér/nyúl IgG másodlagos ellenanyagok (1:1000). Az ICC-t követő FACS analízis eredményét a citogramok mutatják, a kontroll (zöld) és dohányos (vörös) vénákból származó sejtszuszpenzióknak megfelelően. Az ábrák X tengelyei az adott ellenanyagnak megfelelő fluoreszcencia intenzitásokat jelöli, az Y tengely pedig az adott intenzitásokhoz rendelhető sejtszám %-os megoszlását. A kvadráns határokat egy jelöletlen minta autofluoreszcenciája alapján határoztuk meg. Mintaszám: kontroll (n = 2); dohányos (n = 2).

Ezen adatok megerősítik az IHC során kapott eredményeinket. Ez előrevetíti, hogy a kiemelt szereppel rendelkező köldökzsínór vénák csökkent NO termelésének hátterében a NOS3 expressziója és az enzim foszforilációja egyaránt sérül. Mivel mind a NOS3 és annak foszforilációja elsődlegesen határozza meg a bioaktív NO mennyiségét, így ezen eredményeink alapján a következő kijelentéseket tehetjük. A dohányos eredetű köldökzsínór mintáinkban, az artériákban és a vénákban egyaránt több szinten is sérül a NOS3 függő NO szintézis útvonal. A változások egyfajta ér specifikusságot mutatnak. Az artériák esetében láthatjuk, hogy a NOS3 fehérje mennyisége nagymértékben lecsökken, de a foszforilációs útvonal valószínűleg aktívnak tekinthető. Ezzel szemben a vénák esetében a csökkent NO termelés hátterében leginkább foszforilációért felelős útvonal sérülése áll.

5.1.2. A NO szintézist befolyásoló egyéb enzimek szerepének vizsgálata

A NOS3 és annak foszforilációjával párhuzamosan vizsgáltuk az ARG1 és NOS2 enzimek expresszióját kontroll (n=10-11) és dohányos (n=9-9) eredetű köldökzsínór metszeteken (**10. ábra, A panel**). Mindkét enzim jelentős hatással bír a NO szint alakulására oxidatív stresszes körülmények között. Az előbbi egy kompetitív szereplőnek tekinthető, amely elvonja a NOS3 L – arginin szubsztrátját. Az utóbbi pedig viszonylag rövid idő alatt képes nagy mennyiségű NO termelésére, amelynek inkább patológiás jelentőség tulajdonítható, és gyakori különböző CVD kórképek esetében.

A specifikus immunjelölések eredményeként azt találtuk, hogy a dohányos artériák endotél rétegének esetében az ARG1 szintje nagymértékben, közel 130%-al emelkedett a kontrollhoz képest (**10. ábra, B panel**). Ezzel párhuzamosan a NOS2 expresszió hozzávetőlegesen 40%-os csökkenést mutat. A vénák esetében azt tapasztaltuk, hogy mindkét fehérje jelenléte kifejezettebb, és közel azonos mértékben emelkedett a szintjük. A kontroll vénákhoz viszonyítva az ARG1 esetében 40%-os, míg a NOS2 esetében 50%-os növekedést tapasztaltunk (**10. ábra, C panel**).



10. ábra Az ARG1 és NOS2 expressziója kontroll és dohányos eredetű köldökzsínór ereken

Reprezentatív konfokális felvételek kontroll és dohányos artériák és vénák ARG1 NOS2 immunjelölését követően **(A)**. A fehér nyilak mutatják az endotél réteget, a lépték 10 μ m. Ellenanyagok: monoklonális egér anti – NOS3 (1:100), monoklonális egér anti – NOS2, illetve Alexa 488 (zöld) konjugáltatott anti-egér IgG másodlagos ellenanyagok (1:1000). A sejtmagokat DAPI (kék) jelöli. Az immunjelölések összesített eredményének grafikus reprezentációja az átlag fluoreszcencia intenzitások (MFI) eltéréseit mutatja a kontroll – dohányos minták artériái **(B)**, illetve vénái **(C)** között log2-es skála mentén (átlag $\pm$ SEM). A grafikon egy-egy pontja egymástól független mintákat jelöl. Az egymástól független kvantifikált régiók és a minták száma: **K_{ARG1}** (n = 77 artéria és 781 véna régió, 10 mintából); **D_{ARG1}** (n = 64 artéria és 732 véna régió, 9 mintából); **K_{NOS2}** (n = 211 artéria és 130 véna régió, 11 mintából); **D_{NOS2}** (n = 100 artéria és 243 véna régió, 9 mintából). Statisztika: párosítatlan t-próba és Mann-Whitney *post-hoc* teszt. (**** p $\leq$ 0,0001).

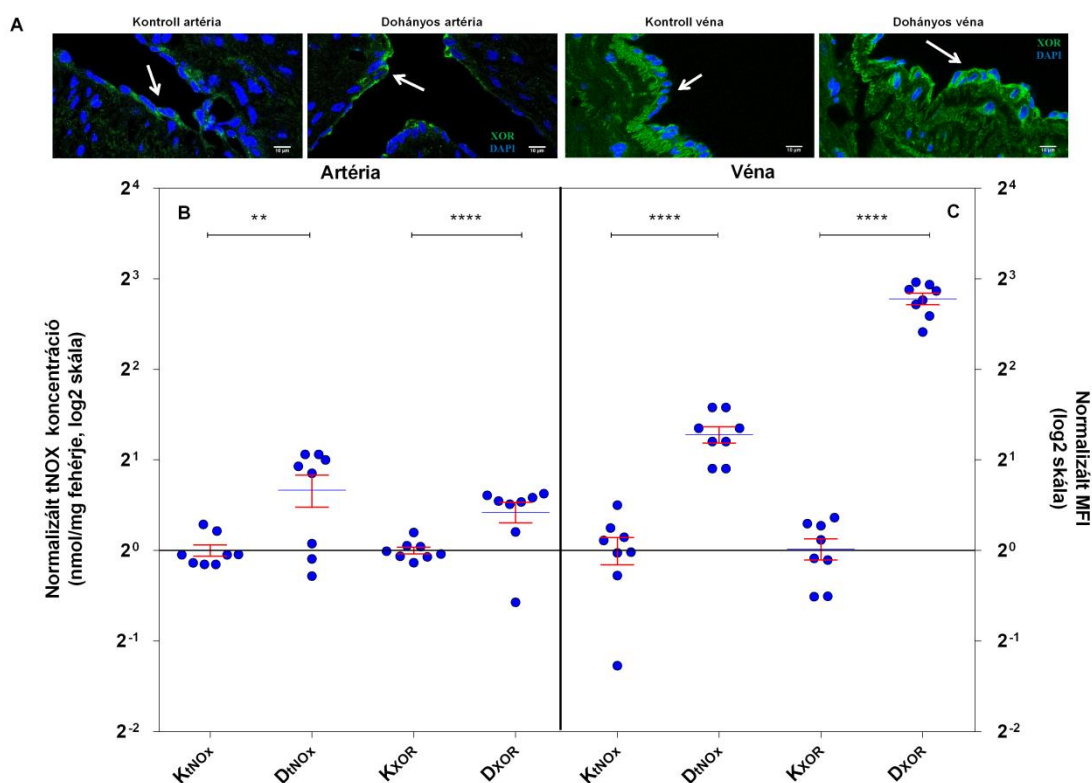
Ezen adatok tovább erősítik azt a feltételezésünket, hogy a NOS3 függő NO termelés szabályozás stressz hatás alatt ér specifikus változásokat mutat a

rendszerünkben. Továbbá láthatjuk, hogy a NOS3 tulajdonságain felül a köldökzsínór erek endotél sejtjeinek NO-hoz kapcsolódó szabályozása több szinten is érintett lehet.

5.1.3. A XOR lehetséges szerepe a NOS független NO szintézisben és az ED kompenzációjában

Az előző eredményeink alapján láthatjuk, hogy a sérült NO szintézis a köldökzsínór erek ED-ra utal. Hosszútávon fennálló ED esetben hipoxiás környezet alakul ki. NOS3 és NOS2 enzimek működése teljes mértékben O₂ függő, tehát oxidációs folyamat. Emiatt feltételezzük, hogy a rendszerben aktiválódhatnak olyan menekítő útvonalak is, ahol a NO szintézise a NOS izoformáktól független redukciós folyamatok eredménye. Ennek bizonyítására munkánk során vizsgáltuk a kontroll (n=8) és dohányos (n=8) mintákból készült metszetek endotéliális XOR expresszióját és az erek tNOx tartalmát teljes ér homogenizátumokban (**11. ábra**).

A tNOx mérések azt mutatták, hogy a kontrollhoz viszonyítva a dohányos mintáink esetében, mind az artériában, mind pedig a vénában növekedett a nitrogén oxid származékok mennyisége. A két értípus között azonban jelentős különbségeket tapasztaltunk. Az artériák tNOx tartalma 65%-os, a vénáké pedig mintegy 140%-os növekedést mutatott. Ennek megfelelően a XOR expresszió tekintetében is növekvő tendenciákat tapasztaltunk. A kontroll mintákhoz viszonyítva a dohányos artériák endotéliális régiójában 30%-os volt, míg a vénák esetében ez a növekedés elérte az 580%-ot (**11. ábra B és C panel**).



11. ábra A nitrogén – oxid származékok koncentrációja és a XOR expressziója kontroll és dohányos eredetű köldökzsínör ereken

Reprezentatív konfokális felvételek kontroll és dohányos artériák és vénák XOR immunjelölést követően **(A)**. A fehér nyilak mutatják az endotél réteget, a lépték 10 μ m. Ellenanyagok: monoklonális egér anti – XOR (1:100), illetve Alexa 488 (zöld) konjugáltatott anti-egér IgG másodlagos ellenanyag (1:1000). A sejtmagokat DAPI (kék) jelöli. Az immunjelölések és tNOx koncentrációk összesített eredményének grafikus reprezentációja az átlag fluoreszcencia intenzitások (MFI) és a fehérjére normalizált tNOx koncentrációk eltéréseit mutatja a kontroll – dohányos minták artériái **(B)**, illetve vénái **(C)** között, log2-es skála mentén (átlag $\pm$ SEM). A grafikon egy-egy pontja egymástól független mintákat jelöl. Az egymástól független kvantifikált régiók és a minták száma: K_{XOR} (n = 44 artéria és 83 véna régió, 8 mintából); D_{XOR} (n = 33 artéria és 19 véna régió, 8 mintából); K_{tNOx} (n = 8 minta, 3 párhuzamos mérés); D_{tNOx} (n = 8 minta, 3 párhuzamos mérés). Statisztika: párosítatlan t-próba és Mann-Whitney *post-hoc* teszt. (** P $\leq$ 0,01; **** P $\leq$ 0,0001).

A XOR rendelkezik olyan aktivitással, amely lehetővé teszi az inorganikus NO_2^- / NO_3^- biológiailag hasznos NO-á történő redukcióját. Ennek előfeltétele egy relatíve hipoxiás környezet, illetve a reakcióhoz szükséges, elégséges mennyiségű szubsztrát (tNOx) jelenléte. A kapott eredmények alapján feltételezzük, hogy ebben a speciális esetben a XOR szerepe egyfajta menekítést jelent a NOS3 függő NO termelés sérülése esetén.

5.2. Az ED következményeinek / kialakulásának molekuláris háttere

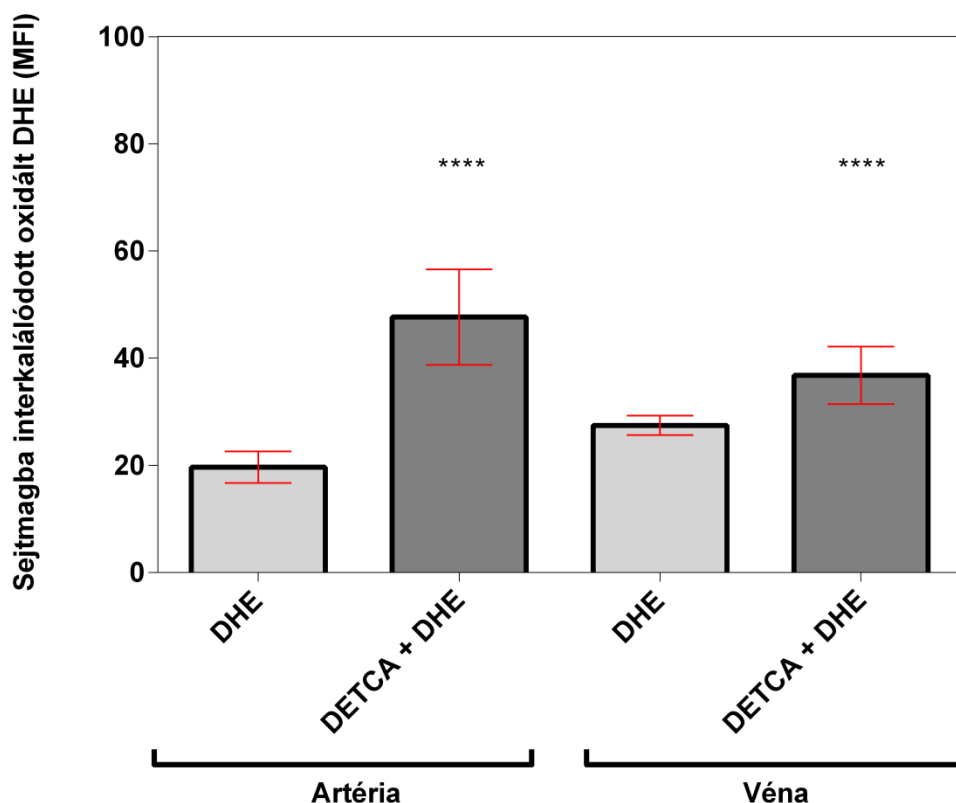
Az ED kialakulása szoros kapcsolatban áll a megnövekedett oxidatív / nitrozatív stresszel. Ez az állapot egyfajta ok és okozati összefüggésként jelenik meg egy hosszabb távú kitettség során. A normál biológiai folyamatok patológiás működésének hátterében pedig a makromolekulák károsodásának nyomait lehet felfedezni.

5.2.1. A $O_2^{\cdot-}$ *in situ* detektálása endotél sejtekben

A $O_2^{\cdot-}$ jelenléte és túlzott felszaporodása a molekuláris stressz egyik alap kiinduló pontja. Nagyfokú reaktivitása miatt számos más gyökös tulajdonságú molekula képződését iniciálja, így közvetve és közvetlenül is károsítja a lipideket, fehérjéket vagy az örökítő anyagot.

A $O_2^{\cdot-}$ követésére DHE-t alkalmaztunk. A DHE, mint redox indikátor vegyület nagyfokú specificitást mutat a $O_2^{\cdot-}$ jelenlétére, azonban irodalmi adatok alapján a H_2O_2 jelenlétére is érzékeny. Első lépésként szerettük volna igazolni a vegyület specificitását. Ehhez a DHE alkalmazását megelőzően DETCA kezelést végeztünk a metszeteken. Ez a vegyület szelektíven blokkolja a szövetek SOD enzimeinek aktivitását, így emelve azok $O_2^{\cdot-}$ tartalmát. A minták (n=2) konszekutív metszetein pedig csak DHE-t használtunk.

A kiértékelés során a sejtmagba (DNS) interkalálódott DHE fluoreszcencia intenzitását kvantifikáltuk a különböző kezelési csoportokban (12. ábra). Az eredményeink azt mutatják, hogy a DETCA előkezelés hatására a DHE oxidációja szignifikánsan megnövekedett a mintáinkban, összevetve azokkal ahol a DHE csak önmagában alkalmaztuk. Ezen eredményeink alapján a DHE használatát specifikus megközelítésnek találtuk, és a továbbiakban nagy számú mintán alkalmaztuk.

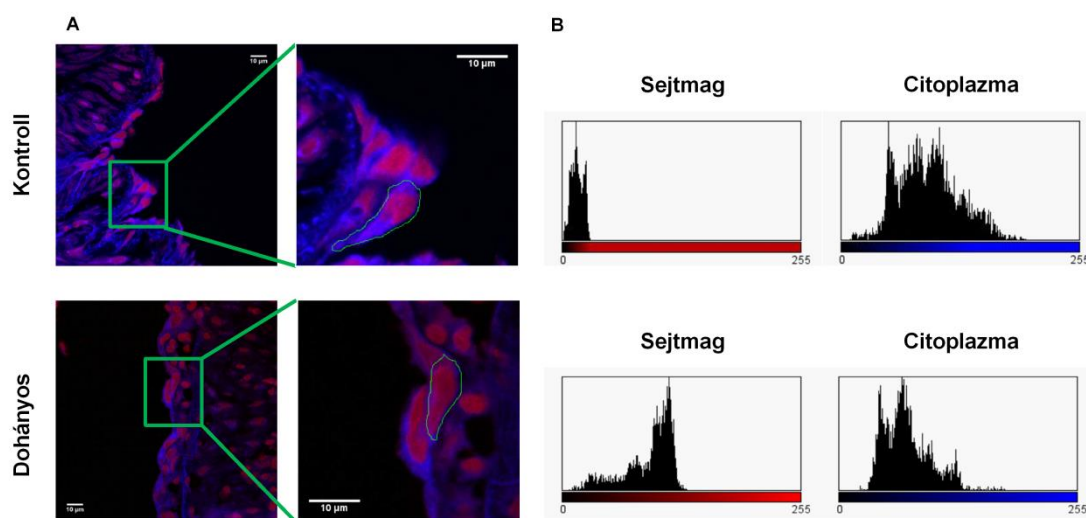


12. ábra A DHE specificitásának vizsgálata köldökzsínór ereken SOD inhibitor nélkül, illetve annak jelenlétében

A sejtmagi DNS-be interkalálódott oxidált DHE fluoreszcencia intenzitás összesített eredményének grafikus reprezentációja, amely az átlag fluoreszcencia intenzitások (MFI) eltéréseit mutatja a köldökzsínór minták artériái, illetve vénái között (átlag $\pm$ SD). Az egymástól független kvantifikált régiók és a minták száma: **DHE** (n = 191 artéria és 50 véna régió, 2 mintából); **DETCA+DHE** (n = 196 artéria és 56 véna régió, 2 mintából). Statisztika: párosítatlan t-próba és Mann-Whitney *post-hoc* teszt. (**** p $\leq$ 0.0001).

A DHE egy sejtpérmeábilis vegyület, amely a citoplazmában gyenge kék fluoreszcenciát mutat. Azonban a plazma $O_2^{\cdot-}$ tartalma oxidálja, így az etídium – bromidhoz hasonló vegyület keletkezik, ami a sejtmagban interkalálódik a DNS kettős spirálba. Ez utóbbi esetben egy erősebb vörös fluoreszcenciát tudunk detektálni (**13. ábra**). Ennek megfelelően a DHE mennyiségének citoplazma – sejtmag aránya informatív lehet az oxidatív stressz mértékét illetően. Ennek érdekében a DHE kezelést követően a konfokális felvételeken az erek egy – egy jól körülhatárolható endotél sejtjét közelebbről is megvizsgáltuk (**13. ábra, A panel**). Az egyes csatornákhöz tartozó fluoreszcencia intenzitásokat

hisztogramokon ábrázoltuk, ahol az egyes fluoreszcens intenzitás értékekhez tartozó gyakoriságokat láthatjuk (**13. ábra, B panel**).



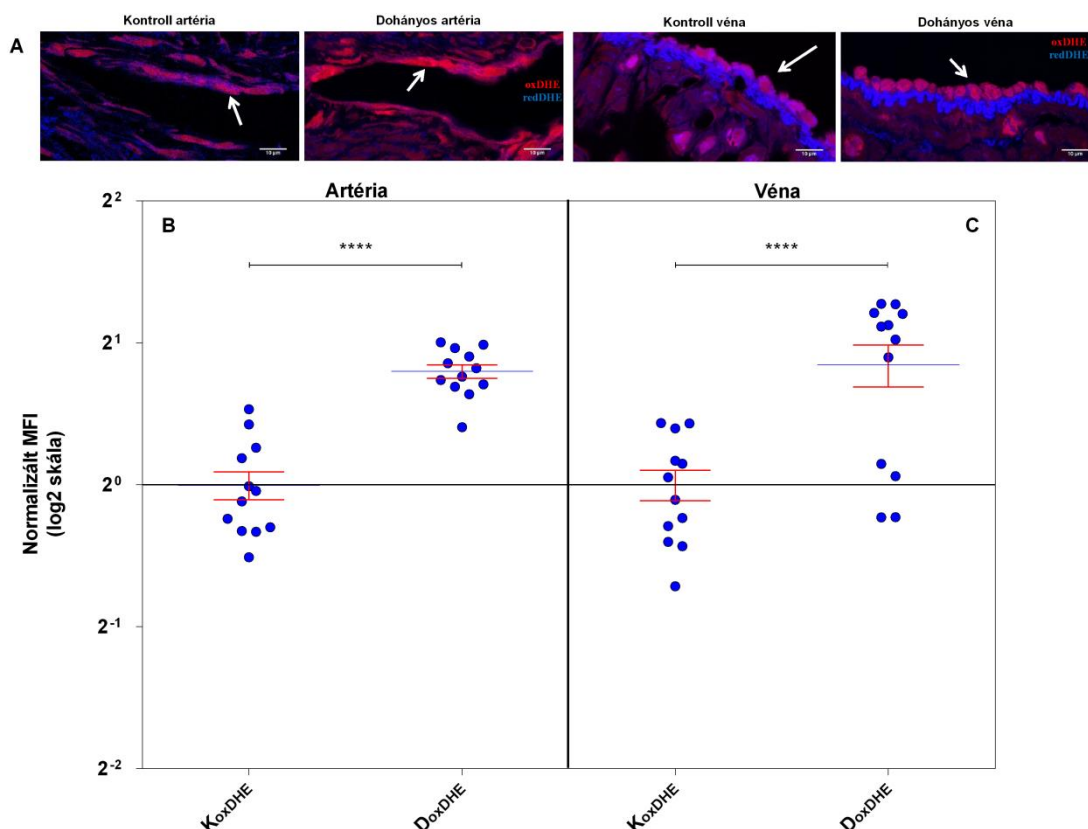
13. ábra Az oxidált és redukált DHE sejtmag – citoplazma megoszlása egy - egy reprezentatív kontroll és dohányos mintában

(A) 1-1 reprezentatív kontroll és dohányos mintákon készített konfokális felvételek DHE alkalmazást követően, egy – egy kinagyított részlettel (keretezett rész), 10 µm-es léptékekkel. Sejtmag (vörös), citoplazma (kék). **(B)** A felnagyított részleteken látható, zöld színnel körülhatárolt sejtekről készített hisztogramok, amelyek az adott csatornához tartozó fluoreszcencia intenzitás értékek sűrűségét mutatják.

Ez alapján láthatjuk, hogy a kontroll mintáink esetében a citoplazma kék fluoreszcenciája intenzív és ez nagy gyakoriságot mutat a sejten belül. Emellett a sejtmagban egy viszonylag gyenge fluoreszcencia detektálható nagyobb sűrűségben. Ezzel szemben a dohányos mintánkban ez a mintázat teljesen eltolódott. A dohányos sejtek citoplazma kék fluoreszcenciája a gyengébb intenzitás felé tolódik, a sejtmag vörös fluoreszcenciája pedig a magasabb intenzitás értékeknél lesz sűrűbb. Összefoglalva ez azt mutatja a dohányos mintáink endotél rétegében az $O_2^{\cdot -}$ jelenléte, így az oxidatív stressz mértéke is kifejezettebb a kontroll mintákhoz viszonyítva.

Ezen felül arra is kíváncsiak voltunk, hogy milyen mennyiségben interkalálódik az oxidált DHE a sejtmagokba, illetve hogy ennek tekintetében milyen különbségeket találunk a mintacsoportok és az erek között. Ezért nagyszámú kontroll (n=12) és dohányos (n=12) mintán megismételtük az

eljárást, és a sejtmagokon belüli vörös fluoreszcenciát kvantifikáltuk (**14. ábra, A panel**). Az eredmények azt mutatták, hogy az oxidált DHE-hez köthető fluoreszcencia mind az artériákban, mind a vénákban jelentősen megemelkedett. A növekedés nagysága közel azonos volt a két értípus esetében, ami ~60% illetve ~70% jelent a kontroll mintáinkhoz viszonyítva (**14. ábra, B panel**).



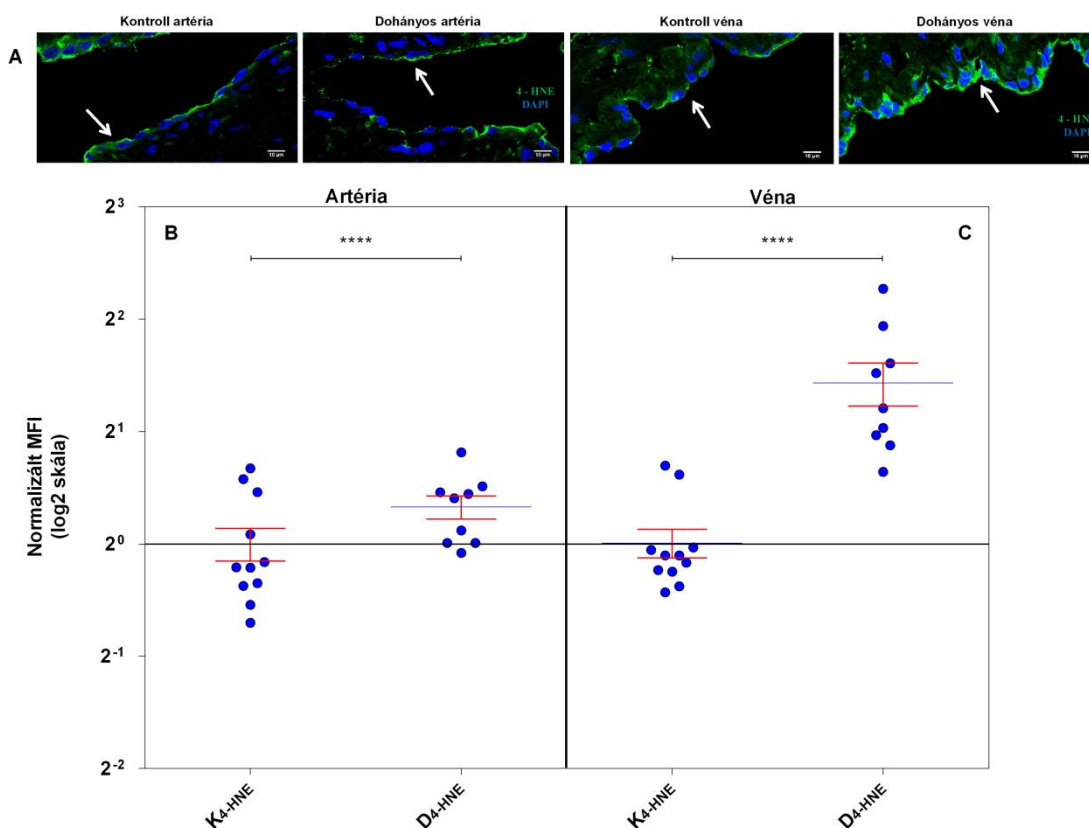
14. ábra Az interkalálódott, oxidált DHE mennyiségének alakulása kontroll és dohányos eredetű köldökzsinór ereken

Reprezentatív konfokális felvételek a kontroll / dohányos artériákról és vénákról DHE (10 μM) alkalmazását követően (**A**). A fehér nyilak mutatják az endotél réteget, a lépték 10 μm. A redukált DHE a citoplazmában kék, az oxidált DHE a sejtmagban vörös fluoreszcenciát mutat. A sejtmagok oxidált DHE fluoreszcencia intenzitások összesített eredményeinek grafikus reprezentációja az átlag fluoreszcencia intenzitások (MFI) eltéréseit mutatja a kontroll – dohányos minták artériái (**B**), illetve vénái (**C**) között log2-es skála mentén (átlag±SEM). A grafikon egy-egy pontja egymástól független mintákat jelöl. Az egymástól független kvantifikált régiók és a minták száma: *K_{DHE}* (n = 304 artéria és 929 véna régió, 12 mintából); *D_{DHE}* (n = 961 artéria és 1229 véna régió, 12 mintából). Statisztika: párosítatlan t-próba és Mann-Whitney post-hoc teszt. (**** P ≤ 0,0001).

5.2.2. Membránkárosodáshoz köthető 4 – HNE vizsgálata

A fokozott oxidatív stressz együtt jár a makromolekulák károsodásával. Ennek egyik megnyilvánulási formája az úgynevezett lipid peroxidáció, amely

károsítja a sejteket és organelumokat határoló kettős membrán struktúrát. A lipid peroxidációs láncreakció során a károsodott lipid fajtájától függően számos végtermék képződhet, melyek közül az egyik legjelentősebb a 4 – HNE. Ez az erősen reaktív telítetlen hidrox-alkán vegyület képes a fehérjékkel irreverzibilis addíciókat kialakítani. Az így keletkező úgynevezett Michael – adduktok mennyisége a membrán károsodások vizsgálatának egyik legelfogadottabb markere. Ezért munkánk során 4 – HNE által módosított fehérjékre specifikus ellenanyagot alkalmaztunk (**15. ábra**).

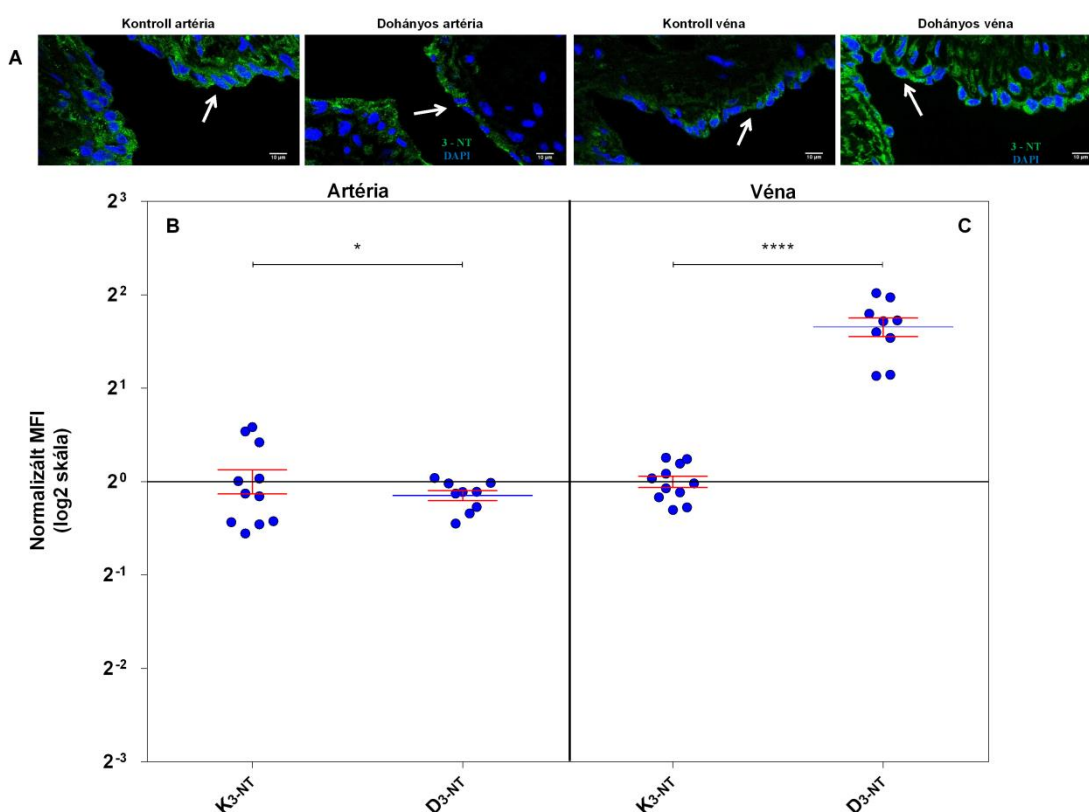


15. ábra A 4-HNE által képzett fehérje adduktok mennyisége kontroll és dohányos eredetű köldökzsínerekben

Reprezentatív konfokális felvételek kontroll és dohányos artériákról, vénákról 4-HNE által módosított fehérjékre specifikus immunjelölését követően (**A**). A fehér nyilak mutatják az endotél réteget, a lépték 10 μ m. Ellenanyagok: monoklonális egér anti – 4 –hydroxy-2-nonenal (1:100) és Alexa 488 (zöld) konjugáltatott anti-egér IgG másodlagos ellenanyagok (1:1000). A sejtmagokat DAPI (kék) jelöli. Az immunjelölések összesített eredményének grafikus reprezentációja, az átlag fluoreszcencia intenzitások (MFI) eltéréseit mutatja a kontroll – dohányos minták artériái (**B**), illetve vénái (**C**) között log2-es skála mentén (átlag $\pm$ SEM). A grafikon egy-egy pontja egymástól független mintákat jelöl. Az egymástól független kvantifikált régiók és a minták száma: *K4-HNE* (n = 233 artéria és 589 véna régió, 11 mintából); *D4-HNE* (n = 232 artéria és 448 véna régió, 9 mintából). Statisztika: párosítatlan t-próba és Mann-Whitney *post-hoc* teszt. (****P $\leq$ 0,0001).

Eredményeink azt mutatják, hogy a dohányos (n=9) artéria és véna esetében kifejezettebb a 4-HNE jelenléte a kontroll (n=11) mintákhoz viszonyítva (**15. ábra, A panel**). A dohányos mintákon belül a vénákban a 4-HNE – fehérje addukt képzés kifejezettebb volt (~270%), mint az artériákban (~125%) (**15. ábra B, C panel**).

5.2.3. Nitrozatív stresszre és fehérje károsodásra utaló 3 – NT marker vizsgálata



16. ábra A fehérjék tirozin oldalláncainak nitrációja kontroll és dohányos eredtű köldökzsinór ereken

Reprezentatív konfokális felvételek kontroll és dohányos artériákról, vénákról a 3-NT specifikus immunjelölését követően (**A**). A fehér nyilak mutatják az endotél réteget, a lépték 10 μ m. Ellenanyagok: monoklonális egér anti – 3-nitrotyrosine (1:100) és Alexa 488 (zöld) konjugáltatott anti-egér IgG másodlagos ellenanyagok (1:1000). A sejtmagokat DAPI (kék) jelöli. Az immunjelölések összesített eredményének grafikus reprezentációja az átlag fluoreszcencia intenzitások (MFI) eltéréseit mutatja a kontroll – dohányos minták artériái (**B**), illetve vénái (**C**) között log2-es skála mentén (átlag $\pm$ SEM). A grafikon egy-egy pontja egymástól független mintákat jelöl. Az egymástól független kvantifikált régiók és a minták száma: **K_{3-NT}** (n = 1033 artéria és 44 véna régió, 11 mintából); **D_{3-NT}** (n = 277 artéria és 39 véna régió, 9 mintából). Statisztika: párosítatlan t-próba és Mann-Whitney post-hoc teszt. (*P $\leq$ 0.005; ****P $\leq$ 0,0001).

A makromolekula károsodások másik formája a fehérjék sérülése. Az oxidatív stressz esetén felhalmozódó $O_2^{\cdot-}$ a szabad NO-al spontán reakcióban ONOO⁻-et képezhet. A ONOO⁻ halmozódás nitrozatív stresszhez vezet, melynek következtében a fehérjék tirozin oldalláncain nitráció következik be. Ennek a folyamatnak az eredménye a 3-NT képződés, amely immunhisztokémiai módszerrel követhető. Munkánk során ezért olyan ellenanyagot használtunk, amely specifikusan felismeri a nitrált tirozin oldalláncokat, és nem mutat kereszt reaktivitást a sima tirozin aminosav oldalláncokkal **(16. ábra, A panel)**.

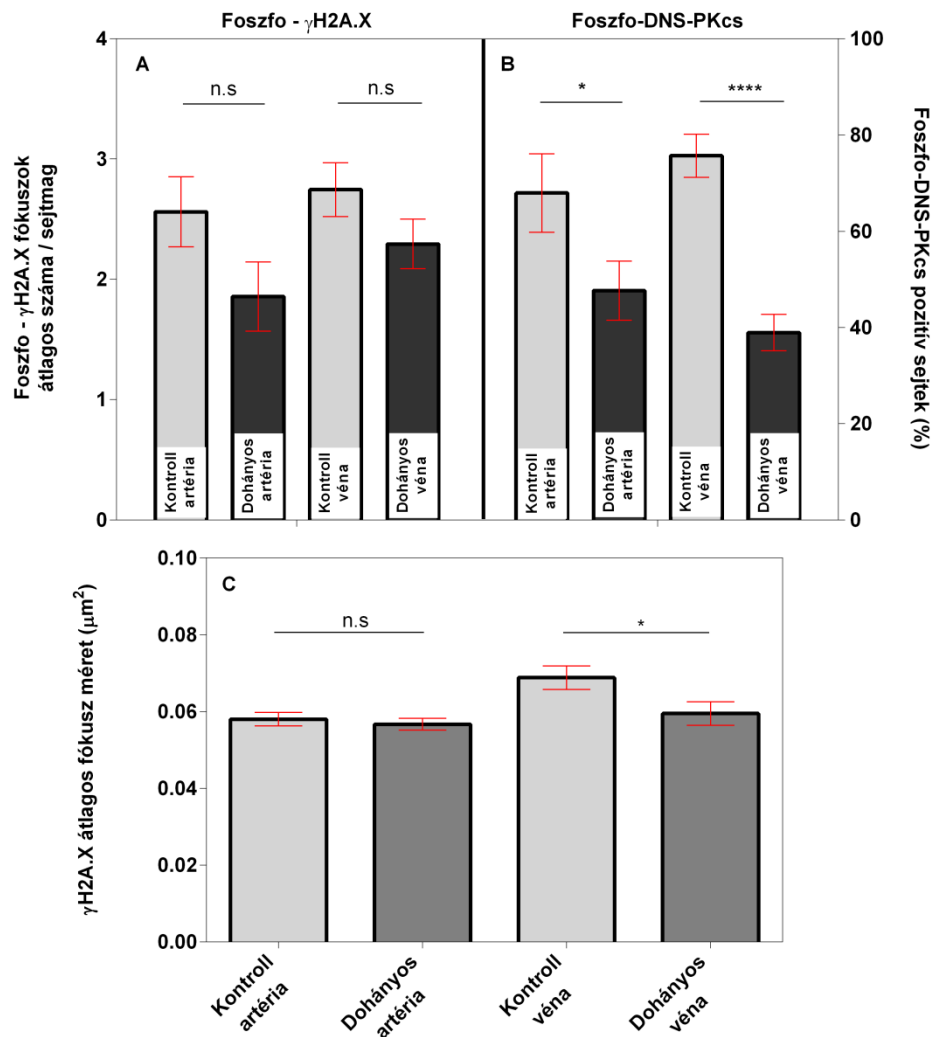
A kvantifikált immunhisztokémiai eredmények szerint a dohányos (n=9) artériákban a nitrotirozin közel azonos a kontroll (n=11) artériák értékeivel, minimális csökkenéssel. Ezzel szemben a dohányos vénákban a kontrollhoz képest egy közel 300%-os növekedést tapasztaltunk **(16. ábra, B, C panel)**.

5.2.4. Az örökítőanyagot érintő károsodások elemzése

A szabadgyökök és nehézfémek károsító hatása a DNS-t is érintheti, ami nem csak a benne kódolt fehérje információk sérülésével jár, hanem súlyos esetben a sejtek pusztulásához vezet. A DNS károsodásának fő jellemzője az egy vagy kettős szálú törések megjelenése, amelyet számos hibajavító mechanizmus igyekszik ellensúlyozni. Ez utóbbiak közül a legegyszerűbb útvonal a kettős szálú törést követő nem homológ végek összekapcsolása (NHEJ). Munkánk során a kétszálú törést követő válaszreakcióban szerepet játszó foszforilált γ H2A.X és a NHEJ útvonalban részt vevő foszforilált DNS-PKcs fehérjék sejtmagi lokalizációját elemeztük specifikus kettős immunjelölést alkalmazva kontroll (n=3) és dohányos (n=3) köldökzsinór metszeteken.

Eredményeink azt mutatták, hogy a γ H2A.X fókuszok átlagos számát tekintve nincs különbség a kontroll és dohányos mintákból származó erek endotél sejtei között **(17. ábra, A panel)**. Ezt követően a kettős törésre utaló sejtmagokat megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a dohányos artériák és vénák endotél rétegében a hibajavító mechanizmusok aktivitása alacsonyabb a kontrollokhoz viszonyítva **(17. ábra, B panel)**. A dohányos artériák esetében a DNS-PKcs pozitív sejtmagok száma mintegy szignifikánsa, mintegy 20%-al, a vénák esetében ~40%-al maradt el a kontrolloknál tapasztalt értékektől. Ez alapján elmondhatjuk, hogy a dohányos minták esetében a DNS károsodást

követő hibajavítási útvonal működése nem megfelelő. Ennek hátterét úgy kívántuk vizsgálni, hogy egyenként meghatároztuk a γ H2A.X fókuszok átlagos méretét, ami alapvetően meghatározza a hibajavító apparátus megfelelő összeszerelődését (**17. ábra, C panel**). A dohányos artériákban nem tapasztaltunk változást, a dohányos vénákban azonban a fókuszok méretének csökkenése szignifikáns volt a kontroll vénákhoz viszonyítva.



17. ábra A DNS kettős szálú törések és a DNS hibajavítás elemzése kontroll és dohányos eredetű köldökzsínóerekben.

Foszfo - γ H2A.X (**A**) és foszfo - DNS-PKcs (**B**) specifikus immunjelölés kvantitatív elemzésének grafikus reprezentációja (átlag $\pm$ SEM). γ H2A.X fókuszok átlagos mérete (**C**) (átlag $\pm$ SEM). Az egymástól független kvantifikált régiók és a minták száma: **Kontroll** (n = 101 artéria és 198 véna endotél sejt magja, 3 mintából); **Dohányos** (n = 169 artéria és 189 véna endotél sejt magja, 3 mintából). Statisztika: párosítatlan t-próba és Mann-Whitney post-hoc teszt. (ns. = nem szignifikáns, *P $\leq$ 0,005; ****P $\leq$ 0,0001).

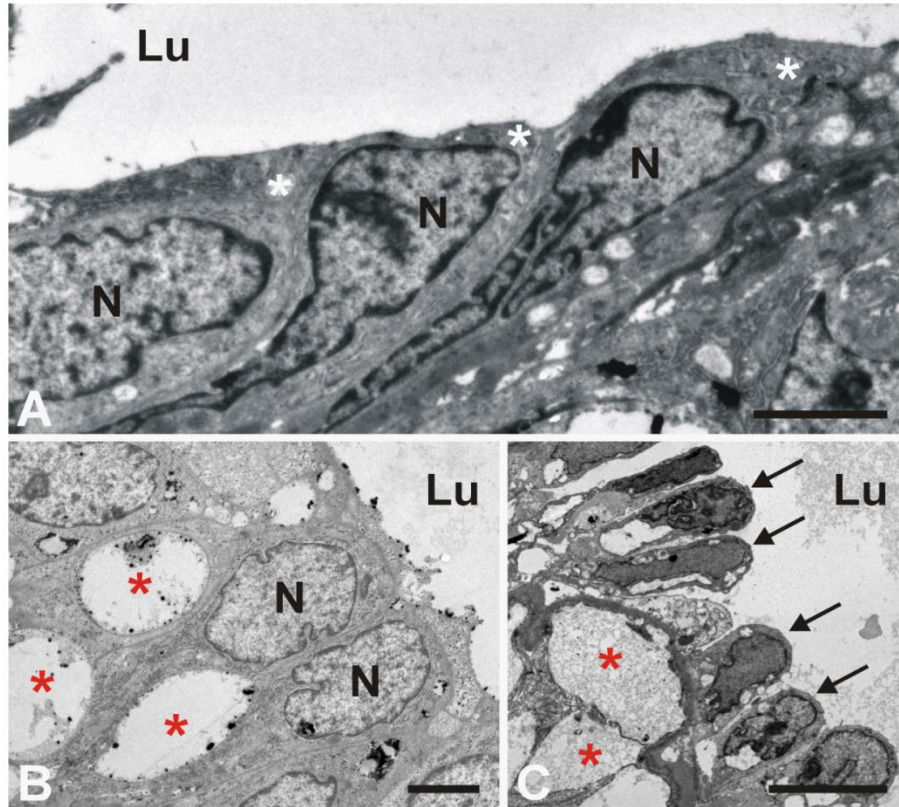
5.3. Az endotél sejtek morfológiai változásának és a funkció vesztés összefüggésének vizsgálata

A makromolekula károsodások alapján feltételeztük, hogy mindez az endotél sejtek morfológiájában is megmutatkozik. Ennek bizonyítására elemeztük az endotél sejtek ultrastruktúráját, majd megvizsgáltuk a morfológiai változások molekuláris hátterét és értékeltük a dohányos és kontroll eredetű minták endotél sejtjeinek életképességét.

5.3.1. Az endotél réteg ultrastrukturális változásai

Az endotél réteg nem csak a NO szintézis szempontjából kulcsfontosságú, hanem az erek legbelső rétegét alkotva egyfajta védőgátként is funkcionál. Az endotéliumban szorosan egymáshoz illeszkedő sejtek egyetlen folytonos réteget képeznek. Emiatt a vérrel együtt áramló káros vegyületekkel közvetlen kapcsolatba kerülnek, és egy hosszabb távú, folyamatos kitettség során ezek a sejtek károsodhatnak. Ennek következtében az endotél-funkció sérülést szenvedhet, és a sejtek közötti folytonosság megbomlásával a károsító hatások a környező szöveti struktúrákra is kiterjedhet.

Munkánk során TEM segítségével vizsgáltuk az endotél sejtek morfológiáját dohányos artériákban és vénákban egyaránt a kontroll endotélhez képest. Eredményeink alapján azt találtuk, hogy mindkét dohányos értípus esetében az ultrastruktúra jelentős mértékben eltér a normál endotéltől (**18. ábra**). A kontroll minták funkcionális endotél rétegében a vártak megfelelően szoros sejt-sejt közötti kapcsolatokat, ép sejtalkotókat, és transzkripciósan aktív sejtmagokat láttunk (**18. ábra, A panel**). Ezzel szemben a dohányos eredetű mintáinkban a sejtek közötti kapcsolatok fellazulnak (megszűnik a folytonosság), és a sejtpusztulásra utaló fenotípust mutatnak (**18. ábra, B-C panel**). Ilyen tipikus változás a sejtmag kezdődő fragmentálódása; a sejtek elválása az alapmembrántól és a citoplazma térvészése, ami a sejtek között és a sejteken belül megjelenő nagyméretű vakuólák következménye. A változások mindkét értípusban egyaránt megfigyelhetők, de a vénák esetében ezek a jellemzők hangsúlyosabbak (**18. ábra, C panel**). Ennek oka az, hogy a köldökszinór vénák nagyobb mértékben kitettek a méhlepény által átengedett toxikus anyagoknak.



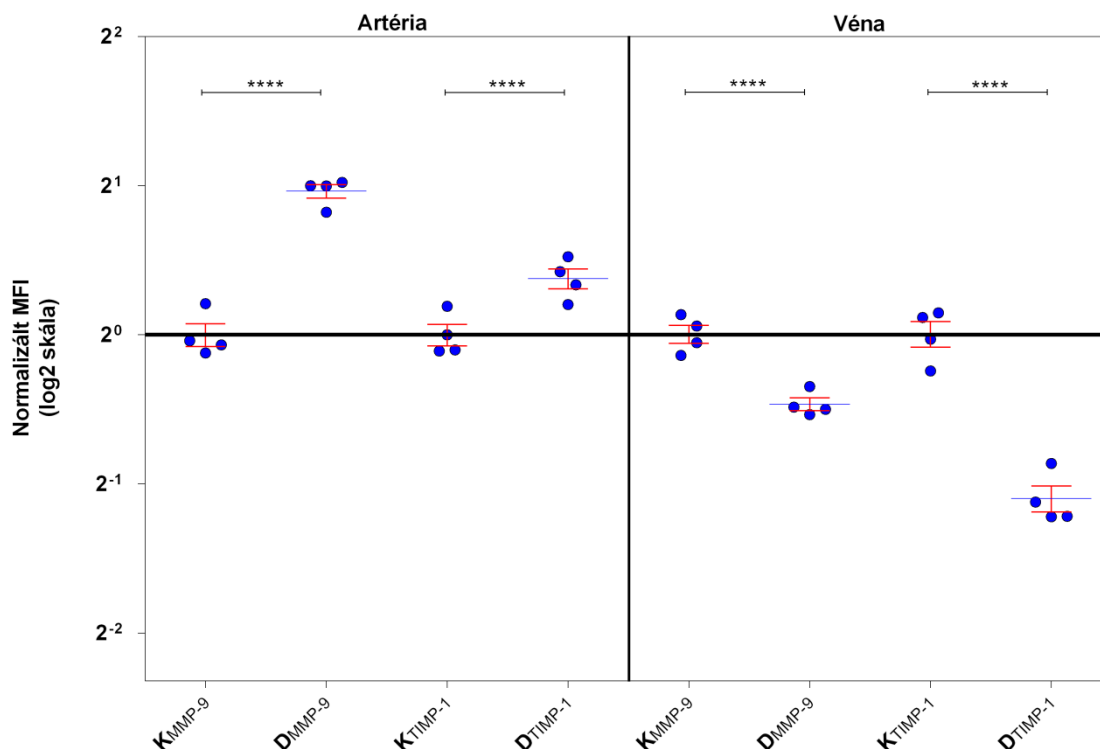
18. ábra TEM felvételek kontroll és dohányos eredetű köldökzsínór erekről

A reprezentatív elektronmikrográfok az erek endotél rétegére fókuszálnak, bemutatva a kontroll **(A)** és dohányos artéria **(B)**, véna **(C)** közötti különbségeket. Az ábrán feltüntetett jelölések: fehér csillag – kontroll endotél sejtek, szoros sejtkapcsolatokkal; fekete nyíl - pusztuló endotél sejtek; vörös csillag – sejten belüli és sejtek közötti vakuólák; N – sejtmag, Lu – az erek lumene. Léptékek: **(A)**, **(B)** - 2 μ m; **(C)** – 5 μ m.

5.3.2. A morfológiai változás molekuláris hátterének vizsgálata

Az endotél sejtek közötti kapcsolatok felbomlása hátterében az extracelluláris mátrix degradációja állhat. Fiziológiás körülmények között ez a precízen szabályozott folyamat biztosítja a sejtek és szövetek kezdeti fejlődését és azok megújulását. A lebontó folyamatokat katalizáló MMP-k közül munkánk során vizsgáltuk az MMP-9 és MMP-2 enzimeket, illetve ezzel párhuzamosan a specifikus gátlásukban résztvevő TIMP-1 és TIMP2 fehérjéket.

Az említett fehérjékre specifikus immunjelöléseket kvantifikáltuk kontroll (n=4) és dohányos (n=4) minták artériáinak és vénáinak endotél rétegében **(19. ábra)**.



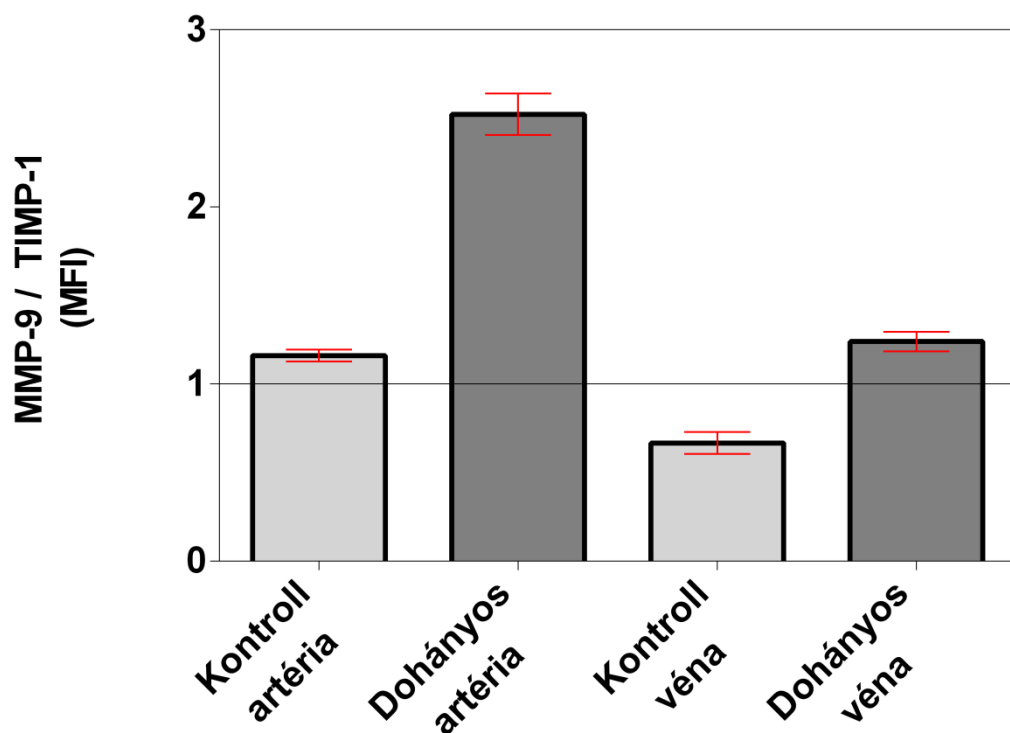
19. ábra Az MMP-9 és inhibitora, a TIMP-1 alakulása kontroll és dohányos eredetű köldökzsínerek erek endotél rétegében

Az immunjelölések összesített eredményének grafikus reprezentációja az átlag fluoreszcencia intenzitások (MFI) eltéréseit mutatja a kontroll – dohányos minták artériái (A), illetve vénái (B) között log2-es skála mentén (átlag±SEM). A grafikon egy-egy pontja egymástól független mintákat jelöl. Az egymástól független kvantifikált régiók és a minták száma: **K_{MMP-9}** (n = 144 artéria és 35 véna régió, 4 mintából); **D_{MMP-9}** (n = 245 artéria és 26 véna régió, 4 mintából). **K_{TIMP-1}** (n = 430 artéria és 54 véna régió, 4 mintából); **D_{TIMP-1}** (n = 424 artéria és 32 véna régió, 4 mintából). Statisztika: párosítatlan t-próba és Mann-Whitney post-hoc teszt. (****P ≤ 0,0001).

Eredményeink azt mutatják, hogy a dohányos artériákban közel kétszeresére emelkedett az MMP-9 szintje, amit a TIMP-1 emelkedése kisebb mértékben (< 1,5-szeres) követ. Ezzel párhuzamosan a vénákban mind az MMP-9, mind a TIMP-1 mennyisége alacsonyabb a kontrollhoz képest. A TIMP-1 esetén a különbség mértéke jelentősebb, mint az MMP-9 esetében (2x és 1,5x) (19. ábra B panel). Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a korábban vizsgált paraméterekhez hasonlóan itt is értípusra specifikus változásokat látunk. Az MMP-2 és a TIMP-2 expressziója a kimutathatóság határán mozgott, így ezek

vizsgálatát a továbbiakban nem folytattuk. Az alacsony expressziós szint oka az lehet, hogy leginkább a fejlődés korábbi szakaszaiban vesznek részt a szöveti átrendeződésben / morfogenezisben.

A fehérjék egyéni szintjének alakulása mellett azonban talán fontosabb figyelembe venni az MMP-9 – TIMP-1 közti egyensúlyt. Ennek érdekében az egyes mintacsoportokon belül külön megvizsgáltuk az MFI értékek arányát is **(20. ábra)**. Amennyiben a két paraméter aránya 1 (vagy ahhoz közelítő érték), akkor az MMP-9 – TIMP-1 teljes mértékben kiegyenlítik egymást. Azonban, ha az arányszám 1 alá csökken, akkor a TIMP-1, ha pedig 1 fölé növekszik, akkor az MMP-9 dominál a rendszerben.



20. ábra Az MMP-9 / TIMP-1 aránya kontroll és dohányos eredetű köldökzsinór mintákban

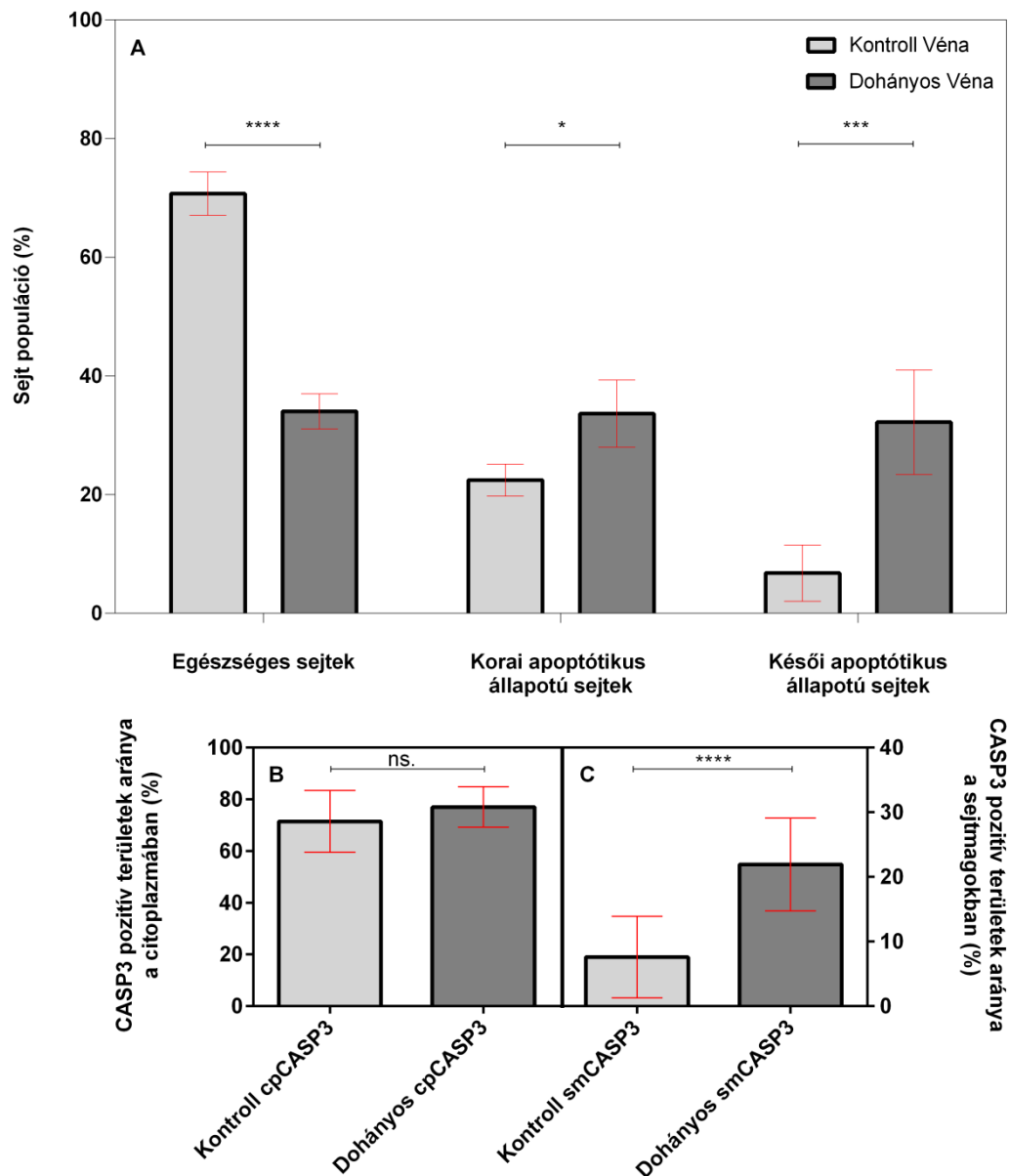
Immunjelölésekből származó átlag fluoreszcencia intenzitások (MFI) arányok grafikus reprezentációja kontroll – dohányos minták artériái **(A)**, illetve vénái **(B)** között (átlag±SEM). Az egymástól független kvantifikált régiók és a minták száma: K_{MMP-9} (n = 129 artéria és 26 véna régió, 4 mintából); D_{MMP-9} (n = 144 artéria és 26 véna régió, 4 mintából). K_{TIMP-1} (n = 129 artéria és 26 véna régió, 4 mintából); D_{TIMP-1} (n = 144 artéria és 26 véna régió, 4 mintából).

Az arányok alapján a kontroll artériákban az MMP-9 és TIMP-1 szintje kiegyenlíti egymást, mialatt a vénákban a TIMP-1 dominál. Ezzel szemben a dohányos artériákban (~2,5) és vénákban (~1,3) egyaránt az MMP-9 dominál. A kontroll és dohányos csoportok közötti arány változás az artériák és a vénák esetében közel azonos (2x) **(20. ábra, A és B panel)**.

5.3.3. Az endotél sejtek viabilitásának elemzése

A makromolekula károsodások és a morfológiát érintő elemzéseink alapján feltételeztük, hogy a rendszer szintű ED kialakulásához a kontroll és dohányos csoportok endotél sejtpopulációjának az életképességbeli különbsége is nagyban hozzájárul. A vénák esetében tapasztalt markánsabb eltérések és az elsődleges kitettségük miatt a következőkben erre az ér típusra fókuszáltunk.

Ennek keretében kontroll (n=3) és dohányos (n=2) mintákból izolált HUVEC populáción viabilitási tesztet végeztünk, illetve immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk az apoptotikus kaszkád végpontját a CASP3-at. A viabilitási teszt során a sejtszuspenzió FITC-cel konjugáltatott annexin-V és a propidium – jodid jelölődését elemeztük. Az annexin-V az apoptózis korai szakaszában a sejtmembrán külső felszínén exponálódó foszfatidil-szerin csoportokhoz kötődik. A propidium-jodid pedig egy olyan vegyület, amivel szemben a sejtmembrán normál esetben nem áteresztő. Az apoptózis / nekrosis késői szakaszában a membrán struktúra megbomlik, így a vegyület akadálytalanul bejut a sejtmagba, ahol a DNS kettős spirálba interkalálódik. A CASP3 az apoptózis folyamatának utolsó elemei, az úgynevezett végrehajtó kaszpázok közé tartozik. A citoplazmában, proteolitikus hasítást követően aktiválódik, és a hasított CASP3 a sejtmagba transzlokálódik, ahol apoptózist indukál. Ennek megfelelően az IHC során hasított CASP3-ra specifikus ellenanyaggal vizsgáltuk a kontroll (n=3) és dohányos (n=3) véna endotél rétegében a citoplazma és a sejtmag közötti megoszlását **(21. ábra)**.



21. ábra Dohányos és kontroll véna endotél sejtek viabilitása és CASP3 megoszlása

Annexin-V – FITC és propidium-jodid jelölt sejtek megoszlása az izolált, kontroll és dohányos véna endotélsejtek populációján belül **(A)**. A FACS analízist követően az egyes csoportok közötti különbségeket a teljes sejtpopuláción belüli százalékos megoszlásban fejeztük ki (átlag±SD). Egészséges sejtek = kettős negatív; korai apoptotikus sejtek = annexin-V – FITC pozitív, propidium-jodid negatív; késői apoptotikus sejtek = kettős pozitív sejtek. **Kontroll** (n = 237500 sejt, 3 mintából); **Dohányos** (n = 129600 sejt, 2 mintából). Statisztika: csoportosított, 2 szempontos variancia analízis (ANOVA) és Holm-Sidak *post hoc* teszt (*P ≤ 0,05, ***P ≤ 0,001 and ****P ≤ 0,0001). A kontroll és dohányos eredetű vénák endotél rétegében detektált CASP3 megoszlása (átlag±SD). cpCASP3=citoplazmatikus **(B)**, smCASP3=sejtmagi **(C)** CASP3 lokalizáció. **Kontroll** (n = 3); **Dohányos** (n = 3). Statisztika: párosítatlan t-próba és Mann-Whitney *post-hoc* teszt. (ns. = nem szignifikáns; ****P ≤ 0,0001).

A viabilitási tesztek eredményei alapján a dohányos eredetű HUVEC populáción belül a sejtek ~65% volt a korai vagy a késői apoptózis valamely fázisában. Ezzel szemben a kontroll HUVEC populáció sejtjeinek ~70%-a egészségesnek bizonyult, és csak 30% mutatott apoptotikus tulajdonságokat **(21. ábra, A panel)**. A CASP3 megoszlás esetében a citoplazmatikus lokalizáció tekintetében nem tapasztaltunk jelentős különbséget a kontroll és dohányos mintáink között **(21. ábra, B panel)**. Ezzel szemben a sejtmagok területén detektált, transzlokálódott CASP3 hozzávetelőlegesen a kontroll érték háromszorosa volt **(21. ábra, C panel)**.

5.4. Izolált köldökszinór erek reaktivitásának vizsgálata *ex vivo* rendszerben

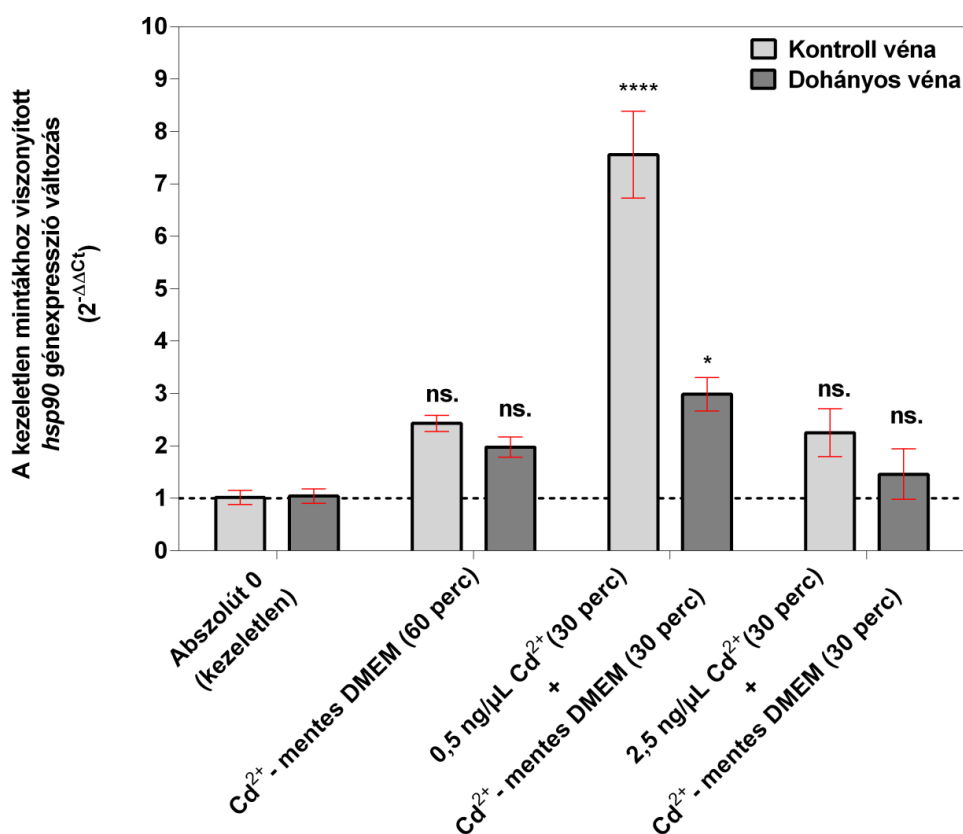
A dolgozat korábbi fejezeteiben bemutatott károsodások és a csökkent viabilitás tükrében kíváncsiak voltunk a kontroll és dohányos eredetű vénák reakció készségére. Ezzel szeretnénk volna választ kapni arra, hogy milyen hatékonyan reagálnak az intakt szövetek az általunk előidézett stresszhatásokra, valamint a dohányos mintáink korábbi nehézfém expozícióját szeretnénk volna bizonyítani. Ennek érdekében egy *ex vivo* rendszert terveztünk, melyben izolált vénákat különböző stresszhatásokat követően vizsgáltunk. A módszer az akut stresszt modellezi, melyet hő és kombinált (hő + Cd²⁺) kezeléssel váltottunk ki. A mintákból, az RNS izolálást követően 6 gén expressziójának változását vizsgáltuk RT-qPCR módszerével, a transzkriptek relatív mennyiségét a 18S rRns szintjére normalizálva fejeztük ki. A 6 génből a *hsp90*, valamint az MT izoformákat kódoló gének (*mt1e*, *mt2a*, *mt3*) expressziója a hő illetve Cd²⁺ által kiváltott stressz közvetlen markerei, az *mmp-9* és a *timp-1* gének termékei pedig az expozíció hatására potenciálisan bekövetkező strukturális változások előfutárai.

5.4.1. A hő és nehézfém stressz indukált génexpressziós változások követése

A HSP90 fehérje tradicionálisan a hősokk válasz egyik kulcseleme, azonban szerepe ennél szerteágazóbb dajkafehérje funkciója miatt. Ennél fogva a *hsp90* gén indukcióját minden olyan stresszhatás kiválthatja, amely a fehérjék natív szerkezetének elvesztésével együtt jár. Ezen hatások közé tartozik a

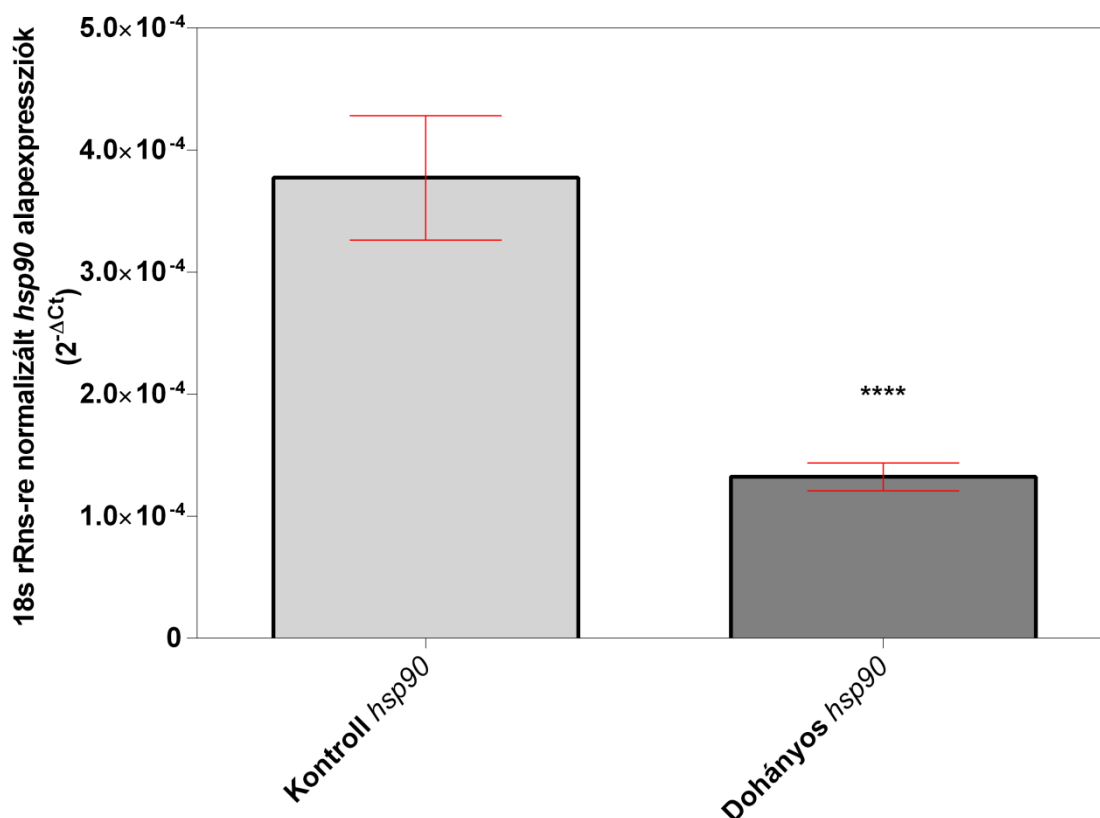
toxikus nehézfém terheltség is. Az MT fehérjék számos izoformáját ismerjük, melyek közös tulajdonsága a nagy affinitású fém/nehézfém-kötő kapacitás. Funkciójukat tekintve nem csak a szervezet fém-háztartását szabályozzák, hanem nehézfém stressz során rövid idő alatt indukálódnak, hogy ellensúlyozzák a terhelés hatásait.

Az *ex vivo* rendszerünkben a kontroll (n = 3) és dohányos (n = 3) vénákat hő sokknak és ezzel párhuzamosan kombinált (hő + Cd²⁺) stressznek tettük ki. Az RT-qPCR eredményeinek értékelése során az abszolút kezeltlen mintákhoz hasonlítottuk a kezeléseket, illetve az alap expresszió megállapítása érdekében összevetettük a 2 mintacsoportból származó abszolút kontrollok transzkriptszintjeit is. Elsőként a minden sejtben expresszálandó *hsp90*-et vizsgáltuk (22-23. ábra).



22. ábra Az *hsp90* gén expressziójának változása *ex vivo* modell rendszerben

A *hsp90* expresszió kezeltlen mintákhoz viszonyított változása hő sokk, valamint kombinált (hő + Cd²⁺) stressz hatására. Elemszám: **kontroll** (n=3), **dohányos** (n=3) minden eredmény 3 párhuzamos reakcióval (átlag±SEM). Statisztika: két szempontos ANOVA és Holm – Sidak post hoc teszt. (ns. = nem szignifikáns; *P ≤ 0,05; ****P ≤ 0,0001).



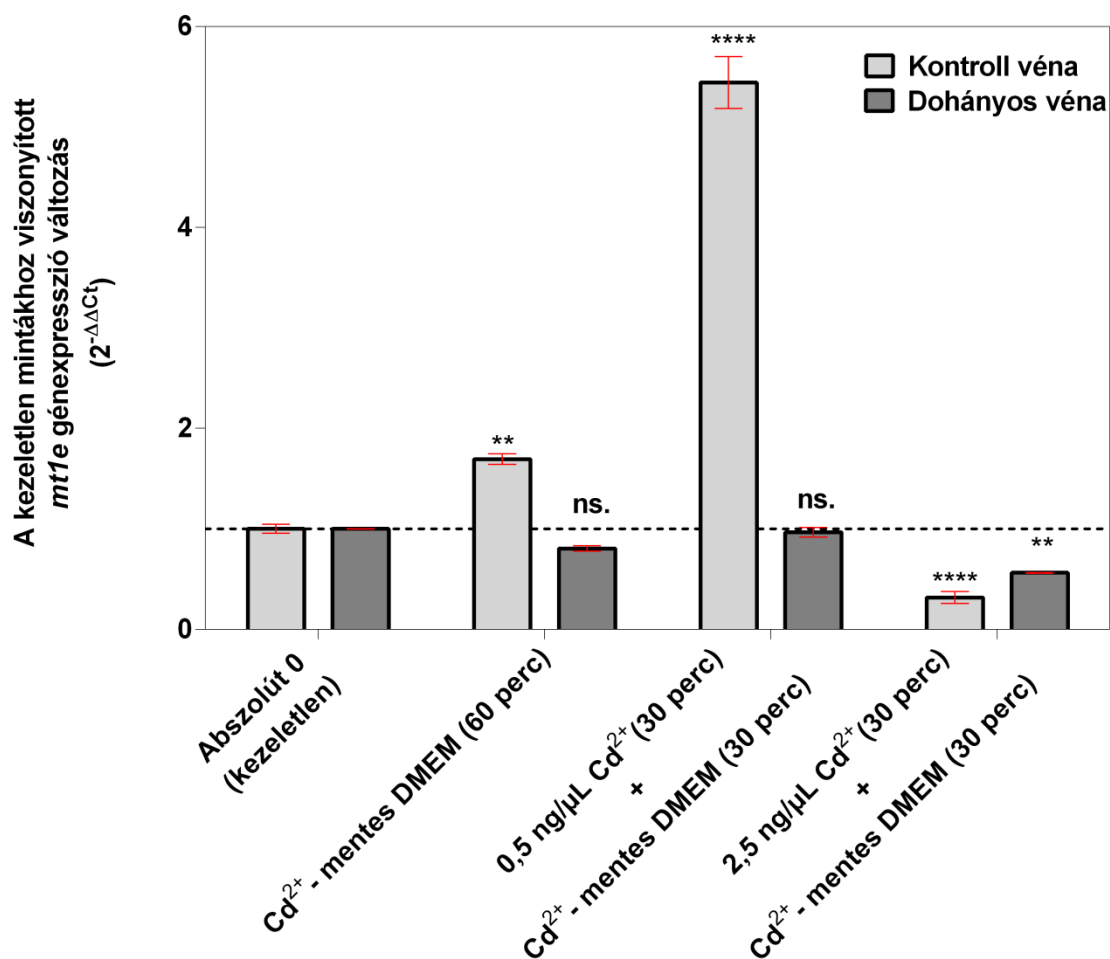
23. ábra Az *hsp90* gén alap expressziója kontroll és dohányos vénákban

A kontroll és dohányos eredetű vénák alap *hsp90* expressziója. Elemszám: **kontroll** (n=3), **dohányos** (n=3) minden eredmény 3 párhuzamos reakcióval (átlag±SEM). Statisztika: két szempontos ANOVA és Holm – Sidak post hoc teszt. (****P ≤ 0,0001).

Eredményeink szerint a *hsp90* gén mind a kontroll, mind a dohányos vénákban hozzávetőlegesen 2x-es indukciót mutatott a hőszokk hatására. A kombinált stresszor alkalmazások során azonban a Cd^{2+} hatásaként koncentráció és mintacsoport specifikus változásokat tapasztaltunk. A 0,5 ng/μL Cd^{2+} esetében az indukció mértéke ~7x-es volt a kontroll és ~3x-os volt a dohányos mintáink esetében. A magasabb koncentrációjú akut Cd^{2+} (2,5 ng/μL) terhelés a kapott adatok alapján már toxikus hatást gyakorolt mindkét mintacsoportra (**22. ábra**). Az abszolút kontrollok esetében azt tapasztaltuk, hogy a dohányos vénákban alacsonyabb a *hsp90* mRNS szint (~4x) a kontroll mintákhoz képest (**23. ábra**).

A nehézfém kezelések hatását / hatékonyságát a válasz útvonalhoz specifikusan kapcsolódó *mt* géneken keresztül vizsgáltuk. Ehhez az

érszövetben és az endotél sejtekben is bizonyítottan kifejeződő *mt1e*, *mt2a* és *mt3* gének indukcióját követték. (24-27. ábra).

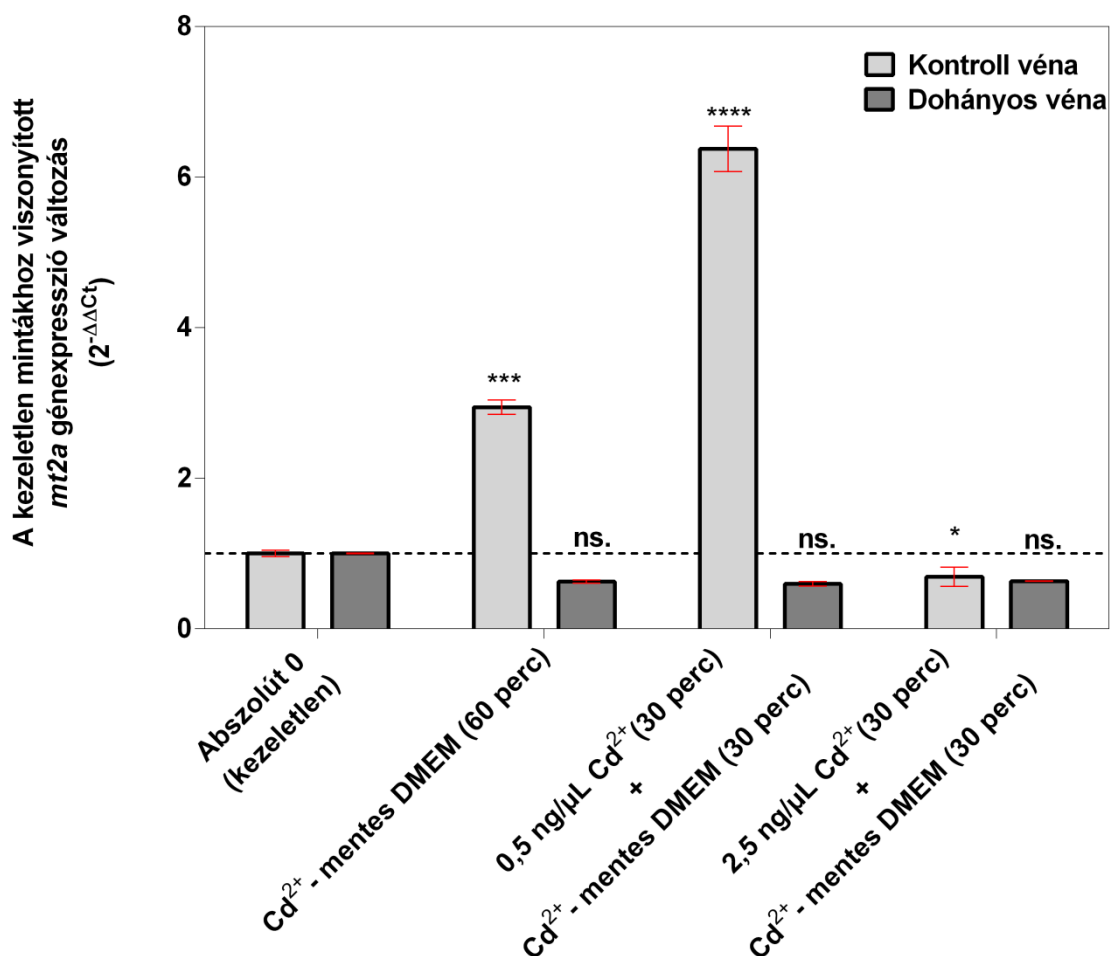


24. ábra Az *mt1e* gén expressziójának változása *ex vivo* modell rendszerben

Mt1e expresszió kezeletlen mintákhoz viszonyított változása hő sokk, valamint kombinált (hő + Cd^{2+}) stressz hatására. Elemszám: **kontroll** (n=3), **dohányos** (n=3) minden eredmény 3 párhuzamos reakcióval (átlag±SEM). Statisztika: a kezelések eredményét két szempontos ANOVA és Holm – Sidak post hoc teszttel, az alap expressziók szintjét páros t-tesztel elemeztük. (ns. = nem szignifikáns; **P ≤ 0,01; ****P ≤ 0,0001).

Az *mt1e* gén a dohányos mintacsoportban egyik kezelés hatására sem mutatott szignifikáns változást. A kontroll csoport esetében a hő sokk hatására egy enyhe, ~1,5x-es indukciót kaptunk. A hő és 0,5 ng/μL Cd^{2+} hatására a növekedés már több mint 5x-ös volt, és a 2,5 ng/μL Cd^{2+} koncentráció mellett az *mt1e* gén kifejeződése is gátolt volt (24. ábra). A minták alap expressziós

szintje érdekes módon a dohányos mintacsoportban alacsony szintű *mt1e* mRNS jelenlétet mutatott (27. ábra, A panel).

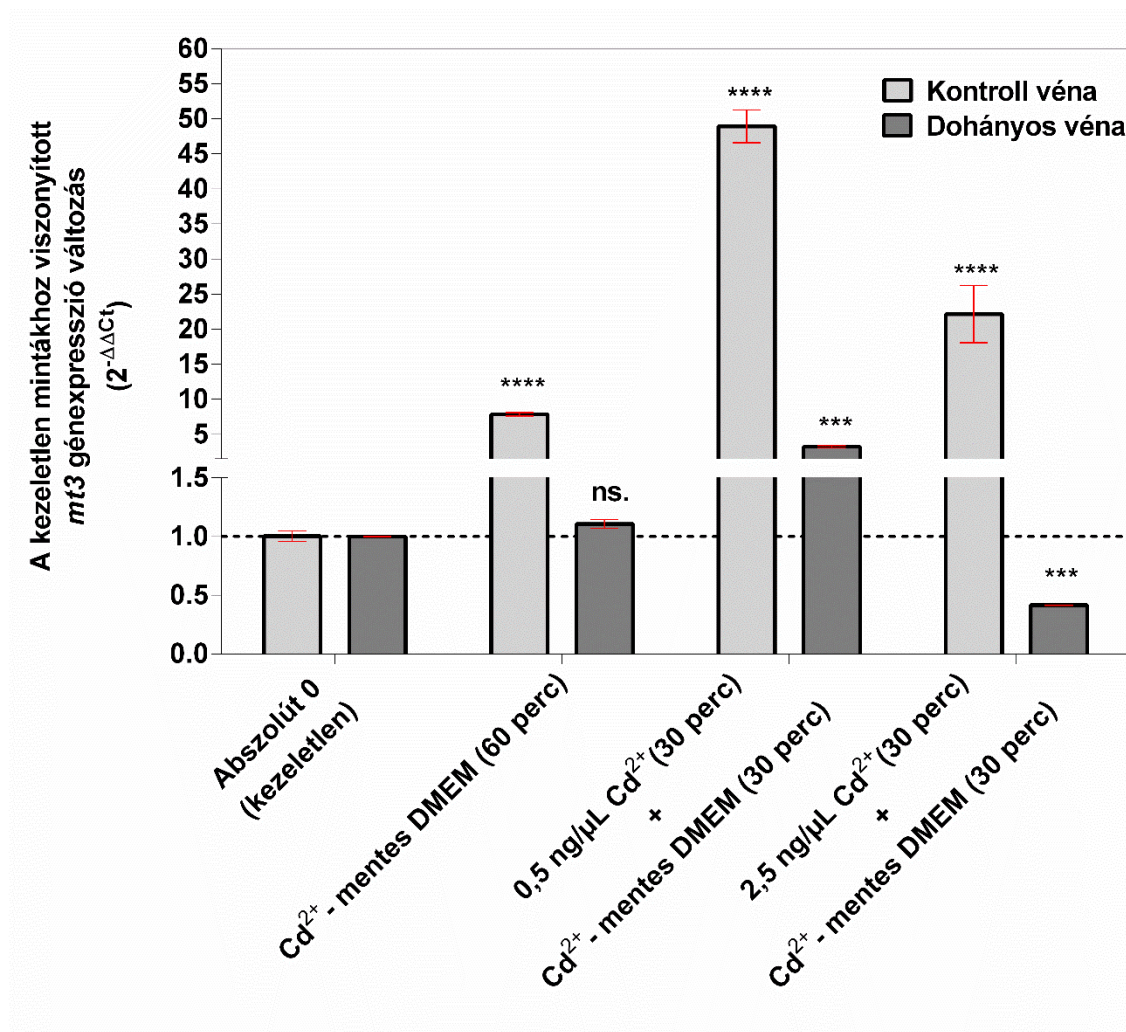


25. ábra Az *mt2a* gén expressziójának változása *ex vivo* modell rendszerben

Az *mt2a* expresszió kezeletlen mintákhoz viszonyított változása hő sokk, valamint kombinált (hő + Cd²⁺) stressz hatására. Elemszám: **kontroll** (n=3), **dohányos** (n=3) minden eredmény 3 párhuzamos reakcióval (átlag±SEM). Statisztika: a kezeléseket eredményt két szempontos ANOVA és Holm – Sidak post hoc teszttel, az alap expressziók szintjét páros t-tesztel elemeztük. (ns. = nem szignifikáns; *P ≤ 0,05; ***P ≤ 0,001; ****P ≤ 0,0001).

Az *mt2a* expresszió hasonló mintázatot mutatott. Ebben az esetben a kontroll vénákban megfigyelt indukciók valamivel magasabbak voltak a hőkezelés (~ 3x) és a hő és az alacsonyabb Cd²⁺ koncentráció hatására (~6x) is, míg 2,5 ng/μL Cd²⁺ esetében nem tapasztaltunk szignifikáns változást. A dohányos vénák nem mutattak jelentős eltérést az *mt2a* mRNS mennyiségében a kezeléseket követően (25. ábra). Az alap expresszió szintjében az *mt1e*-hez

hasznos, ámde kisebb különbséget kaptunk a kontroll és dohányos csoportok között (27. ábra, B panel).

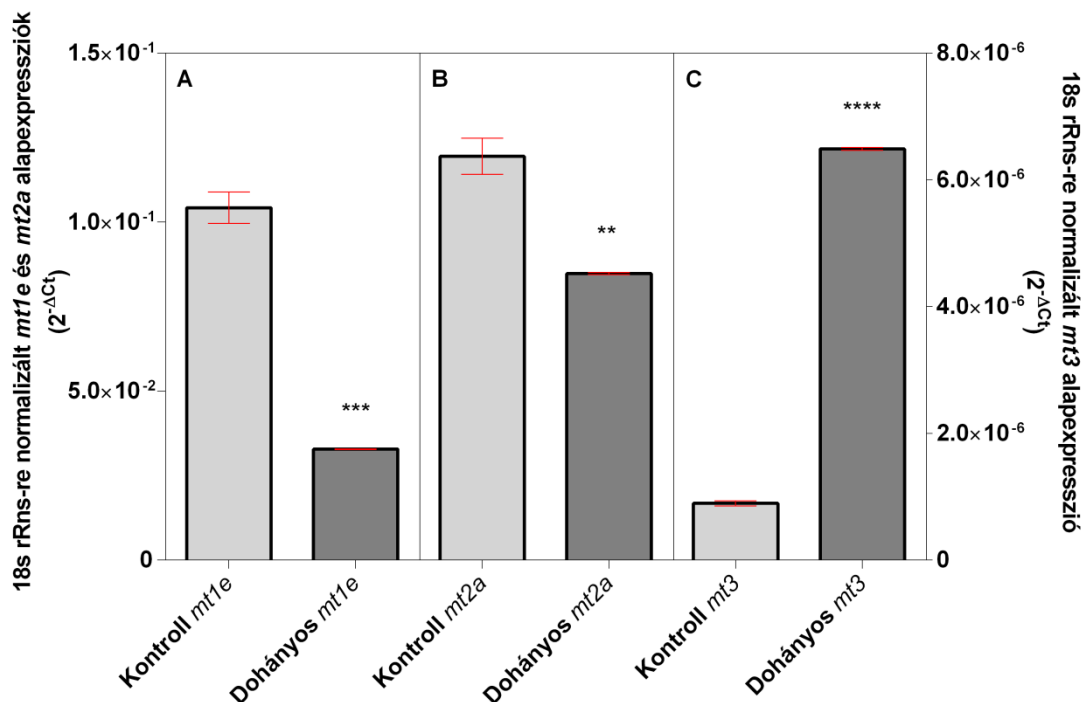


26. ábra Az *mt3* gén expressziójának változása *ex vivo* modell rendszerben

Az *mt3* expresszió kezelt mintákhoz viszonyított változása hősek, valamint kombinált (hő + Cd^{2+}) stressz hatására. Elemszám: **kontroll** (n=3), **dohányos** (n=3) minden eredmény 3 párhuzamos reakcióval (átlag±SEM). Statisztika: a kezelések eredményét két szempontos ANOVA és Holm – Sidak post hoc teszttel, az alap expressziók szintjét páros t-tesztel elemeztük. (ns. = nem szignifikáns; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$).

A kezelések következményeként az *mt3* kifejeződésében tapasztaltuk a legnagyobb változásokat. A hősek és az alacsonyabb Cd^{2+} koncentráció hatására mind a kontroll (~7x - ~48x), mind a dohányos vénák (~1,1x – 3,2x) esetében indukálódott az *mt3*, jöllehet ez a dohányos és hőkezelt kontroll csoport esetében nem bizonyult szignifikánsnak az alapértékekhez képest. Ezzel párhuzamosan a magasabb Cd^{2+} koncentráció (2,5 ng/μL) csak a

dohányos mintákban mutatatta az előzőekben megfigyelt transzkripciót gátló hatást. A kontroll vénákban a 0,5 ng/μL Cd²⁺ kezeléshez képest ugyan jelentős gátlást tapasztaltunk, ennek ellenére az indukció mértéke itt is kiemelkedőnek (~22x) tekinthető (**26. ábra**). Az alap *mt3* expressziók alakulása is eltér a másik 2 izoformánál megfigyeltektől. Ebben az esetben a dohányos csoport alap *mt3* mRNS szintje a kontroll vénák közel 7x-ese volt (**27. ábra, C panel**).



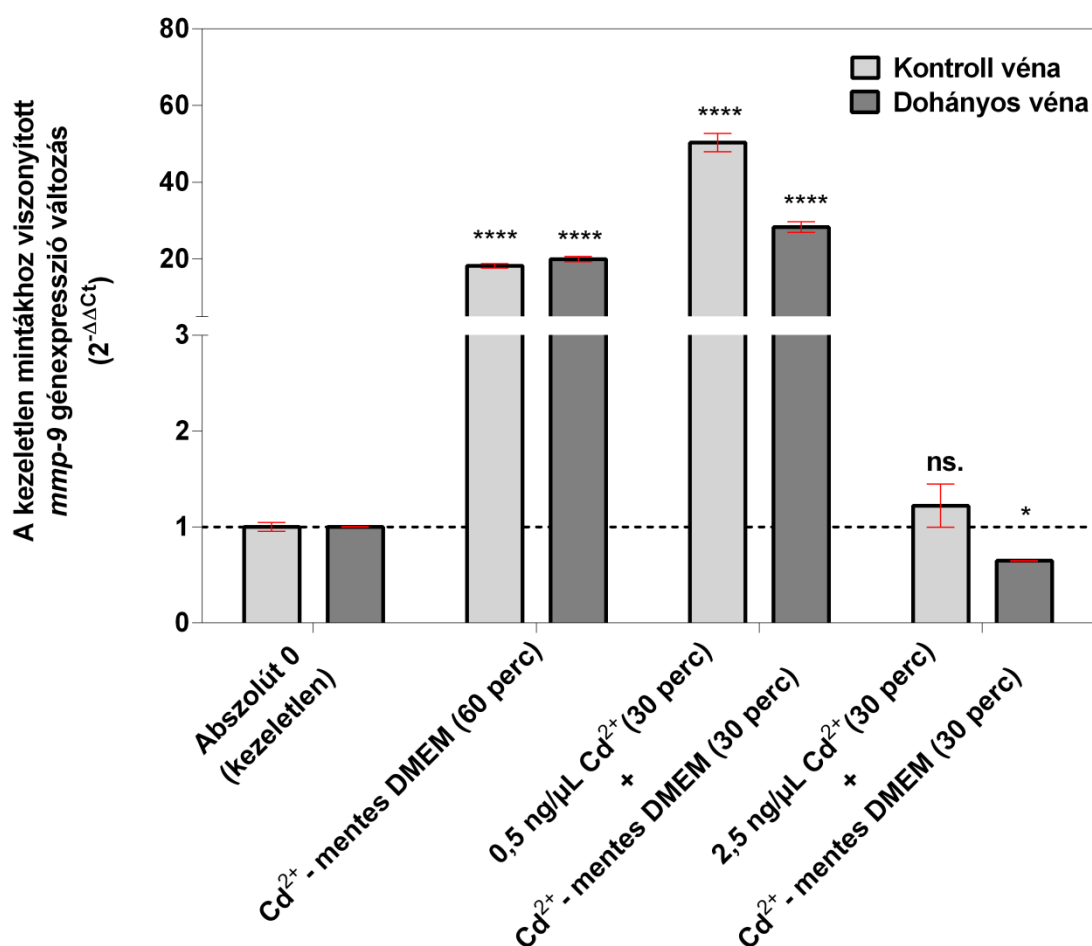
27. ábra A *mt1e*, *mt2a* és *mt3* gének alap expressziója kontroll és dohányos vénákban

(A), (B), (C) kontroll és dohányos eredetű vénák alap *mt1e*, *mt2a*, *mt3* expressziója.

Elemzés: **kontroll** (n=3), **dohányos** (n=3) minden eredmény 3 párhuzamos reakcióval (átlag±SEM). Statisztika: két szempontos ANOVA és Holm – Sidak post hoc teszt. (**P ≤ 0,01; ***P ≤ 0,001; ****P ≤ 0,0001).

5.4.2. Kontroll és dohányos eredetű köldökszínór vénák mmp-9 és timp-1 expressziójának vizsgálata ex vivo rendszerben

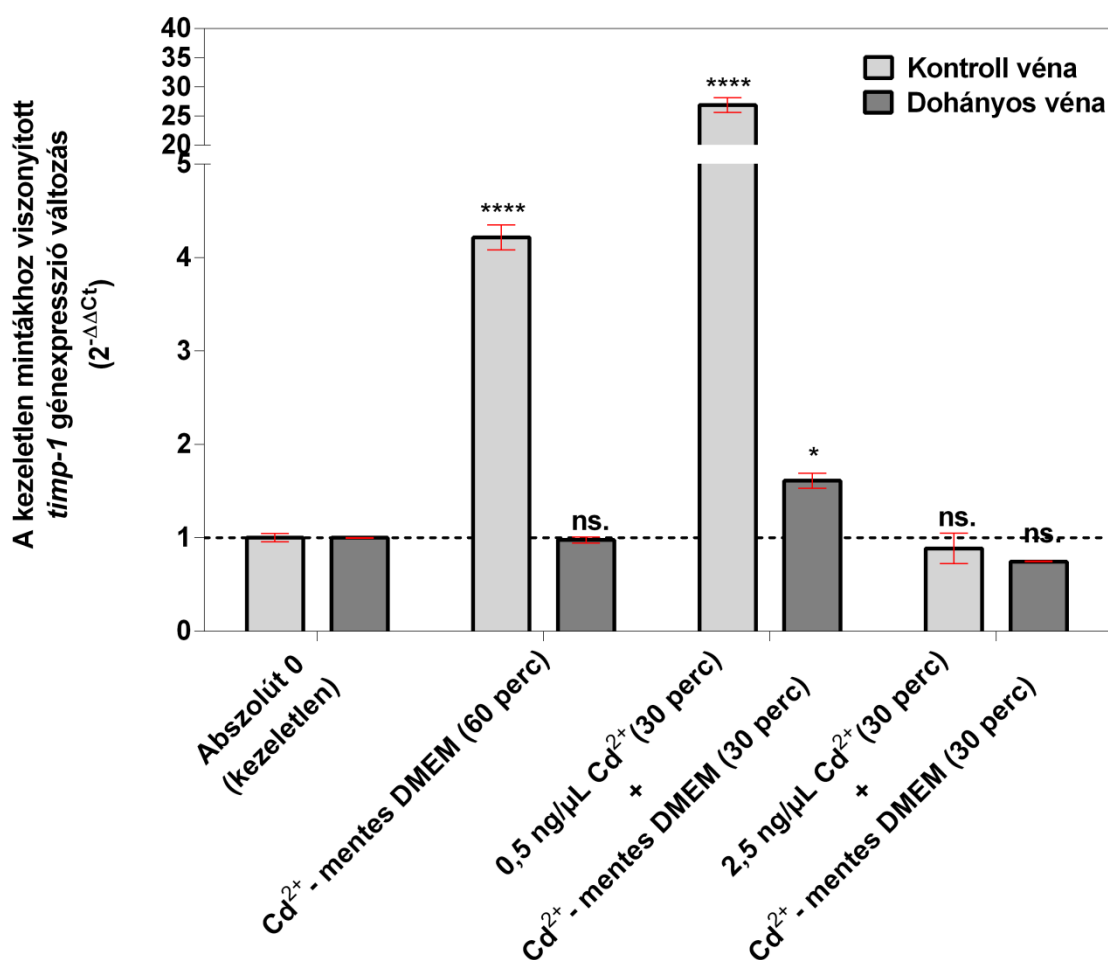
Az MMP-9 és TIMP-1 rendszert az előző fejezetekben vizsgáltuk IHC megközelítéssel. Munkánk során azonban kíváncsiak voltunk arra, hogy a strukturális változások hátterében álló fehérjék esetében milyen különbségeket figyelhetünk meg RNS szinten, akut stressz hatásra az egyes kezelési pontok, illetve a mintacsoportok között. Mindemellett választ kerestünk arra, hogy az IHC során kapott eredményeink összefüggésbe hozhatóak-e a nehézfém terheltséggel, és az MMP-9/TIMP-1 arány eltolódások megfigyelhetőek-e transzkripció szinten (28-30. ábra).



28. ábra Az mmp-9 gén expressziójának változása ex vivo modell rendszerben

Az mmp-9 expresszió kezeletlen mintákhoz viszonyított változása hő sokk, valamint kombinált (hő + kadmium) stressz hatására. Elemszám: **kontroll** (n=3), **dohányos** (n=3) minden eredmény 3 párhuzamos reakcióval (átlag±SEM). Statisztika: két szempontos ANOVA és Holm – Sidak post hoc teszt. (ns. = nem szignifikáns; *P ≤ 0,05; ****P ≤ 0,0001).

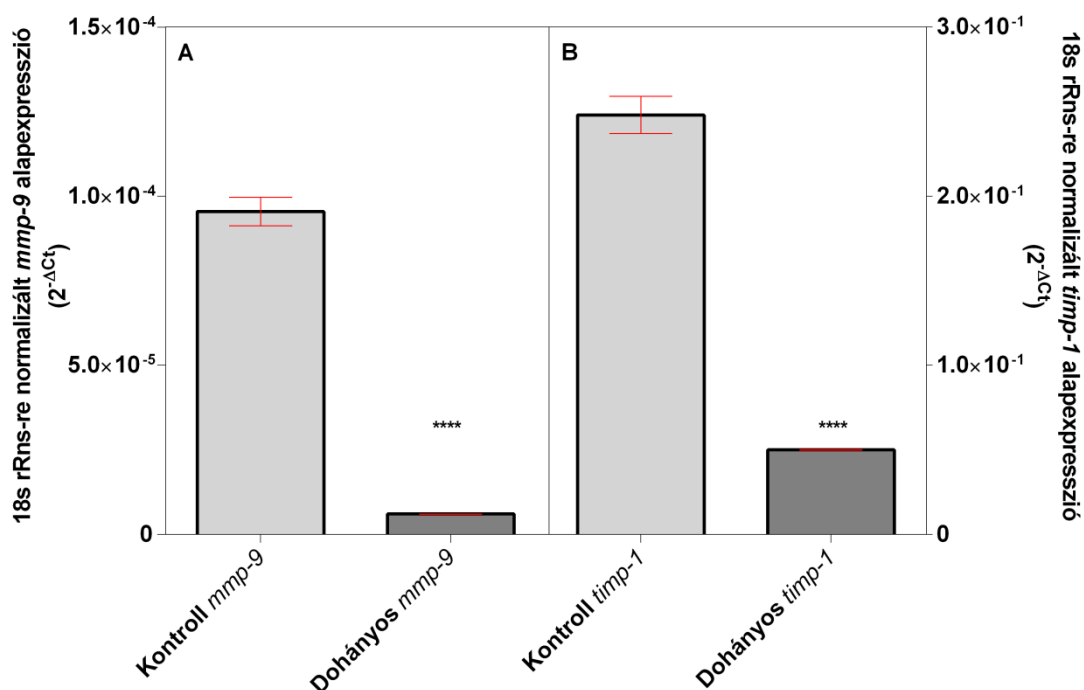
Eredményeink alapján azt tapasztaltuk, hogy az *mmp-9* mind a hősök, mind pedig a hő és 0,5 ng/μL Cd²⁺ jelenlétében nagymértékben indukálódik. A hőkezelés esetén a kontroll és dohányos vénákban közel azonos (~20x) emelkedést figyeltünk meg. A kombinált kezelés esetében a kontroll minták *mmp-9* indukciója közel kétszerese volt a dohányos mintákénak (50x – 28x). A 2,5 ng/μL Cd²⁺ koncentráció túl magasnak bizonyult ebben az esetben is (**28. ábra**). Az alap expresszió tekintetében az *mmp-9* mRNS szintje jóval alacsonyabb volt a kontroll mintákhoz viszonyítva (**30. ábra, A panel**).



29. ábra Az *timp-1* gén expressziójának változása ex vivo modell rendszerben

Az *timp-1* expresszió kezeletlen mintákhoz viszonyított változása hősök, valamint kombinált (hő + kadmium) stressz hatására. Elemszám: **kontroll** (n=3), **dohányos** (n=3) minden eredmény 3 párhuzamos reakcióval (átlag±SEM). Statisztika: két szempontos ANOVA és Holm – Sidak post hoc teszt. (ns. = nem szignifikáns; *P ≤ 0,05; ****P ≤ 0,0001).

A *timp-1* esetében azt tapasztaltuk, hogy csak a kontroll minták reagáltak a kezelésekre, a dohányos vénák nem mutattak szignifikáns változást. A hő sokk hatására ~4x-es, a hő és alacsonyabb (0,5 ng/μL) Cd²⁺ koncentráció hatására közel 27x-es volt a *timp-1* indukció. A 2,5 ng/μL Cd²⁺ koncentráció már gátolta a *timp-1* indukciót (**29. ábra**). Az abszolút kezeletlen mintáink esetében a *timp-1* alap expressziója a kontrollnál jelentősen alacsonyabb szintet mutatott (**30. ábra, B panel**).



30. ábra Az *mmp-9* és *timp-1* gének alapexpressziója kontroll és dohányos vénákban

(A), (B) Kontroll és dohányos eredetű vénák alap *mmp-9* és *timp-1* expressziójának szintje.

Elemzés: **kontroll** (n=3), **dohányos** (n=3) minden eredmény 3 párhuzamos reakcióval (átlag±SEM). Statisztika: két szempontos ANOVA és Holm – Sidak post hoc teszt. (ns. = nem szignifikáns; ***P ≤ 0,001; ****P ≤ 0,0001) Elemzés: **kontroll** (n=3), **dohányos** (n=3) minden eredmény 3 párhuzamos reakcióval (átlag±SEM). Statisztika: két szempontos ANOVA és Holm – Sidak post hoc teszt. (****P ≤ 0,0001).

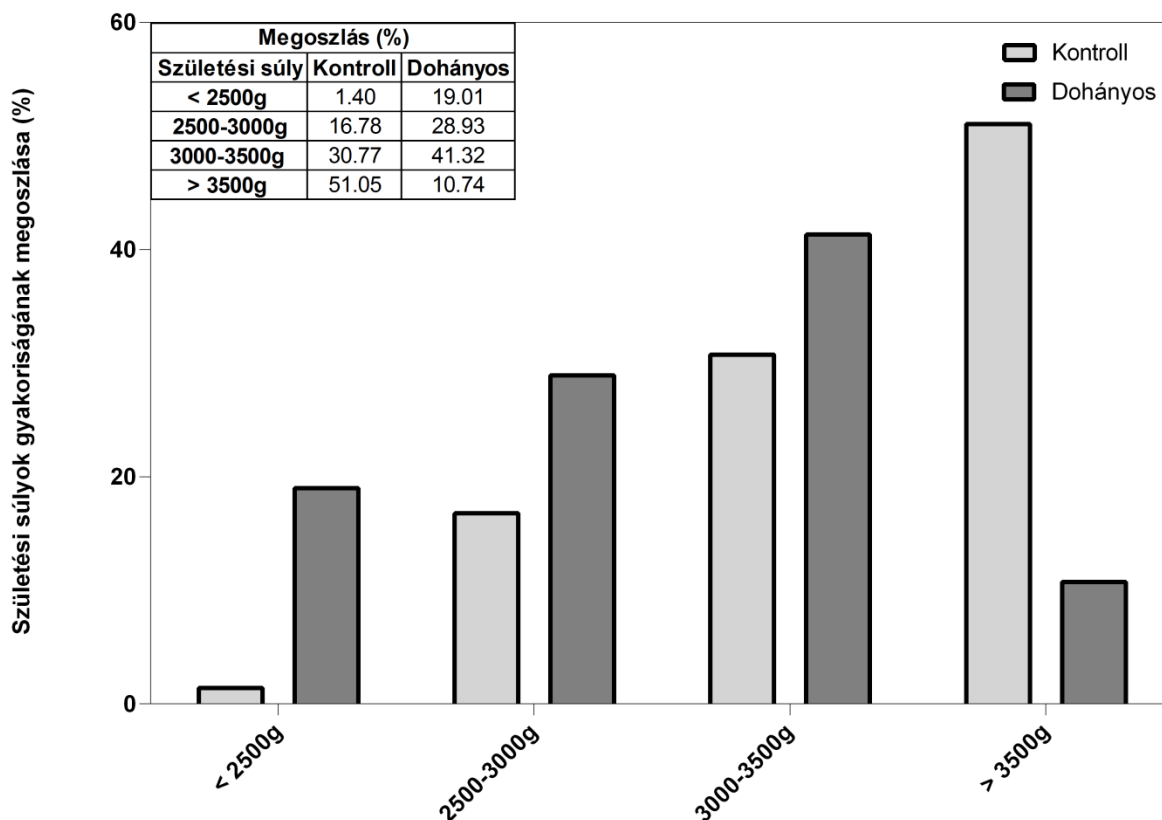
Az *ex vivo* kísérleteink eredményei alapján tehát elmondhatjuk, hogy a kísérleti elrendezés alkalmas az erek stresszválaszának tesztelésére. Továbbá, mind a *hsp90*, mind pedig az *mt* gének (különös tekintettel az *mt3*-ra) indukciós mintázata a kezelések hatására arról tanúskodik, hogy a dohányos eredetű vénák a korábban megfigyelt erőteljes sejtpusztulás ellenére is funkcionálisak. Mindezek mellett eredményeink közvetett bizonyítékként szolgálnak arra, hogy

a dohányos csoport már korábban is találkozott Cd^{2+} -mal, ami összefüggésbe hozható a terhesség alatti dohányzással. Az *mmp-9* és *timp-1* eredményei pedig az előzőeket egyfelől megerősítik, másfelől pedig alátámasztják az IHC eredményeinket, ahol a dohányos vénák esetében egyenlőtlen csökkenéseket tapasztaltunk a két fehérje viszonyában, ami az MMP-9/TIMP-1 arány eltolódásához vezetett.

6. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE, DISZKUSSZIÓ

A dohányzás napjaink egyik fő rizikófaktor a CVD-k kifejlődésének tekintetében. A dohányfüst komponenseivel összefüggésbe hozható érrendszeri elváltozások, különös tekintettel az endotél sejtek állapotára, felnőtt szervezetben és *in vitro* modelleken már részletesen ismert.^{207–209} A legtöbb ilyen betegség közös kiindulópontja visszavezethető a biológiailag hozzáférhető NO szint csökkenésére, így az ED-ra.^{210–212} A humán magzati fejlődésre gyakorolt hatások molekuláris háttere azonban kevésbé feltérképezett. Mindazonáltal az már korábban is világossá vált, hogy a terhesség alatti dohányzás nem csak a magzati fejlettségre van hatással. Bizonyítást nyert az is, hogy a helytelen anyai életmód az utódokban olyan hosszabb távon megjelenő egészségügyi problémákhoz vezethet, mint a magas vérnyomás és a súlyosabb veleszületett szívhibák.^{100,101} Mindezek mellett Lawrence és munkatársai által végzett állatkísérletes bizonyítékok arra mutatnak, hogy a prenatális nikotin kitettség megváltoztatja a méhen belüli fejlődés génexpressziós mintázatát. Ezen változások végső soron szívbetegségekre való hajlamosító tényezőkként jelennek az utódok későbbi életszakaszaiban.¹⁰⁵

Csoportunk vörösvértestekkel foglalkozó párhuzamos kutatásaiban vizsgált minták a dolgozatomban felhasznált mintaanyaggal megegyeznek. Ennek keretében megtörtént az újszülöttek fenotipikus paramétereinek elemzése is, amely egyértelműen bizonyította az anyai dohányzás hatását a magzati fejlődésre. A fej- és mellkörfogat méretek jelentősen alacsonyabbak (6-6.5%) voltak a dohányos édesanyák újszülöttjeinek esetében. Emellett, a születési súlyok még markánsabb változását tapasztaltunk. A kontroll csoport újszülöttjeinek ~51%-a haladta meg a 3500 g-ot, ezzel szemben a dohányos csoport tagjainak csak ~11%-a érte el ezt az értéket. Ezzel párhuzamosan a kis súlyú újszülöttek (<2500 g) gyakorisága a kontroll csoportban mindössze 1.4%, míg a dohányos csoportban 19% volt. **(31. ábra)**. Továbbá beszámoltunk arról is, hogy az anyai dohányzás morfológiai és funkcionális változásokat indukál a magzati vörösvértestekben. Ennek tükrében az is világossá vált, hogy a dohányos eredetű magzati vörösvértestek NOS3-függő NO szintézise nem képes megfelelő mértékű kompenzációval szolgálni egy esetleges vaszkuláris diszfunkció esetében.²¹³



31. ábra Az újszülöttek születési súlyának megoszlása²¹³

A köldökzsinórban foglalt erek megfelelő működése a magzat megfelelő tápanyag és oxigén ellátottságának alapfeltétele, amelyben az endotél sejteknek kiemelt szerepük van. Ezáltal a köldökzsinórt érő károsodások közvetlenül befolyásolhatják a méhen belüli fejlődést. Továbbá minden negatív irányú változás a magzatot ért károsodások lenyomataként értelmezhető. A dolgozatomban bemutatott eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy a terhesség teljes idejében való dohányzás strukturális és funkcionális sérüléseket indukál. Ez nemcsak a véna, hanem az artériák endotéliumát is érinti, amely egy kiterjedt, rendszerszintű funkcióvesztésre utalhat. Mindezek mellett eredményeink azt mutatják, hogy az említett változások összhangban állnak a káros anyagokkal szembeni kitettség mértékével, amely így értípus specifikusan alakul. Összességében pedig elmondhatjuk, hogy a ROS túlsúlya által generált makromolekula károsodások és a NO hiányt kompenzáló útvonalak aktivációja is korrelál egymással, szintén értípustól függő módon.

A köldökzsinór nem rendelkezik beidegzéssel, így a benne foglalt erek tónusának szabályozása a rendszer biológiailag hozzáférhető NO szintjén

alapszik. Az általunk használt modellben a NO elsődleges forrása az endotél sejtek által expresszált aktív NOS3. Az enzim mennyisége és aktivitása több szinten szabályozott, így figyelembe kell vennünk a transzkripció, poszttranszlációs eseményeket, illetve a különböző fehérje-fehérje interakciókat is. Mindenekelőtt érdemes kiemelni, hogy a NO termelődés leginkább a vénában sérült, amely a NOS3 SER1177-es pozíció foszforilációjának elmaradására vezethető vissza. Az artériák esetében hangsúlyoznunk kell a magzati keringés speciális szerveződését, ahol az artériák felelősek az oxigén-szegény vér és anyagcsere végtermékek szállításáért. Emellett fontos kiemelni, hogy az artériás vér ebben a rendszerben kevert vérként értelmezendő, hiszen praktikus okokból kifolyólag több ponton is keveredik az oxigenált vénás vérrel.²¹⁴ Ennek tükrében a köldökzsinór vénák elsődlegesen kitétek azon káros anyagoknak, amelyeket a méhlepény nem képes kiszűrni, míg az artériák kitétsége csak másodlagos, indirekt módon történik. Következésképp az artériák állapota azokat a hatásokat tükrözheti elsősorban, amelyek már a fejlődő magzatot is elérték korábban. Összességében az artériák vizsgálatánál azt találtuk, hogy a károsodás kisebb mértékű a vénákhoz viszonyítva mind strukturális, mind pedig funkcionális értelemben. Eltekintve a NOS3 szint csökkenésétől, a NO ellátottságot többé-kevésbé kielégítőnek gondoljuk. Ennek bizonyítékát a megtartott foszforilációs állapotra vezethetjük vissza, amelynek tekintetében a meglévő NOS3 populáció aktívnak tekinthető.

A NOS3-függő NO termelést azon kompetitív útvonalak is befolyásolhatják, amelyek szintén az L-arginint használják szubsztrátként. Ezek közül is kulcsszerepet tölt be a citoplazmában konstitutívan jelenlévő ARG1. Normál körülmények között ez az enzim fontos szerepet tölt be a karbamid ciklusban, emellett szabályozza a vaszkuláris simaizom sejtek proliferációját.²¹⁵ Azonban az oxidatív stressz során akkumulálódó ROS túlzott ARG1 expresszióhoz vezethet. Ennek következményeként csökken a hozzáférhető L-arginin mennyiség, amely indukálja NOS3 szétkapcsolását. Ez további ROS felhalmozódáshoz és a kardiovaszkuláris rendszer károsodásához vezet.²¹⁶ Az általunk vizsgált paraméterek közül az ARG1 volt az egyetlen, amely jelentősen magasabb expressziót mutatott a dohányos artériákban, mint a vénákban. Ezen eredmény részletes hatását a NOS3-NO útvonalra nem ismerjük, hiszen az

artériák esetében a NOS3 dimer formája a foszforilációs állapot alapján megtartottnak tűnik. Ezzel párhuzamosan a vénák esetében feltételezhető, hogy a NOS3 elveszíti a dimer struktúráját, ami az aktiváló foszforiláció visszaesésében nyilvánul meg. Pernow és munkatársai korábban bizonyították, hogy a 2-es típusú diabétesz patológiás következményeként magas ARG1 expresszió és aktivitás detektálható az erek endotél rétegében. Emellett rávilágítottak arra is, hogy az endotél sejtek és vörösvértestek állapota között szoros kapcsolat áll fent, és a vörösvértestek ARG1-függő szabályozó szerepe meghatározó a kardiovaszkuláris funkciók tekintetében. Emellett a Pernow és munkatársai diabéteszes modell rendszerén bemutatott eredményeivel konzisztens módon az ARG1 növekedését tapasztaltuk a dohányos eredetű magzati vörösvértestekben.^{213,217} Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az ARG1 vizsgálata rávilágíthat a kardiovaszkuláris betegségek ok-okozati összefüggéseire.

Ezt a következtetést erősítik azon tényezők is, amelyek a lehetséges alternatív NO termelő útvonalakat járják körbe. A NOS2 és XOR jelentős indukciót mutat a vénákban, de emellett a sejt és makromolekula károsodások is kifejezett mértékben figyelhetőek meg. Elsőre a NOS2 indukció kifejezetten hasznosnak tűnhet a NOS3-NO hiányának alternatív kompenzálására. Azonban a NOS2 aktivitás növekedése hosszabb távon egyéb olyan következményeket is von maga után, amelyek közel sem jótékonyak. Ilyen például a citokinek és ROS termelődésének fokozása.²¹⁸ Ebből eredően a NOS2 elhúzódó aktív állapota összefüggésbe hozható a citokinek által indukált gyulladásos válaszreakciókkal, amely végül a sejtek CASP3-mediált apoptózisához vezet.^{219,220} A NOS2 esetében feltételezett szélsőséges kettősség alapján a NOS2-NO legfeljebb limitált mértékben segítheti a vazodilatációt. Ezzel párhuzamosan inkább a passzív, nem közvetlenül hasznosítható tNOx „pool” gyarapításához járul hozzá. Azonban feltételezzük, hogy a tNOx szint emelkedése hipoxiás környezetben elősegítheti a tNOx-XOR-NO útvonal aktív szerepének előtérbe kerülését. A NOS2 mellett a XOR expresszió is drasztikusan emelkedett a vénákban, amely így tovább erősíti a fent említett elképzeléseinket. Az útvonal jelentőségét figyelembe véve feltételezzük, hogy ez nem csupán egy lehetőség, hanem az egyetlen módja annak, hogy a tNOx

pool hasznosuljon ilyen körülmények között. Ezt erősíti, hogy a közelmúltban a XOR aktív szerepe a NO hiányra visszavezethető hipoxia ellensúlyozásában jelentős figyelmet kapott.²²¹ Az erek kitettségének figyelembe vételével az artériákban menekítő útvonalak aktiválódása is elmarad. Eredményeink alapján ebben az esetben a NOS2 még alacsonyabb is volt, mint a kontroll artériákban, illetve a XOR szint is elmaradt a vénákban tapasztalt értékektől. Eredményeink ezen szakaszát összegezve elmondhatjuk, hogy a dohányzással összefüggésbe hozható endotéliális diszfunkció kialakulása mindkét értípusban egyaránt megfigyelhető, amelynek hátterében a biológiailag aktív NO szint csökkenése áll. Jóllehet, hogy mind az artériákban, mind pedig a vénákban tapasztaltuk a NOS3 csökkenését, amely a rendszer általános transzkripciós aktivitásának visszaesésére utalhat. Mindazonáltal azt is kijelenthetjük, hogy az artériák, köszönhetően a közvetett kitettségüknek a NOS3 aktivációjának tekintetében is kedvezőbb helyzetben vannak, hiszen a NOS3 visszaesés ellenére a jelenlévő fehérje populáció SER1177-es foszforilációja megtartott. Ezáltal a NO fő forrása az artériák esetében feltételezhetően továbbra is a NOS3. Ezzel szemben a vénákban a NOS3 transzkripciós szintű visszaesése mellett jelentősebb az aktivációs útvonalak sérülése. Ennek következtében a vénában indukálódnak a NOS2 és XOR útvonalakhoz köthető menekítő mechanizmusok. El kell ismernünk azonban, hogy oxidatív körülmények között a hasznos NO-szint növelésére tett minden próbálkozás tovább gerjeszti azt az ördögi kört, mely az oxidatív / nitroztatív stresszhez, következésképp pedig a makromolekulák károsodásához vezethet.

A fehérjék, lipidek és a DNS károsodása egyértelműen összefüggésbe hozható a dohányzásból szervezetbe kerülő gyökös tulajdonságú molekulákkal és nehézfémekkel. Ez nem csak a jelátviteli útvonalakat veszélyezteti, hanem bizonyos szint után a sejtek halálát is indukálja. Az oxidatív/nitroztatív stresszhez vezető redox homeosztázis felborulás egyik központi eleme és iniciátora a $O_2^{\cdot -}$ akkumuláció. Az előzőekben rávilágítottunk arra is, hogy a NOS2 aktiváció nem szükségszerűen hasznos a kompenzáció szempontjából. Feltételezéseink szerint az elsődleges kitettségű vénákban megfigyelt makromolekula károsodásokhoz nagyban hozzájárulhat a megnövekedett NOS2 által rövid idő alatt, nagy mennyiségben szintetizált NO. Ez az útvonal

egy erősen oxidatív környezetben inkább a nitroztatív stressz irányába tolhatja el a NO szerepét, nem pedig a biológiailag aktív és hasznos irányba. Ezt megalapozza a vénák esetében megfigyelt magas $O_2^{\cdot -}$ koncentráció, ami mellett nagy valószínűséggel $ONOO^{\cdot -}$ képződik egy spontán reakcióban. Ez az igen reaktív molekula amellett hogy rövid életidejéből fakadóan gyorsan $NO_2^{\cdot -}$ -té bomlik le, nem kíméli az útjába kerülő makromolekulákat sem.²²² A potenciálisan $ONOO^{\cdot -}$ -hez köthető makromolekula nitráció és/vagy oxidáció nyomai a vénákban jelentős mértékben detektálhatóak voltak. A membránkárosodás markereként szolgáló 4-HNE adduktok jelenléte és a fehérjék 3-NT típusú módosítása is jelentős emelkedést mutatott. Utóbbi egyértelműen korrelált a NOS2 növekedéssel is, ami az előző feltételezésünk közvetlen bizonyítékeként szolgálhat. A membránok peroxidatív károsodásával kapcsolatban a nyilvánvaló következmények mellett ismét meg kell említenünk a NOS3 aktivációjához vezető útvonal egyik fontos elemét. A NOS3 aktivációjának kezdeti lépésében a sejtek intakt membránstruktúrája, ezen belül a kaveolák szerepe kulcsfontosságú. Amennyiben ezek a szubcelluláris membrán domének sérülnek, úgy a NO termelés is veszélybe kerülhet.²²³ Ezzel szemben az artériákban makromolekula károsodásra utaló jelek elhanyagolhatóak, feltételezhetően a másodlagos, közvetett expozíciójuk miatt. Ebben az esetben a 4-HNE növekedés a vénákhoz képest igen kismértékű a dohányos mintáinkban. Ezzel párhuzamosan a 3-NT szint a kontroll artériák értékét sem éri el. Ez utóbbi feltételezhetően összefüggésben áll a kismértékű NOS3 csökkenéssel és a NOS2 indukciójának elmaradásával. Kíváncsiak voltunk azonban arra is, hogy az eddigiekben tapasztalt fehérjeszintű változások mennyiben köthetők a transzkripciós mechanizmus sérüléséhez, amit közvetlenül DNS károsodás is eredményezhet. Az örökítőanyag károsodására utaló DNS kettősszalú törések, mind a kontroll, mind pedig a dohányos vénákban detektálhatóak voltak, ám a hibajavításra specializálódott, aktív foszfo-DNS-PKcs szint jelentősen elmaradt a dohányos eredetű endotél sejtekben. Ennek értelmében a hibajavító mechanizmusok sérülést szenvednek, amelynek okát a kettős törések helyén megjelenő γ H2A.X fókuszok mérete magyarázhat. A γ H2A.X fókuszok alapvetően meghatározzák a hibajavításhoz szükséges rendszer összeszerelődésének helyét, és az abban részt vevő fehérjék toborzását. Továbbá a fókuszok mérete összefüggésben

állhat egyfelől a kitettség/károsodás mértékével és a hibajavító mechanizmusok sikerességével.^{224–226} Eredményeink azt mutatták, hogy a dohányos vénákban detektált fókuszok átlagos becsült mérete elmaradt a kontrollhoz viszonyítva, amely arra enged következtetni, hogy a hibajavító apparátus megfelelő összeszerelődése ez esetben gátolt.

A makromolekula károsodások egyértelmű következménye a sejt és szövet szintű degradáció, illetve a sejtek pusztulása. A transzmissziós elektronmikroszkópia során megfigyelt ultrastrukturális változások szintén az ér típusok különböző fokú kitettségére utalnak, mely alátámasztja a molekuláris adatainkat. Az erek endotél rétegében megfigyelt elváltozások jelzik a vénák fokozott mértékű károsodását, amely a toxikus anyagokkal szembeni közvetlen kitettségének tudható be. A vénák esetében számos olyan előrehaladott leépülést figyeltünk meg, amely sejtpusztuláshoz vezet. A sejtmagok kromatin állománya erősen kondenzálódott, elektrondenz képet mutatott és sok esetben megfigyelhettük a sejtmag lobulárisá válását, amely a fragmentáció folyamatának egy korai szakasza. Emellett a sejtalkotó struktúrák és a citoplazma zsugorodása az előző megfigyelésekkel egybevéve azt sugallja, hogy a sejtek kevésbé aktívak transzkripcionálisan. A sejtplazma zsugorodásának hátterében a nagy kiterjedésű vakuólák térfoglalása áll, amelyek az elpusztult sejteket és/vagy sejtalkotókat zárja magába. Ezen felül kizárólag a dohányos vénákban megfigyelt vakuólák belsejében számos elektrondenz részecskét figyeltünk meg. Sajnálatos módon ezek pontos azonosítására nem volt lehetőségünk, de alapvető anyagi tulajdonságaik miatt feltételezzük, hogy a vénába átjutó fémek / fémkomplexek által alakított plakkok lehetnek. A sejtek egyedi fenotipikus elváltozásain felül az endotél réteg jelentős mértékű degradációját figyeltük meg szöveti egység szintjén. Látható az egyes sejtek közötti kapcsolatok felbomlása, illetve a réteg elválása az alapmembrántól. Ennek következményeként gyakorlatilag megszűnik az endotélium által alkotott fizikai gát, és így megnő az erek permeabilitása.

Az ultrastrukturális változások hátterében az extracelluláris mátrix dinamikáját szabályozó MMP-TIMP rendszer egyensúlyának felborulása állhat. A szöveti átrendeződésének kulcsszerepe van az egyedfejlődésben, morfogenezisben, illetve a sérülések kijavításában. Ebből kifolyólag normál

körülmények között ez egy precízen irányított folyamat, amelynek szabályozatlan működése számos CVD esetében megfigyelhető.^{192,227,228} Az MMP aktivitás fő szabályozói az endogén inhibitor TIMP fehérjék, így a szövet sorsának tekintetében a kettő közötti egyensúly meghatározó. Nyugalmi állapotban a mátrix bontó enzimek szintje elhanyagolható a szövetekben, azonban expressziójuk transzkripcionális szinten szabályozódik gyulladásos citokinek, hormonok illetve sejt-sejt és sejt-mátrix interakciók hatására.²²⁹ Munkánk során a kardiovaszkuláris rendszer szempontjából kiemelten fontos MMP-9 és MMP-2, valamint ezek inhibitorait a TIMP-1 és TIMP-2 változásait vizsgáltuk kontroll és dohányos mintacsoportokban.^{230,231} Az MMP-2 és a TIMP-2 szintje mindkét értípusban a detektálási határon mozgott, és nem mutatott különbséget a két mintacsoport között. Ez alapján feltételezzük, hogy ebben a rendszerben az MMP-2 szerepe leginkább a köldökzsínér erek kialakulásának, fejlődésének kezdetén mondható jelentősnek. Az MMP-2 – TIMP-2 páros esetében korábban megfigyelték, hogy szintjük az angiogenesis, illetve a neovaszkularizáció folyamataival mutat pozitív korrelációt.^{232,233} A köldökzsínérben ilyen folyamatok a szerv kifejlődését követően nem történnek, ezáltal az MMP-2 nem érvényesülhet. Ezzel párhuzamosan az MMP-9 – TIMP-1 szintek esetében a dohányos mintákban értípustól függő mintázatot tapasztaltunk. Az artériákban kifejezett növekedést figyeltünk meg mind az MMP-9, mind az inhibitora esetében. Azonban mialatt az MMP-9 szintje közel 2x-esére növekedett, ezt egy felére visszaeső TIMP-1 expresszió követte. Ez alapján egyértelmű, hogy az artériák esetében a fokozott MMP-9 expresszióval szemben a TIMP-1 ellensúlyozása nem tud érvényesülni, amely az ultrastukturális elemzések esetében megfigyelt fenotipikus eltérésekhez vezethet. Ennek tükrében vizsgáltuk a kvantifikált MMP-9/TIMP-1 arányát is, amely szintén az MMP-9 több, mint kétszeres túlsúlyát mutatta. Ennek vizsgálata nemcsak a két fehérje szoros kapcsolata miatt releváns, hanem annak tudatában is egy reális mérőszám, hogy a gátlás során kialakuló komplexekben a fehérjék sztöchiometrikus aránya 1:1.²³⁴ Ezzel szemben a vénák esetében meglepő módon mindkét fehérje esetében csökkenést tapasztaltunk. Ennek hátterében a dohányos rendszer általánosan csökkent transzkripció és transzláció aktivitása állhat, jóllehet ez esetben az MMP-9 szint egy kisebb értékben érintett. Az arányok vizsgálata során a véna esetében

is bizonyítást nyert, hogy az MMP-9 expresszió az általánosan csökkenő tendencia ellenére is meghaladja a TIMP-1 szintjét, ami szöveti degradációhoz vezethet.

A molekuláris és strukturális adatok együttesen arra engednek következtetni, hogy mind a dohányos artériák, mind pedig a vénák esetében sérül az endotéliális funkció, melynek mértéke a toxikus kitettség függvénye. A diszfunkció és a degradációs folyamatok feltételezéseink szerint ok-okozati összefüggésben állhat a sejtek életképességével. Ennek vizsgálatára a magzati fejlődés szempontjából meghatározó és a funkcionális/strukturális szempontból markánsabb változásokat mutató vénákból izoláltuk az endotél sejteket. Továbbá az artériák endotél populációjának szelektív izolációja technikai akadályokba ütközött, ezáltal nehezen kivitelezhető. A sejtek halálának egyik legjellemzőbb folyamata az apoptózis, amely fiziológias folyamatokban is fontos, de patológiás körülmények között jelentősen előtérbe kerül ezen útvonalak aktivitása. Az apoptózis egyik korai ismérve a sejtek kettős membránját alkotó lipidek összetételének/aszimmetriájának megváltozása. Az apoptotikus sejtekben a foszfatidil-szerin a membrán belső felszínéről a külső felszínre transzlokálódik, kvázi exponálódva a sejtfelszínen. A folyamat előrehaladtával a membrán integritása egyre inkább csökken, amely végül sejthalálhoz vezet. A két fázis detektálható és jól elkülöníthető fluorofórral konjugáltatott Annexin V és az intakt membránnal szemben impermeábilis propidium-jodid kombinált alkalmazásával.^{204,235,236} A viabilitás teszt eredményei alapján a kontroll endotél populáció mintegy kétharmada egészségesnek bizonyult és csak egyharmad része mutatott apoptózisra utaló jelet, amit reális arálynak gondolunk figyelembe véve a sejtek természetes halálát. A dohányos HUVEC populációnál azonban a sejteknek mindössze egyharmada volt egészséges, és a maradék kétharmad rész nagyjából egyenlő mértékben oszlott meg a korai illetve a késői apoptózis szakaszai között. Feltételezzük, hogy a korábban megfigyelt rendszerszintű funkcionális visszaesések bizonyos mértékben visszavezethetők az adott sejtpopulációt jellemző életképességre. Összességében tehát az endotéliális diszfunkció feltételezhetően nem az egyéni sejtek generalizált hibájának eredménye, hanem a teljes populációt tekintve a jelentősen csökkent számú egészséges sejt függvénye. Az apoptózis

során aktiválódó molekuláris útvonal, az úgynevezett kaszpáz kaszkád vizsgálatával kívántuk alátámasztani a viabilitási tesztek eredményét. A láncreakció 12 tagja közül a végrehajtó funkcióval rendelkező CASP3 lokalizációját elemeztük. A CASP3 a humán sejtek programozott sejthalálának kulcs mediátora, amely egy proteolitikus hasítást követően aktív transzporttal a sejtmagba vándorol. Itt többek között a kromatin kondenzációját és a DNS fragmentálódást váltják ki, mely a sejtek pusztulásához vezet.^{36–38} Az eredményeink alapján a kontroll és dohányos véna endotél sejtek citoplazmatikus és sejtmagi lokalizációjú CASP3 megoszlást vizsgáltuk, melynek során a citoplazmát tekintve nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést. Mindazonáltal a CASP3 jelenléte önmagában még nem feltétlenül jelent biztos apoptózist. Azonban a sejtmagot tekintve a dohányos mintáink esetében a CASP3 sejtmagi transzlokációjának gyakorisága jóval meghaladta a kontroll értéket. Ezen adatok alátámasztják a viabilitási tesztek eredményét, és megerősítik, hogy a dohányos vénákban igen aktív apoptotikus aktivitás, és ezzel járó sejtpusztulás történik.

Fontos kiemelnünk, hogy a nagymértékű sejtpusztulás ellenére a rendszer mégis működőképes, és összességében élőnek tekinthető a funkcionális sérülések ellenére is. Ezért munkám második nagy egységként a kontroll és dohányos eredetű köldökzsinór vénák reakció készségét hasonlítottuk össze a transzkripció szintjén egy *ex vivo* rendszerben. Ehhez izolált teljes ereket hő, valamint kombinált (hő+Cd²⁺) stressznek tettünk ki. Kiindulási feltevésünk az volt, hogy a dohányos minták válaszreakciói elmaradhatnak a kontrollokhoz képest, amely mögött két okot feltételeztünk. Egyfelől úgy véltük, hogy a dohányos véna esetén megfigyelt morfológiai és strukturális változások együtt járnak a transzkripció mechanizmusok általános sérülésével. Másfelől pedig a Cd²⁺ kezelés esetében arra számítottunk, hogy a dohányos csoport reakciója kevésbé lesz kifejezett a kontroll mintákhoz képest. A kontroll vénák számára a Cd²⁺ egy újonnan megjelenő stresszfaktort jelent, ezzel szemben a dohányos rendszer a terhesség során már találkozhatott és így folyamatos expozícióba került a nehézfémekkel.

Ennek megfelelően az eredményeinket is kétféle megközelítésből vizsgáltuk. Elsőként a kezeletlen minták adott génre vonatkoztatott alap expresszióját hasonlítottuk össze. Az *mt3* kivételével az összes gén esetében

azt tapasztaltuk (*hsp90*, *mmp-9*, *timp-1*, *mt1e*, *mt2a*), hogy a kezeletlen dohányos vénákban alacsonyabban expresszálódnak. Ez feleltethetőleg alátámasztja azon elképzelésünket is, mely szerint a dohányos vénát érő közvetlen károsító hatások nemcsak hatással vannak, de egy általánosan csökkent transzkripció mechanizmushoz vezetnek. Ezzel párhuzamosan feltételezzük, hogy a folyamatos (több hónapon át tartó) stresszhatás miatt ezen gének expressziós szintje soha nem is érte el a kontroll szintet. Az MT3 esetében fontos figyelembe venni, hogy ezen izoforma évtizedeken át egy központi idegrendszer és tesztisz specifikus izoformaként jelent meg az irodalomban.²³⁹ Schulkens és munkatársai 2014-ben HUVEC sejtekben is kimutatták az MT3 mRNS jelenlétét *in vitro*.³⁸ Mindazonáltal az általunk használt modell rendszerben, illetve a kardiovaszkuláris rendszerben *in vivo* betöltött viselkedése és szerepének fontossága egyelőre nem ismert. Eredményeink alapján azonban feltételezhetők, hogy az *mt3* alap expressziós szintje valamilyen módon független a másik két izoformától, és a dohányos vénában észlelt hatszoros alapszint egyértelmű bizonyítéka lehet a mintacsoport korábbi nehézfém expozíciójának. Ennek pontos magyarázata az MT3 biológiai funkciójával kapcsolatos kevés adat miatt nagy kihívást jelent, de az MT1E és MT2A-tól eltérő alap funkcióin keresztül el tudunk indulni. Ez utóbbi két izoforma számos szövetben kismértékben, konstitutívan expresszálódik, emellett oxidatív stressz vagy akár alacsony koncentrációjú nehézfém terhelés hatására jelentős mértékben indukálódnak. Ezzel szemben az MT3-at sokáig a nem-indukálható metallotioneinek közé sorolták, jóllehet azóta számos adat bizonyítja, hogy részben indukálhatóak, amelynek egyetlen függvénye a nehézfém koncentráció.^{240–242} Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy a predomináns MT1 és MT2 izoformák már a terhesség korai szakaszában indukálódhatnak transzkripció szinten a dohányos vénák endotél sejteiben. A transzlációt követően pedig a fehérjék állandó jelenléte hozzájárulhat a nehézfém tolerancia kialakításához. Ezek mellett a csak részben indukálható és kevésbé fémérzékeny MT3 csak a terhesség későbbi szakaszaiban jelenik meg a folyamatos terhelés miatt akkumulálódó fémek hatására. Mindezek ellenére az alap expressziós értékeket összehasonlítva az *mt1e* és *mt2a* körülbelül azonos mértékben, de nagyságrendekkel dominánsabb szereplő az *mt3*-nál.

A *hsp90* esetében arra számítottunk, hogy a dohányos, azaz stresszelt

mintáinkban lesz magasabb az alap expresszió. Ezzel szemben a valójában tapasztalt alap mRNS szint a dohányosokban a kontrollnak körülbelül a negyede volt. Ennek magyarázatához túl kell lépni a HSP90 köztudott hősokk és dajkafehérje szerepén, és számításba kell venni, hogy számos egyéb biológiai folyamat kulcs szabályozója is lehet. Tumoros szövetekben megfigyelték, hogy a HSP90 magas expressziója hozzájárul a rákos sejtek proliferációjához, és ezzel párhuzamosan egyfajta menekítésként érvényesül az antiapoptotikus válasz folyamatokban.²⁴³ Ennek háttere, hogy a HSP90 β egyik kliens fehérjéje az antiapoptotikus válaszban alapvető szereppel bíró Bcl-2. A két fehérje között kialakuló interakcióról korábban kimutatták, hogy megléte alapvető feltétele a Bcl-2 antiapoptotikus hatásának. Amennyiben a komplex képzés valamilyen okból gátolt, akkor az kaszpáz aktivációhoz és ER stressz indukálta sejthalálhoz vezet.^{244,245} A másik oldalról pedig érvényesül egy negatív visszacsatolás is. Ha az apoptotikus folyamatok előtérbe kerülnek, például megnövekedett ROS hatására, akkor a kaszkád egyik iniciátora (kaspáz-10) hasítja a HSP90 fehérjét, amellyel megszünteti annak antiapoptotikus/chaperon funkcióját.²⁴⁶ Ezek alapján jelen eredményeinket összevetve az eddigiekkel feltételezhetjük, hogy a dohányos vénák alacsony *hsp90* mRNS szintje egyfelől az erősen aktív apoptotikus útvonal negatív visszacsatolásaként értelmezhető. Másfelől pedig közvetetten, a dohányos mintákban talált nagy mennyiségű apoptotikus sejt miatt keletkező hiányként tekinthetünk erre a csökkenésre.

A hőérzékeny *hsp90* esetében a 60 perces hősokk mind a kontroll, mind a dohányos vénában körülbelül azonos mértékű indukciót váltott ki. Ebből arra következtethetünk, hogy a hőmérséklet hirtelen emelése mindkét mintacsoportot egyformán új ingerként éri, amire adekvát válaszként jelentkezik a *hsp90* indukciója. Amennyiben a rendszerbe behozzuk a Cd²⁺-ot is, a két mintacsoport indukciója egymástól elmarad, ami egyértelműen a nehézfém hatásának tudható be. Ebben az esetben a kontroll *hsp90* erőteljes indukciója mellett a dohányos hőstresszhez viszonyított enyhe indukciója a 0,5 ng/ μ L-es Cd²⁺ koncentrációval szembeni korábbi adaptációra utal. Mindazonáltal, ahogyan azt többi gén esetében is láttuk a 2,5 ng/ μ L-es koncentráció 60 perc elteltével már toxikusnak minősült véleményünk szerint. Ennélfogva nem is történik jelentős indukció, illetve sok esetben abszolút transzkripció

gátlás/visszaesés történhetett a kezelés végére. Ezek a koncentráció értékek magukért beszélnek, és az *mt3* kivételével nem kívánom részletezni az eredmények hátterét.

Az *mmp-9*, *timp-1* esetében erőteljes indukciókat tapasztaltunk a kezelések hatására. Mindazonáltal az *mmp-9* indukcióját nem arányosan követi a *timp-1* indukciója, aminek hátterében valószínűsíthetően a csökkent alap expresszió ellenére is nagyságrendekkel magasabb *timp-1* mRNS koncentráció állhat. Az egyes kezelések hatására látható, hogy a kontroll mintákban az indukció arányait tekintve az *mmp-9* és *timp-1* nagyon hasonló mintázatot mutat. Ezzel szemben a dohányos mintákban csak az *mmp-9* indukciója mondható jelentősnek, de a *hsp90*-hez hasonlóan a rendszerbe bevitt pluszban bevitt Cd^{2+} hatására adott extra válasz nem volt jelentős.

A metallothionein gének indukciója a kezelések hatására hasonló logikát követ, mint amit az alap expresszió esetében egyszer már feltételeztünk. Mindhárom izoforma transzkripciója erősen indukálódik mind hőmérséklet, mind pedig a Cd^{2+} hatására a kontroll vénákban. Az egyes kezelési pontok között arányos indukciós változások pedig szintén hasonló mintázatot mutatnak. Ezzel szemben a dohányos vénákban sem az *mt1e*, sem az *mt2a* nem mutatott indukciót egyik esetben sem. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a korábbi nehézfém expozíciók hatására adaptáció következett be, ami ezen két izoforma részéről már nem igényelt többlet indukciót. Az *mt3* esetében a kontroll az előző két izoformánál megfigyelt indukciós mintázathoz viszonyítva hasonló módon viselkedett, de a többlet Cd^{2+} hatására rendkívül nagymértékű indukciót kaptunk. Jóllehet az alap kiindulási értékekhez képest ez normálisnak tekinthető véleményünk szerint. Az előző két izoformával ellentétben jelentősnek ugyan nem mondható indukciót kaptunk a dohányos vénákban is. Ez alapján a korábban már általunk feltételezett *mt3* kései indukcióra vonatkozó szerepét szeretnénk fenntartani. Ezt tovább erősíti a magasabb (2,5ng/ μL) koncentrációjú Cd^{2+} esetében is megtörtént indukció, amire a többi gén esetében nem láttunk példát, és azok tekintetében toxikusnak véljük ezt az értéket. A kontroll *mt3* esetében a visszaesés ellenére is magas indukciós értéket kaptunk, a dohányos esetében pedig egy markáns visszaesést. Ez a két eredmény feltételezéseink szerint mindkét elméletünket megerősíti. Egyfelől az *mt3* parciális indukálhatósága a többi izoformával szemben a magasabb Cd^{2+}

koncentrációra tűnik érzékenyebbnek, habár az indukció mértékét figyelembe véve ez a koncentráció egyidejűleg részben gátolja is a transzkripciót. Másfelől ez a koncentráció a dohányos vénákban alapvetően jelen lévő és ahhoz egy plusz többletként adódó kezelési koncentráció már az *mt3* transzkripcióját is teljes mértékben gátolhatja.

Összességében tehát elmondhatjuk, hogy az artériák és vénák endotéliumának összehasonlító vizsgálata során, hogy terhesség alatti dohányzás ér specifikus változásokat indukált a köldökzsín erekben. Ezen állapotok feltételezhetően tükrözik a prenatális fejlődés *in vivo* körülményeit. Továbbá eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy egy erősen hipoxiás környezetben, ahol alacsony a biológiailag hozzáférhető NO mennyisége, és megemelkedik a nitrit-nitrát szint, ott előtérbe kerülhet a XOR protektív szerepe. Úgy gondoljuk, hogy munkánk jelentősége abban rejlik, hogy ezen eredményekkel hozzájárulhatunk a méhen belüli toxikus expozíció során bekövetkező molekuláris változások jobb megértéséhez. Az ebben érintett útvonalak mélyreható ismerete pedig újabb terápiás célpontokat határozhat meg a klinikum és az alkalmazott kutatások számára a jövőben.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném hálás köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, **Dr. Hermeszt Editnek**, aki az elmúlt 7 év során nemcsak segítette a munkámat és szakmai fejlődésemet, hanem mindezekon felül végtelen türelemmel és bizalommal egyengette utamat, és el nem múló szeretettel köszönöm a gondolatébresztő beszélgetéseket és „anyai” jótanácsait.

Köszönettel tartozom továbbá **Prof. Dr. Boros Imre** és **Dr. Bodai László** tanszékvezetőknek, és a tanszékünk minden dolgozójának, hogy lehetővé tették és segítették a Biokémiai és Molekuláris Tanszéken való kutatásaim elvégzését. Továbbá szeretném megköszönni a kísérleteimben nyújtott szakmai és gyakorlati segítségét **Dr. Maléth Józsefnek**, **Ördögné Dr. Kolbert Zsuzsannának** és **Dr. Pankotai Tibornak**. Köszönöm a kriosztátos metszetek elkészítését **Arany Katalinnak**, illetve a TEM felvételek elkészítésében és értékelésében nyújtott nélkülözhetetlen segítséget **Dr. Bódi Nikolettnek** és **Dr. Bagyánszki Máriának**.

Szeretném megköszönni **Prof. Dr. Orvos Hajnalkának** és az SZTE ÁOK - Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika minden dolgozójának, akik a kísérletekhez szükséges mintagyűjtést végezték.

Hálás köszönettel tartozom kutatócsoportunk valamennyi korábbi és jelenlegi tagjának, beleértve lelkes szakdolgozóimat **Szántó Pétert** és **Márton Ágnest**, akik rengeteg segítségét nyújtottak a kísérletek elvégzésében és értékelésében. Külön szeretném megköszönni **Dugmonits Krisztinának** a barátságát és a kifogyhatatlan bátorítását.

Köszönet illeti **Dr. Sinka Ritát** és **Dr. Villányi Zoltánt**, hogy rövid határidőn belül vállalták dolgozatom elbírálását és kérdéseikkel, javaslataikkal emelték annak színvonalát.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, különösen **Édesanyámnak** a fáradhatatlanul pozitív hozzáállását és örök támogatását. Szeretettel köszönöm az **Erdősi családnak** és a **barátaimnak**, hogy minden helyzetben mellettem álltak, és támogattak abban, hogy ez a dolgozat elkészülhessen.

És köszönöm *Neked a Mindent*, és azt a bizonyos *Kimondhatatlant*.

A dolgozat megvalósítását a „Szív- és vázizom-kutatások az alkalmazkodás, regeneráció és teljesítőképesség javítása érdekében (MYOTeam)” GINOP 2.3.2-15-2016-00040 számú pályázat támogatta.



8. IRODALOMJEGYZÉK

1. GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* **388**, 1459–1544 (2016).
2. Roth, G. A. *et al.* Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J. Am. Coll. Cardiol.* **70**, 1–25 (2017).
3. Yusuf, S. *et al.* Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* **364**, 937–952 (2004).
4. Crofton, J. & Bjartveit, K. Smoking as a risk factor for chronic airways disease. *Chest* **96**, 307S-312S (1989).
5. Boyle, P. Cancer, cigarette smoking and premature death in Europe: a review including the Recommendations of European Cancer Experts Consensus Meeting, Helsinki, October 1996. *Lung Cancer* **17**, 1–60 (1997).
6. Glantz, S. A. & Parmley, W. W. Passive smoking and heart disease. Epidemiology, physiology, and biochemistry. *Circulation* **83**, 1–12 (1991).
7. Law, M. R., Morris, J. K. & Wald, N. J. Environmental tobacco smoke exposure and ischaemic heart disease: an evaluation of the evidence. *BMJ* **315**, 973–980 (1997).
8. Commar, A., Prasad, V. K., Tursan d'Espaignet, E., Wolfenden, L. & Weltgesundheitsorganisation. *WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking 2000-2025*. (2018).
9. Pryor, W. A. & Stone, K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **686**, 12–27; discussion 27-28 (1993).
10. Bernhard, D. *et al.* Cigarette smoke metal-catalyzed protein oxidation leads to vascular endothelial cell contraction by depolymerization of microtubules. *The FASEB Journal* **19**, 1096–1107 (2005).
11. Zhang, A.-S. & Enns, C. A. Iron homeostasis: recently identified proteins provide insight into novel control mechanisms. *J. Biol. Chem.* **284**, 711–715 (2009).
12. Stadler, N., Lindner, R. A. & Davies, M. J. Direct detection and quantification of transition metal ions in human atherosclerotic plaques: evidence for the presence of elevated levels of iron and copper. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 949–954 (2004).
13. Bernhard, D., Rossmann, A. & Wick, G. Metals in cigarette smoke. *IUBMB Life* **57**, 805–809 (2005).
14. ATSDR - Toxicological Profile: Cadmium. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=48&tid=15>.
15. Squier, C. A. The permeability of oral mucosa. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **2**, 13–32 (1991).
16. Goyer, R. A. Mechanisms of lead and cadmium nephrotoxicity. *Toxicol. Lett.* **46**, 153–162 (1989).
17. Schultze, B., Lind, P. M., Larsson, A. & Lind, L. Whole blood and serum concentrations of metals in a Swedish population-based sample. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **74**, 143–148 (2014).
18. Stohs, S. J. & Bagchi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 321–336 (1995).

19. Navas-Acien, A. *et al.* Lead, cadmium, smoking, and increased risk of peripheral arterial disease. *Circulation* **109**, 3196–3201 (2004).
20. Everett, C. J. & Frithsen, I. L. Association of urinary cadmium and myocardial infarction. *Environ. Res.* **106**, 284–286 (2008).
21. Tellez-Plaza, M. *et al.* Cadmium exposure and incident cardiovascular disease. *Epidemiology* **24**, 421–429 (2013).
22. Ponteva, M., Elomaa, I., Bäckman, H., Hansson, L. & Kilpiö, J. Blood cadmium and plasma zinc measurements in acute myocardial infarction. *Eur J Cardiol* **9**, 379–391 (1979).
23. Eum, K.-D., Lee, M.-S. & Paek, D. Cadmium in blood and hypertension. *Sci. Total Environ.* **407**, 147–153 (2008).
24. Fenton, H. J. H. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc., Trans.* **65**, 899–910 (1894).
25. Haber, F. & Weiss, J. Über die Katalyse des Hydroperoxydes. *Naturwissenschaften* **20**, 948–950 (1932).
26. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. (Oxford University Press, 2015).
27. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**, 1–40 (2006).
28. Stadtman, E. R. Role of oxidant species in aging. *Curr. Med. Chem.* **11**, 1105–1112 (2004).
29. Radi, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 4003–4008 (2004).
30. Bartesaghi, S., Romero, N. & Radi, R. Nitric oxide and derived oxidants pp. 43-74.
http://www.novapublishers.org/catalog/product_info.php?products_id=30902.
31. Marnett, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* **424**, 83–95 (1999).
32. Meerson, F. Z., Kagan, V. E., Kozlov YuP, null, Belkina, L. M. & Arkhipenko YuV, null. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. *Basic Res. Cardiol.* **77**, 465–485 (1982).
33. Siems, W. G., Grune, T. & Esterbauer, H. 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine. *Life Sci.* **57**, 785–789 (1995).
34. Aziz, M. A., Diab, A. S. & Mohammed, A. A. Antioxidant Categories and Mode of Action. *Antioxidants* (2019) doi:10.5772/intechopen.83544.
35. *Metallothioneins and Related Chelators.* (2009). doi:10.1039/9781847559531.
36. Takahashi, S. Molecular functions of metallothionein and its role in hematological malignancies. *J Hematol Oncol* **5**, 41 (2012).
37. Cherian, M. G., Jayasurya, A. & Bay, B.-H. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **533**, 201–209 (2003).
38. Schulken, I. A. *et al.* Expression, Regulation and Function of Human Metallothioneins in Endothelial Cells. *J Vasc Res* **51**, 231–238 (2014).

39. Balamurugan, K. & Schaffner, W. 2: Regulation of Metallothionein Gene Expression. in *Metallothioneins and Related Chelators* 31–49 (2009). doi:10.1039/9781847559531-00031.
40. Georgopoulos, C. & Welch, W. J. Role of the Major Heat Shock Proteins as Molecular Chaperones. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **9**, 601–634 (1993).
41. Macario, A. J. L. & de Macario, E. C. Sick Chaperones, Cellular Stress, and Disease. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra050111>
<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra050111> (2009)
doi:10.1056/NEJMra050111.
42. Sghaier, H., Ai, T. L. H., Horiike, T. & Shinozawa, T. Molecular Chaperones: Proposal of a Systematic Computer-Oriented Nomenclature and Construction of a Centralized Database. *In Silico Biology* **4**, 311–322 (2004).
43. Williams, G. T. & Morimoto, R. I. Maximal stress-induced transcription from the human HSP70 promoter requires interactions with the basal promoter elements independent of rotational alignment. *Molecular and Cellular Biology* **10**, 3125 (1990).
44. Wu, C. Heat Shock Transcription Factors: Structure and Regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 441–469 (1995).
45. Morimoto, R. I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* **12**, 3788–3796 (1998).
46. Åkerfelt, M., Morimoto, R. I. & Sistonen, L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 545–555 (2010).
47. Morimoto, R. I. The Heat Shock Response: Systems Biology of Proteotoxic Stress in Aging and Disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **76**, 91–99 (2011).
48. Brandvold, K. R. & Morimoto, R. I. The chemical biology of molecular chaperones - Implications for modulation of proteostasis. *Journal of molecular biology* **427**, 2931 (2015).
49. Brugge, J. S., Erikson, E. & Erikson, R. L. The specific interaction of the Rous sarcoma virus transforming protein, pp60src, with two cellular proteins. *Cell* **25**, 363–372 (1981).
50. Taipale, M. *et al.* Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell* **150**, 987–1001 (2012).
51. Joab, I. *et al.* Common non-hormone binding component in non-transformed chick oviduct receptors of four steroid hormones. *Nature* **308**, 850–853 (1984).
52. Schuh, S. *et al.* A 90,000-dalton binding protein common to both steroid receptors and the Rous sarcoma virus transforming protein, pp60v-src. *J. Biol. Chem.* **260**, 14292–14296 (1985).
53. Sanchez, E. R., Toft, D. O., Schlesinger, M. J. & Pratt, W. B. Evidence that the 90-kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein. *J. Biol. Chem.* **260**, 12398–12401 (1985).
54. Minet, E. *et al.* Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1 α -Hsp90 interaction. *FEBS Lett.* **460**, 251–256 (1999).
55. Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D. F. & Voellmy, R. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90

- complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* **94**, 471–480 (1998).
56. Karmazyn, M., Mailer, K. & Currie, R. W. Acquisition and decay of heat-shock-enhanced postischemic ventricular recovery. *Am. J. Physiol.* **259**, H424–431 (1990).
 57. Finnemore, A. & Groves, A. Physiology of the fetal and transitional circulation. *Semin Fetal Neonatal Med* **20**, 210–216 (2015).
 58. Morton, S. U. & Brodsky, D. Fetal Physiology and the Transition to Extrauterine Life. *Clin Perinatol* **43**, 395–407 (2016).
 59. Burton, G. J., Fowden, A. L. & Thornburg, K. L. Placental Origins of Chronic Disease. *Physiol. Rev.* **96**, 1509–1565 (2016).
 60. Wooding, P. & Burton, G. *Comparative Placentation: Structures, Functions and Evolution*. (Springer-Verlag, 2008). doi:10.1007/978-3-540-78797-6.
 61. Atkinson, D. E., Boyd, R. D. H., Sibley, C. P. & Neill, J. D. Placental Transfer. *Physiology of Reproduction* 2787–2846 (2006).
 62. Brett, K. E., Ferraro, Z. M., Yockell-Lelievre, J., Gruslin, A. & Adamo, K. B. Maternal-fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: the role of the placenta. *Int J Mol Sci* **15**, 16153–16185 (2014).
 63. Carter, A. M. Evolution of placental function in mammals: the molecular basis of gas and nutrient transfer, hormone secretion, and immune responses. *Physiol. Rev.* **92**, 1543–1576 (2012).
 64. Zeldovich, V. B. *et al.* Placental syncytium forms a biophysical barrier against pathogen invasion. *PLoS Pathog.* **9**, e1003821 (2013).
 65. Qanungo, S. & Mukherjee, M. Ontogenic profile of some antioxidants and lipid peroxidation in human placental and fetal tissues. *Mol. Cell. Biochem.* **215**, 11–19 (2000).
 66. Wier, P. J., Miller, R. K., Maulik, D. & DiSant'Agnese, P. A. Toxicity of cadmium in the perfused human placenta. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **105**, 156–171 (1990).
 67. Kippler, M. *et al.* Accumulation of cadmium in human placenta interacts with the transport of micronutrients to the fetus. *Toxicol. Lett.* **192**, 162–168 (2010).
 68. Needham, L. L. *et al.* Partition of environmental chemicals between maternal and fetal blood and tissues. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 1121–1126 (2011).
 69. Barr, D. B., Bishop, A. & Needham, L. L. Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternal-fetal unit. *Reprod. Toxicol.* **23**, 260–266 (2007).
 70. Włoch, S., Pałasz, A. & Kamiński, M. Active and passive transport of drugs in the human placenta. *Ginekol. Pol.* **80**, 772–777 (2009).
 71. Mori, M. *et al.* The cytotrophoblast layer of human chorionic villi becomes thinner but maintains its structural integrity during gestation. *Biol. Reprod.* **76**, 164–172 (2007).
 72. Naeye, R. L. Functionally important disorders of the placenta, umbilical cord, and fetal membranes. *Hum. Pathol.* **18**, 680–691 (1987).
 73. Nasiell, J., Papadogiannakis, N., Löf, E., Elofsson, F. & Hallberg, B. Hypoxic ischemic encephalopathy in newborns linked to placental and umbilical cord abnormalities. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* **29**, 721–726 (2016).

74. Sobrevia, L. Placental metabolism and disease. *Placenta* **70**, 60–62 (2018).
75. Ferguson, V. L. & Dodson, R. B. Bioengineering aspects of the umbilical cord. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **144**, S108–S113 (2009).
76. Klein, J. & Meyer, F. A. Tissue structure and macromolecular diffusion in umbilical cord immobilization of endogenous hyaluronic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **755**, 400–411 (1983).
77. Blanco, M. V. *et al.* Histomorphometry of umbilical cord blood vessels in preeclampsia. *J Clin Hypertens (Greenwich)* **13**, 30–34 (2011).
78. Dawes, G. S. The umbilical circulation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **84**, 1634–1648 (1962).
79. Manuel Barrios Arpi, L. Histology of Umbilical Cord in Mammals. in *Histology* (eds. Heinbockel, T. & D.C. Shields, V.) (IntechOpen, 2019). doi:10.5772/intechopen.80766.
80. Fox, S. B. & Khong, T. Y. Lack of innervation of human umbilical cord. An immunohistological and histochemical study. *Placenta* **11**, 59–62 (1990).
81. Sadler, T. W. & Langman, J. *Langman's medical embryology*. (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2012).
82. Kliche, K., Jeggle, P., Pavenstädt, H. & Oberleithner, H. Role of cellular mechanics in the function and life span of vascular endothelium. *Pflugers Arch.* **462**, 209–217 (2011).
83. Pintican, D., Poienar, A. A., Strilciuc, S. & Miha, D. Effects of maternal smoking on human placental vascularization: A systematic review. *Taiwan J Obstet Gynecol* **58**, 454–459 (2019).
84. Piasek, M., Henson, M. C., Blanuša, M. & Kostial, K. Assessment of Steroid Disruption and Metal Concentrations in Human Placenta: Effects of Cigarette Smoking. *Smoking and Health Research Frontiers* 119–161 (2007).
85. Chelchowska, M., Ambroszkiewicz, J., Gajewska, J., Laskowska-Klita, T. & Leibschang, J. The effect of tobacco smoking during pregnancy on plasma oxidant and antioxidant status in mother and newborn. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **155**, 132–136 (2011).
86. Aycicek, A. & Ipek, A. Maternal active or passive smoking causes oxidative stress in cord blood. *Eur. J. Pediatr.* **167**, 81–85 (2008).
87. Pizent, A. *et al.* Cigarette Smoking during Pregnancy: Effects on Antioxidant Enzymes, Metallothionein and Trace Elements in Mother-Newborn Pairs. *Biomolecules* **10**, 892 (2020).
88. Ray, P. D., Yosim, A. & Fry, R. C. Incorporating epigenetic data into the risk assessment process for the toxic metals arsenic, cadmium, chromium, lead, and mercury: strategies and challenges. *Front Genet* **5**, 201 (2014).
89. Rakyan, V. & Whitelaw, E. Transgenerational epigenetic inheritance. *Curr. Biol.* **13**, R6 (2003).
90. Reik, W., Dean, W. & Walter, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**, 1089–1093 (2001).
91. Tang, W. & Ho, S. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. *Rev Endocr Metab Disord* **8**, 173–182 (2007).
92. Hackshaw, A., Rodeck, C. & Boniface, S. Maternal smoking in pregnancy and birth defects: a systematic review based on 173 687 malformed cases and 11.7 million controls. *Hum. Reprod. Update* **17**, 589–604 (2011).

93. Florescu, A. *et al.* Methods for quantification of exposure to cigarette smoking and environmental tobacco smoke: focus on developmental toxicology. *Ther Drug Monit* **31**, 14–30 (2009).
94. Morris, C. V., DiNieri, J. A., Szutorisz, H. & Hurd, Y. L. Molecular mechanisms of maternal cannabis and cigarette use on human neurodevelopment. *Eur. J. Neurosci.* **34**, 1574–1583 (2011).
95. Sadeu, J. C. & Foster, W. G. Cigarette smoke condensate exposure delays follicular development and function in a stage-dependent manner. *Fertil. Steril.* **95**, 2410–2417 (2011).
96. Feltes, B. C., de Faria Poloni, J., Notari, D. L. & Bonatto, D. Toxicological effects of the different substances in tobacco smoke on human embryonic development by a systems chemo-biology approach. *PLoS ONE* **8**, e61743 (2013).
97. Duester, G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* **134**, 921–931 (2008).
98. Daftary, G. S. & Taylor, H. S. Endocrine regulation of HOX genes. *Endocr. Rev.* **27**, 331–355 (2006).
99. Beratis, N. G., Panagoulas, D. & Varvarigou, A. Increased blood pressure in neonates and infants whose mothers smoked during pregnancy. *J. Pediatr.* **128**, 806–812 (1996).
100. Blake, K. V. *et al.* Maternal cigarette smoking during pregnancy, low birth weight and subsequent blood pressure in early childhood. *Early Hum. Dev.* **57**, 137–147 (2000).
101. Correa, A., Levis, D. M., Tinker, S. C. & Cragan, J. D. Maternal cigarette smoking and congenital heart defects. *J. Pediatr.* **166**, 801–804 (2015).
102. Lambers, D. S. & Clark, K. E. The maternal and fetal physiologic effects of nicotine. *Semin. Perinatol.* **20**, 115–126 (1996).
103. Slotkin, T. A. Fetal nicotine or cocaine exposure: which one is worse? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **285**, 931–945 (1998).
104. Xiao, D., Huang, X., Lawrence, J., Yang, S. & Zhang, L. Fetal and neonatal nicotine exposure differentially regulates vascular contractility in adult male and female offspring. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **320**, 654–661 (2007).
105. Lawrence, J. *et al.* Prenatal nicotine exposure increases heart susceptibility to ischemia/reperfusion injury in adult offspring. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **324**, 331–341 (2008).
106. Organization, W. H. & Fund (UNICEF), U. N. C. *Low birthweight: country, regional and global estimates.* (World Health Organization, 2004).
107. Aljunaidy, M. M., Morton, J. S., Cooke, C.-L. M. & Davidge, S. T. Prenatal hypoxia and placental oxidative stress: linkages to developmental origins of cardiovascular disease. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **313**, R395–R399 (2017).
108. Morton, J. S., Cooke, C.-L. & Davidge, S. T. In Utero Origins of Hypertension: Mechanisms and Targets for Therapy. *Physiol. Rev.* **96**, 549–603 (2016).
109. Förstermann, U. & Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* **33**, 829–837, 837a–837d (2012).
110. Palmer, R. M., Ferrige, A. G. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524–526 (1987).

111. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. & Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 9265–9269 (1987).
112. Rees, D. D., Palmer, R. M. & Moncada, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 3375–3378 (1989).
113. Stuehr, D. J. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1411**, 217–230 (1999).
114. Shimizu, Y., Sakai, M., Umemura, Y. & Ueda, H. Immunohistochemical Localization of Nitric Oxide Synthase in Normal Human Skin: Expression of Endothelial-type and Inducible-type Nitric Oxide Synthase in Keratinocytes. *The Journal of Dermatology* **24**, 80–87 (1997).
115. Roberts, P. *et al.* The physiological expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human colon. *Journal of Clinical Pathology* **54**, 293 (2001).
116. Asano, K. *et al.* Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 10089 (1994).
117. Morrissey, J. J. *et al.* Location of an inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney. *Kidney International* **45**, 998–1005 (1994).
118. Park, C.-S., Park, R. & Krishna, G. Constitutive expression and structural diversity of inducible isoform of nitric oxide synthase in human tissues. *Life Sciences* **59**, 219–225 (1996).
119. Oliveira-Paula, G. H., Lacchini, R. & Tanus-Santos, J. E. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene* **575**, 584–599 (2016).
120. Alderton, W. K., Cooper, C. E. & Knowles, R. G. Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition. **23** (2001).
121. Nathan, C. & Xie, Q. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* **78**, 915–918 (1994).
122. Marletta, M. A. Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis. *Cell* **78**, 927–930 (1994).
123. Knowles, R. G. & Moncada, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal* **298**, 249 (1994).
124. Venema, R. C., Ju, H., Zou, R., Ryan, J. W. & Venema, V. J. Subunit Interactions of Endothelial Nitric-oxide Synthase COMPARISONS TO THE NEURONAL AND INDUCIBLE NITRIC-OXIDE SYNTHASE ISOFORMS. *J. Biol. Chem.* **272**, 1276–1282 (1997).
125. Venturini, G., Colasanti, M., Fioravanti, E., Bianchini, A. & Ascenzi, P. Direct Effect of Temperature on the Catalytic Activity of Nitric Oxide Synthases Types I, II, and III. *Nitric Oxide* **3**, 375–382 (1999).
126. *Nitric Oxide and Inflammation*. (Birkhäuser Basel, 2001). doi:10.1007/978-3-0348-8241-5.
127. Shaul, P. W. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 749–774 (2002).
128. Sessa, W. C. eNOS at a glance. *Journal of Cell Science* **117**, 2427–2429 (2004).

129. Ju, H., Zou, R., Venema, V. J. & Venema, R. C. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 18522–18525 (1997).
130. Segal, S. S., Brett, S. E. & Sessa, W. C. Codistribution of NOS and caveolin throughout peripheral vasculature and skeletal muscle of hamsters. *Am. J. Physiol.* **277**, H1167–1177 (1999).
131. Kondrikov, D. et al. β -Actin Association with Endothelial Nitric-oxide Synthase Modulates Nitric Oxide and Superoxide Generation from the Enzyme. *J Biol Chem* **285**, 4319–4327 (2010).
132. Kondrikov, D., Elms, S., Fulton, D. & Su, Y. eNOS- β -Actin Interaction Contributes to Increased Peroxynitrite Formation during Hyperoxia in Pulmonary Artery Endothelial Cells and Mouse Lungs. *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 35479 (2010).
133. Straub, A. C. et al. Hemoglobin α / eNOS Coupling at Myoendothelial Junctions is Required for Nitric Oxide Scavenging During Vasoconstriction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**, 2594–2600 (2014).
134. Aoyagi, M., Arvai, A. S., Tainer, J. A. & Getzoff, E. D. Structural basis for endothelial nitric oxide synthase binding to calmodulin. *EMBO J* **22**, 766–775 (2003).
135. Takahashi, S. & Mendelsohn, M. E. Synergistic Activation of Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS) by HSP90 and Akt CALCIUM-INDEPENDENT eNOS ACTIVATION INVOLVES FORMATION OF AN HSP90-Akt-CaM-BOUND eNOS COMPLEX. *J. Biol. Chem.* **278**, 30821–30827 (2003).
136. Dedio, J. et al. NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. *The FASEB Journal* **15**, 79–89 (2001).
137. Matsumoto, K. et al. The ECS(PSB) E3 ubiquitin ligase is the master regulator of the lifetime of inducible nitric-oxide synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **409**, 46–51 (2011).
138. Shu, X. et al. Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation. *Cell Mol Life Sci* **72**, 4561–4575 (2015).
139. Fisslthaler Beate, Loot Annemarieke E., Mohamed Annisuddin, Busse Rudi & Fleming Ingrid. Inhibition of Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity by Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 in Response to Fluid Shear Stress and Insulin. *Circulation Research* **102**, 1520–1528 (2008).
140. Michell, B. J. et al. Coordinated Control of Endothelial Nitric-oxide Synthase Phosphorylation by Protein Kinase C and the cAMP-dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 17625–17628 (2001).
141. Drew, B. G., Fidge, N. H., Gallon-Beaumier, G., Kemp, B. E. & Kingwell, B. A. High-density lipoprotein and apolipoprotein AI increase endothelial NO synthase activity by protein association and multisite phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 6999 (2004).
142. Boo, Y. C. et al. Endothelial NO synthase phosphorylated at SER635 produces NO without requiring intracellular calcium increase. *Free Radical Biology and Medicine* **35**, 729–741 (2003).
143. Fulton, D. et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399**, 597–601 (1999).
144. Michell, B. J. et al. Identification of Regulatory Sites of Phosphorylation of the Bovine Endothelial Nitric-oxide Synthase at Serine 617 and Serine 635. *J. Biol. Chem.* **277**, 42344–42351 (2002).

145. Fulton, D. *et al.* Src Kinase Activates Endothelial Nitric-oxide Synthase by Phosphorylating Tyr-83. *J. Biol. Chem.* **280**, 35943–35952 (2005).
146. Vásquez-Vivar, J. *et al.* Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: The influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9220–9225 (1998).
147. Zou, M.-H., Shi, C. & Cohen, R. A. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest* **109**, 817–826 (2002).
148. Rees, D. D., Palmer, R. M., Schulz, R., Hodson, H. F. & Moncada, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* **101**, 746–752 (1990).
149. Antoniadou, C. *et al.* Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur. Heart J.* **30**, 1142–1150 (2009).
150. Shemyakin, A. *et al.* Arginase inhibition improves endothelial function in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* **126**, 2943–2950 (2012).
151. Zhou, S. *et al.* Asymmetric dimethylarginine and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* **7**, 44692 (2017).
152. Bendall, J. K. *et al.* Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase (eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with endothelial-targeted GTP cyclohydrolase 1 and eNOS overexpression. *Circ. Res.* **97**, 864–871 (2005).
153. Crabtree, M. J., Tatham, A. L., Hale, A. B., Alp, N. J. & Channon, K. M. Critical role for tetrahydrobiopterin recycling by dihydrofolate reductase in regulation of endothelial nitric-oxide synthase coupling: relative importance of the de novo biopterin synthesis versus salvage pathways. *J. Biol. Chem.* **284**, 28128–28136 (2009).
154. Iwasaki, T., Okamoto, K., Nishino, T., Mizushima, J. & Hori, H. Sequence motif-specific assignment of two [2Fe-2S] clusters in rat xanthine oxidoreductase studied by site-directed mutagenesis. *J. Biochem.* **127**, 771–778 (2000).
155. Higgins, P. *et al.* Xanthine oxidase inhibition for the treatment of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Cardiovasc Ther* **30**, 217–226 (2012).
156. Cantu-Medellin, N. & Kelley, E. E. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: insights regarding where, when and how. *Nitric Oxide* **34**, 19–26 (2013).
157. Sergeev, N. S., Ananiadi, L. I., L'vov, N. P. & Kretovich, W. L. The nitrate reductase activity of milk xanthine oxidase. *J. Appl. Biochem.* **7**, 86–92 (1985).
158. Zhang, Z. *et al.* Generation of nitric oxide by a nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 767–772 (1998).
159. Lundberg, J. O., Weitzberg, E. & Gladwin, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 156–167 (2008).

160. Peleli, M. *et al.* Enhanced XOR activity in eNOS-deficient mice: Effects on the nitrate-nitrite-NO pathway and ROS homeostasis. *Free Radic. Biol. Med.* **99**, 472–484 (2016).
161. Li, H., Samouilov, A., Liu, X. & Zweier, J. L. Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrite reduction. Evaluation of its role in nitric oxide generation in anoxic tissues. *J. Biol. Chem.* **276**, 24482–24489 (2001).
162. Berry, C. E. & Hare, J. M. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol. (Lond.)* **555**, 589–606 (2004).
163. Lundberg, J. O. & Weitzberg, E. NO generation from nitrite and its role in vascular control. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 915–922 (2005).
164. Münzel, T. *et al.* Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. *Circulation* **108**, 2172–2183 (2003).
165. Surks, H. K. *et al.* Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase I α . *Science* **286**, 1583–1587 (1999).
166. Klein, G., Drexler, H. & Schröder, F. Protein kinase G reverses all isoproterenol induced changes of cardiac single L-type calcium channel gating. *Cardiovasc. Res.* **48**, 367–374 (2000).
167. Straub, A. C. *et al.* Endothelial cell expression of hemoglobin α regulates nitric oxide signaling. *Nature* **491**, 473–477 (2012).
168. Birschmann, I. & Walter, U. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Acta Biochim. Pol.* **51**, 397–404 (2004).
169. Lima, B., Forrester, M. T., Hess, D. T. & Stamler, J. S. S-nitrosylation in cardiovascular signaling. *Circ. Res.* **106**, 633–646 (2010).
170. Zhang, R., Hess, D. T., Reynolds, J. D. & Stamler, J. S. Hemoglobin S-nitrosylation plays an essential role in cardioprotection. *J. Clin. Invest.* **126**, 4654–4658 (2016).
171. Maron, B. A., Tang, S.-S. & Loscalzo, J. S-nitrosothiols and the S-nitrosoproteome of the cardiovascular system. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 270–287 (2013).
172. Zweier, J. L., Chen, C.-A. & Druhan, L. J. S-glutathionylation reshapes our understanding of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and nitric oxide/reactive oxygen species-mediated signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 1769–1775 (2011).
173. Li, H. *et al.* Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. *J. Am. Coll. Cardiol.* **47**, 2536–2544 (2006).
174. Paolocci, N. *et al.* Oxygen radical-mediated reduction in basal and agonist-evoked NO release in isolated rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**, 671–679 (2001).
175. Huang, P. L. *et al.* Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* **377**, 239–242 (1995).
176. Panza, J. A., Quyyumi, A. A., Brush, J. E. & Epstein, S. E. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* **323**, 22–27 (1990).

177. Förstermann, U., Xia, N. & Li, H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ. Res.* **120**, 713–735 (2017).
178. Davignon, J. & Ganz, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* **109**, III27–32 (2004).
179. Panza, J. A., Casino, P. R., Kilcoyne, C. M. & Quyyumi, A. A. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* **87**, 1468–1474 (1993).
180. Li, Q., Yon, J.-Y. & Cai, H. Mechanisms and Consequences of eNOS Dysfunction in Hypertension. *J Hypertens* **33**, 1128–1136 (2015).
181. Cai Hua & Harrison David G. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circulation Research* **87**, 840–844 (2000).
182. Reventun, P. *et al.* iNOS-Derived Nitric Oxide Induces Integrin-Linked Kinase Endocytic Lysosome-Mediated Degradation in the Vascular Endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**, 1272–1281 (2017).
183. Herranz, B. *et al.* Integrin-linked kinase regulates vasomotor function by preventing endothelial nitric oxide synthase uncoupling: role in atherosclerosis. *Circ. Res.* **110**, 439–449 (2012).
184. Leist, M. & Jäätelä, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 589–598 (2001).
185. Schweichel, J. U. & Merker, H. J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* **7**, 253–266 (1973).
186. Boatright, K. M. *et al.* A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell* **11**, 529–541 (2003).
187. Takemoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A. & Miura, M. Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects. *J. Cell Biol.* **160**, 235–243 (2003).
188. Kamada, S., Kikkawa, U., Tsujimoto, Y. & Hunter, T. Nuclear translocation of caspase-3 is dependent on its proteolytic activation and recognition of a substrate-like protein(s). *J. Biol. Chem.* **280**, 857–860 (2005).
189. Green, D. R. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* **121**, 671–674 (2005).
190. Bossy-Wetzel, E. & Green, D. R. Detection of apoptosis by annexin V labeling. *Meth. Enzymol.* **322**, 15–18 (2000).
191. Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* **69**, 562–573 (2006).
192. Newby, A. C. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol. Rev.* **85**, 1–31 (2005).
193. van Hinsbergh, V. W. M. & Koolwijk, P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc. Res.* **78**, 203–212 (2008).
194. Johnson, J. L. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **5**, 265–282 (2007).
195. Somerville, R. P. T., Oblander, S. A. & Apte, S. S. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol.* **4**, 216 (2003).

196. Khokha, R., Murthy, A. & Weiss, A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 649–665 (2013).
197. Baker, A. H., Edwards, D. R. & Murphy, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell. Sci.* **115**, 3719–3727 (2002).
198. Johnson, J. L. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in cardiovascular pathologies: current knowledge and clinical potential. *Metalloproteinases In Medicine* vol. 1 21–36 <https://www.dovepress.com/matrix-metalloproteinases-and-their-inhibitors-in-cardiovascular-patho-peer-reviewed-fulltext-article-MNM> (2014).
199. Reiss, Y. & Engelhardt, B. FACS Analysis of Endothelial Cells. in *Methods in Endothelial Cell Biology* (ed. Augustin, H. G.) 157–165 (Springer, 2004). doi:10.1007/978-3-642-18725-4_15.
200. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
201. SCHMIDT, H. Determination of nitrite and nitrate by the Griess reaction. *Methods in nitric oxide research* 491–497 (1996).
202. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
203. Martin, W., McAllister, K. H. & Paisley, K. NANC neurotransmission in the bovine retractor penis muscle is blocked by superoxide anion following inhibition of superoxide dismutase with diethyldithiocarbamate. *Neuropharmacology* **33**, 1293–1301 (1994).
204. Hingorani, R., Deng, J., Elia, J., McIntyre, C. & Mittar, D. Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerse™ System. 13 (2011).
205. Lian, S. *et al.* Cadmium induces matrix metalloproteinase-9 expression via ROS-dependent EGFR, NF-κB, and AP-1 pathways in human endothelial cells. *Toxicology* **338**, 104–116 (2015).
206. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
207. Csordas, A. *et al.* Cigarette smoke extract induces prolonged endoplasmic reticulum stress and autophagic cell death in human umbilical vein endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* **92**, 141–148 (2011).
208. Yanbaeva, D. G., Dentener, M. A., Creutzberg, E. C., Wesseling, G. & Wouters, E. F. M. Systemic effects of smoking. *Chest* **131**, 1557–1566 (2007).
209. Rua, E. de A. O. *et al.* Effects of tobacco smoking during pregnancy on oxidative stress in the umbilical cord and mononuclear blood cells of neonates. *J. Biomed. Sci.* **21**, 105 (2014).
210. Ambrose, J. A. & Barua, R. S. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J. Am. Coll. Cardiol.* **43**, 1731–1737 (2004).
211. Barua, R. S. *et al.* Heavy and light cigarette smokers have similar dysfunction of endothelial vasoregulatory activity: an in vivo and in vitro correlation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 1758–1763 (2002).

212. Price, J. F. *et al.* Relationship between smoking and cardiovascular risk factors in the development of peripheral arterial disease and coronary artery disease: Edinburgh Artery Study. *Eur. Heart J.* **20**, 344–353 (1999).
213. Dugmonits, K. N. *et al.* Maternal Smoking Highly Affects the Function, Membrane Integrity, and Rheological Properties in Fetal Red Blood Cells. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, 1509798 (2019).
214. Marty, M., Kerndt, C. C. & Lui, F. Embryology, Fetal Circulation. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).
215. Ignarro, L. J. *et al.* Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 4202–4208 (2001).
216. Romero, M. J. *et al.* Diabetes-induced vascular dysfunction involves arginase I. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **302**, H159–166 (2012).
217. Pernow, J. & Jung, C. The Emerging Role of Arginase in Endothelial Dysfunction in Diabetes. *Curr Vasc Pharmacol* **14**, 155–162 (2016).
218. Wilcox, J. N. *et al.* Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 2479–2488 (1997).
219. Geng, Y. J., Wu, Q., Muszynski, M., Hansson, G. K. & Libby, P. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 19–27 (1996).
220. Liu, X., Chapman, G. B., Peyton, K. J., Schafer, A. I. & Durante, W. Carbon monoxide inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* **55**, 396–405 (2002).
221. Peleli, M. *et al.* Enhanced XOR activity in eNOS-deficient mice: Effects on the nitrate-nitrite-NO pathway and ROS homeostasis. *Free Radic. Biol. Med.* **99**, 472–484 (2016).
222. Pfeiffer, S. *et al.* Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution. Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in a 2:1 stoichiometry. *J. Biol. Chem.* **272**, 3465–3470 (1997).
223. Ramadoss, J., Pastore, M. B. & Magness, R. R. Endothelial caveolar subcellular domain regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **40**, 753–764 (2013).
224. Jakob, B. *et al.* DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic Acids Res.* **39**, 6489–6499 (2011).
225. Paull, T. T. *et al.* A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology* **10**, 886–895 (2000).
226. Schmid, T. E., Zlobinskaya, O. & Multhoff, G. Differences in Phosphorylated Histone H2AX Foci Formation and Removal of Cells Exposed to Low and High Linear Energy Transfer Radiation. *Curr Genomics* **13**, 418–425 (2012).
227. Spinale, F. G. Matrix Metalloproteinases. *Circulation Research* (2002) doi:10.1161/01.RES.0000013290.12884.A3.
228. Shah, P. K. Inflammation, metalloproteinases, and increased proteolysis: an emerging pathophysiological paradigm in aortic aneurysm. *Circulation* **96**, 2115–2117 (1997).

229. Nagase, H. & Woessner, J. F. Matrix Metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 21491–21494 (1999).
230. Matsumura, S. *et al.* Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest* **115**, 599–609 (2005).
231. Romanic, A. M. *et al.* Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9. *Cardiovasc. Res.* **54**, 549–558 (2002).
232. Stetler-Stevenson, W. G. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* **103**, 1237–1241 (1999).
233. Rojiani, M. V., Alidina, J., Esposito, N. & Rojiani, A. M. Expression of MMP-2 correlates with increased angiogenesis in CNS metastasis of lung carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **3**, 775 (2010).
234. Nagase, H. & Brew, K. Designing TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) variants that are selective metalloproteinase inhibitors. *Biochem. Soc. Symp.* 201–212 (2003) doi:10.1042/bss0700201.
235. Engeland, M. van, Ramaekers, F. C. S., Schutte, B. & Reutelingsperger, C. P. M. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* **24**, 131–139 (1996).
236. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* **184**, 39–51 (1995).
237. Sahara, S. *et al.* Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* **401**, 168–173 (1999).
238. Ts, Z. *et al.* Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 95 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9811849/> (1998).
239. Thirumoorthy, N. *et al.* A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol* **9**, 54 (2011).
240. Vašák, M. & Meloni, G. Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *J. Biol. Inorg. Chem.* **16**, 1067–1078 (2011).
241. Ebadi, M. *et al.* Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochem. Int.* **27**, 1–22 (1995).
242. Szrok, S. *et al.* Metallothioneins 1 and 2, but not 3, are regulated by nutritional status in rat white adipose tissue. *Genes & Nutrition* **11**, 18 (2016).
243. Mitsiades, C. S. *et al.* Antimyeloma activity of heat shock protein-90 inhibition. *Blood* **107**, 1092–1100 (2006).
244. Cohen-Saidon, C., Carmi, I., Keren, A. & Razin, E. Antiapoptotic function of Bcl-2 in mast cells is dependent on its association with heat shock protein 90 β . *Blood* **107**, 1413–1420 (2006).
245. Hasan, A. *et al.* Hsp90 inhibitor gedunin causes apoptosis in A549 lung cancer cells by disrupting Hsp90:Beclin-1:Bcl-2 interaction and downregulating autophagy. *Life Sci.* **256**, 118000 (2020).
246. Park, S., Park, J.-A., Yoo, H., Park, H.-B. & Lee, Y. Proteasome inhibitor-induced cleavage of HSP90 is mediated by ROS generation and caspase 10-activation in human leukemic cells. *Redox Biology* **13**, 470–476 (2017).

247. Spurway, J., Logan, P. & Pak, S. The development, structure and blood flow within the umbilical cord with particular reference to the venous system. *Australas J Ultrasound Med* **15**, 97–102 (2012).
248. Durante, W., Johnson, F. K. & Johnson, R. A. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **34**, 906–911 (2007).
249. Zhu, C., Yu, Y., Montani, J.-P., Ming, X.-F. & Yang, Z. Arginase-I enhances vascular endothelial inflammation and senescence through eNOS-uncoupling. *BMC Res Notes* **10**, 82 (2017).
250. Dimmeler, S. *et al.* Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**, 601–605 (1999).
251. Dugmonits, K. N. *et al.* Maternal Smoking Highly Affects the Function, Membrane Integrity, and Rheological Properties in Fetal Red Blood Cells. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, 1509798 (2019).
252. Zhou, Z. *et al.* Erythrocytes From Patients With Type 2 Diabetes Induce Endothelial Dysfunction Via Arginase I. *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**, 769–780 (2018).
253. Balogh, G. *et al.* Sustained maternal smoking-associated changes in the physico-chemical properties of fetal RBC membranes might serve as early markers for vascular comorbidities. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1865**, 158615 (2020).
254. Chakraborty, P. *et al.* Failure in the compensatory mechanism in red blood cells due to sustained smoking during pregnancy. *Chem. Biol. Interact.* **313**, 108821 (2019).
255. Farah, C., Michel, L. Y. M. & Balligand, J.-L. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol* **15**, 292–316 (2018).
256. Jansson, E. A. *et al.* A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 411–417 (2008).

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A köldökzsinór erek megfelelő funkcionalitása meghatározó szereppel bír a fejlődő magzat megfelelő oxigén és tápanyag ellátásának szempontjából. A köldökzsinór teljes mértékben magzati eredetű szerv, és a benne foglalt erek a magzati érrendszer közvetlen meghosszabbításának tekinthető. A köldökzsinór véna oxigénben és tápanyagban dús vért szállít a méhlepénytől a magzat felé, a két artéria pedig oxigénben szegény vért szállít vissza, a placenta felé. Ennél fogva a köldökzsinór erek közvetlenül és elsődlegesen kitettek minden olyan káros anyagnak, amelyeket a placenta nem képes kiszűrni, így az állapotukban bekövetkező változások jelezhetik a méhen belüli fejlődést érintő károsodásokat^{82,247}. A köldökzsinór erek közel teljes egészében mentesek a beidegzésektől, így a tónusuk szabályozása lokálisan érvényesülő hatások és a környezettel való aktív kommunikáció eredménye (endokrin faktorok, oxigén koncentráció, nyíróerő, stb.)⁸⁰. A nitrogén-monoxid (NO) egy nagymértékben diffúzibilis ér-relaxáns hatású molekula, melynek termeléséért elsősorban a nitrogén-monoxid szintáz család tagjai felelősek. Az endotél sejtekben előforduló domináns izoforma az endotéliális nitrogén-monoxid szintáz (NOS3), melynek aktiválása egy szigorúan összehangolt útvonalon történik, amely számos ponton sérülhet. A NOS3 a citoplazmában vagy a sejtmembránban kaveolákhoz kötötten fordul elő. Az aktivációja több szinten szabályozott például dimerizáció, poszttranszlációs módosítások és fehérje-fehérje kölcsönhatások által¹²⁷. Mivel a köldökzsinór erek nem rendelkeznek beidegzéssel, így bioaktív NO mennyisége határozza meg az endotéliális funkciót és szabályozza az redox egyensúlyt. A köldökzsinór erek, ezen belül az endotél sejtekkel kapcsolatos komplikációk elemzése hasznos eszköze lehet az újszülöttek érrendszeri betegségeihez vezető patológiás útvonalak megértésének. Mivel az endotél sejtek komplex szerepet töltenek be a homeosztatikus viszonyok fenntartásában, így morfológiai és funkcionális elváltozásaik egyértelműen hozzájárulnak a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásához.

Annak ellenére, hogy keveset tudunk a toxikus anyagok magzati kitettségre gyakorolt molekuláris következményeiről/háttéréről, egyre több bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy ezen környezeti tényezők hátrányosan befolyásolhatják a méhen belüli fejlődést, és akár hosszabb távú

egészségügyi következményeket is vonhat maga után^{207,210}. A terhesség során olyan átmeneti szervek biztosítják a magzati fejlődést, mint a méhlepény és a köldökzsinór. Ezért a méhen belüli állapotok megváltozása közvetlenül vagy közvetett módon kapcsolódnak a placenta vagy a köldökzsinór olyan rendellenességeihez, mint az intrauterin hypoxia és az elégtelen magzati vérellátás^{72–74}. Emellett egy nemrégiben publikált kemo-biológiai interakciónális megerősítette, és bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a dohányfüst komponensei intenzíven befolyásolják a génexpressziót mind embrionális, mind pedig a magzati fejlődési időszakban⁹⁶. Konvencionális kardiovaszkuláris rizikófaktorok, mint például a cukorbetegség, dohányzás, vagy diszlipidémia hatása a felnőttek kardiovaszkuláris rendszerére már behatóan ismeretes, és összefüggésbe hozható az endotéliális diszfunkció (ED) kialakulásával. Az ED egyik fő kiindulópontja a NO csökkent termelődése és/vagy biológiai hozzáférhetősége. Ennek következtében az endotéliumban fokozódik az oxidatív stressz, amely további súlyos következményekhez vezet. Az oxidatív közeg indukálja a NOS3 homodimer szétkapcsolódását, aminek eredményeként a NO helyett szuperoxid-anion ($O_2^{\bullet-}$) képződik¹⁰⁹. Mindemellett, az emelkedett $O_2^{\bullet-}$ szint következtében indukálódik az argináz-1 (ARG1) expressziója. Az ARG1, mint kompetitív enzim elvonja a NOS3-al közös L-arginin szubsztrátot, ami közvetett módon további NOS3 szétkapcsolódáshoz, így reaktív oxigén fajták (ROS) képződéséhez vezet^{248,249}. A NOS3 aktiválásának másik fontos szabályozási pontja a számos aminosav oldalláncon bekövetkező foszforiláció/defoszforiláció. Általánosan elfogadott, hogy a 1177-es pozícióban található szerin oldalláncon bekövetkező foszforiláció (P-NOS3) alapvető fontosságú az aktiváláshoz²⁵⁰. Amennyiben csökken a NOS3-függő NO termelés / hozzáférhetőség, alternatív NO termelő utak aktiválódhatnak kompenzációs mechanizmusokként, a magzati véráramlás javítása érdekében. Az erek endotélje folyamatosan kapcsolatban áll a keringő vörösvértestekkel (VVT), ráadásul a közelmúltban számos kórkép esetén számoltak be kettejük szoros kapcsolatáról^{251,252}. Amennyiben feltételezzük, hogy a keringő VVT-k érzékelik az ED-t, akkor a NO biohasznosulását esetlegesen növelhetné az VVT-k NOS3 aktivációs útvonala. Az anyai és a magzati VVT-ken végzett korábbi vizsgálataink alapján jelentős változásokat tapasztaltunk a VVT-k morfológiai paramétereiben, rugalmassági és plasztikus tulajdonságaikban és

ezzel összefüggésben komoly változásokat a membránt alkotó lipidjeik összetételében. Ezek együttesen hozzájárultak a károsodott NOS3 aktivációhoz, mely egyértelmű összefüggésbe hozható az anyai dohányzással. Az eredmények így azt valószínűsítik, hogy a VVT-k NOS3-függő NO termelése nem érvényesülhet kompenzációs mechanizmusként^{251,253,254}. A kompenzáció másik kézenfekvő megoldása az indukálható nitrogén-oxid-szintáz (NOS2) expressziójának növekedése az endotheliális rétegben, mivel katalitikus aktivitása (100-1000-szerese a NOS3-nak)²⁵⁵. Emellett potenciális jelölt a xantin-oxidoreduktáz (XOR) aktiválása is¹⁵⁸. Bár ez utóbbi meghökkentőnek tűnhet, ismerve az XOR alapvető tulajdonságait, ám az utóbbi években megjelent tanulmányok egyértelműen bizonyították, hogy a XOR útvonal aktiválása jótékonyan járul hozzá a NO termeléshez az inorganikus nitrit redukcióján keresztül^{160,163,256}.

Doktori dolgozatomban nem dohányzó és erős dohányos anyáktól (legalább 10 cigaretta naponta teljes terhesség alatt) született újszülöttektől származó köldökzsinór minták összehasonlító vizsgálatát végeztük. Ez magában foglal strukturális és funkcionális elemzéseket, melyek során molekuláris és biokémiai megközelítéseket alkalmaztunk. Ezen felül létrehoztunk egy *ex vivo* stresszválasz-monitorozó modell rendszert is. Eredményeink alapján egyértelműen kijelenthető, hogy az anyai dohányzás ér specifikus módon indukál strukturális és molekuláris károsodást; melynek mértéke arányos a méhlepény által nem szűrt káros anyagok expozíciójának szintjével. Ezen változások a NOS3-al kapcsolatos NO termelési útvonal és az alternatív / mentő mechanizmusok szabályozásának különböző szintjein nyilvánult meg. Az artériákban, bár a NOS3 expressziója csökkent, a fokozott aktiváló foszforiláció valószínűleg elegendő bioaktív NO termelődését eredményezi a hipoxiás állapotok ellensúlyozásához. A vénában azonban csökken a NOS3 aktivációja, de alternatív megoldásként a NOS3-független NO termelési útvonalak - XOR és NOS2 expresszió – kerül előtérbe. Ezek alapján az anyák dohányzása nemcsak a köldökzsinór véna, hanem az artériák endotéliumára is jelentős hatást gyakorol, ami egy általánosan bekövetkező funkcionális károsodásra utal, amely releváns lehet a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásának ok-okozati összefüggéseinek vizsgálatában.

Mindezek mellett megállapítottuk azt is, hogy a dohányos eredetű vénák stressz-válasz készsége nem megfelelő egy akut stressz expozíció hatására. Továbbá a dohányos eredetű mintáinkban feltételezzük a transzkripciós mechanizmusok általános visszaesését, míg ezzel párhuzamosan egyfajta adaptációra utaló reakciót figyeltünk meg a nehézfém terheléssel szemben.

Eredményeink egyértelműen igazolják, hogy az anyai dohányzás által kiváltott változások ér specifikusak és valószínűleg szorosan tükrözik a prenatális fejlődés *in vivo* körülményeit. Továbbá rámutattunk arra is, hogy egy erősen hipoxiás környezetben, az alacsony bioaktív NO szint mellett az emelkedett nitrit / nitrát koncentráció előtérbe helyezi a XOR közelmúltban leírt protektív szerepét.

Eredményeink jelentőségét abban látjuk, hogy ezzel hozzájárulhatunk a méhen belüli toxikus expozíció során bekövetkező molekuláris változások jobb megértéséhez, és az érintett útvonalak mélyreható ismerete újabb terápiás célpontokat határozhat meg a klinikum és az alkalmazott kutatások számára.

10. SUMMARY

The functionality of the umbilical cord (UC) vessels is a determining factor for proper oxygenation and development of the fetus. UC is fully embryonic in origin and the cord vessels can be considered as elongation of the vascular system of the developing fetus. The UC vein carries oxygenated blood and nourishment from the placenta to the fetus, and the two UC arteries transport deoxygenated blood back to the placenta. Therefore, UC vessels are directly and primarily exposed to harmful substances not filtered out by the placenta, so any alteration in them may serve as fingerprints of the damage affecting the *in utero* development^{82,247}. A significant portion the UC blood vessels lack innervation, so the tone of the vessels is mainly governed by local regulators in active communication with the milieu (endocrine factors, shear stress, oxygen concentration, *etc.*)⁸⁰. Nitric oxide (NO), the highly diffusible vasodilator molecule, is synthesized by nitric oxide synthase family members. In endothelial cells, the main isoform is the endothelial nitric oxide synthase (NOS3), which activity is well-coordinated and can be compromised at many points. NOS3 is localized to the cytoplasm and to the caveolae in the plasma membrane and its activation is regulated by dimerization, posttranslational modifications and protein-protein interactions¹²⁷. The bioavailability of NO is fundamental for regulating the oxidative balance and functionality of the endothelium, especially since the cord vessels have no innervation. Analysis of UC vessel-related complications, could serve as useful tool in understanding the pathophysiology of neonatal vascular diseases, particularly focused on endothelial cells. Since endothelium plays a complex role in the vascular system and contributes to the vascular homeostasis, its functional and morphological alterations clearly take part in the formation of pathophysiological processes.

Though less is known about the molecular consequences/background of fetal exposure to toxic materials, there is increasing evidence that environmental agents can adversely affect *in utero* development and even mediate long-lasting health consequences^{207,210}. During pregnancy, the placenta and the UC form vital temporary organs to sustain proper fetal development. Therefore, any alteration in the *in-utero* condition is directly or secondarily associated with the placental or UC disorders, like intrauterine

hypoxia and an impaired blood flow to the fetus⁷²⁻⁷⁴. Moreover a recently published chemo-biology interactome analysis underlined this concept and provided evidence that components of tobacco smoke intensively influence gene expression at both embryonic and fetal developmental period⁹⁶. Effects of traditional cardiovascular risk factors like diabetes, smoking, dyslipidaemia on adult cardiovascular system have been well established and are associated with endothelial dysfunction (ED). One of the main starting point for ED is the reduced production/bioavailability of NO, resulting in increased oxidative stress in the endothelium. The oxidative milieu induces NOS3 homodimer uncoupling, resulting in the formation of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) instead of NO¹⁰⁹. The elevated $O_2^{\bullet-}$ level triggers upregulation of arginase-1 (ARG1). ARG1 in competition distracts the common L-arginine substrate which indirectly leads to further NOS3 uncoupling and reactive oxygen species (ROS) formation^{248,249}. Another major regulatory point in NOS3 activation is phosphorylation/dephosphorylation at several amino acid side chains. It is generally accepted that phosphorylation at the serine 1177 side chain (P-NOS3) is a crucial requirement for activation²⁵⁰. In case of reduced NOS3-dependent NO production/bioavailability, alternative NO producing pathways get activated as compensatory mechanisms to improve blood flow to the fetus. Vessel endothelium is in continuous contact with circulating red blood cells (RBCs), moreover, an intimate crosstalk between them was recently reported under pathological condition^{251,252}. Supposing that ED can be sensed by circulating RBCs, NO bioavailability might be increased by the RBC-NOS3 activation pathway. However, our previous studies on the maternal and fetal RBCs indicated significant alterations in the RBCs' morphological parameters, elastic and plastic properties and abnormalities in their membrane-lipid composition, along with an impaired NOS3 activation, as the consequence of maternal smoking. All these modifications /alterations, make it is most likely, that the NOS3-dependent NO production by RBCs is not available as a compensatory mechanism^{251,253,254}. Another obvious solution for compensation could be the upregulation of inducible nitric oxide synthase (NOS2) expression in the endothelial layer, due to its high (100-1000 fold that of the NOS3) catalytic activity and/or the activation of xanthine oxidoreductase (XOR)^{158,255}. Though this second assumption might sound astonishing, knowing the activities of XOR,

but recent studies presented evidence on the beneficial outcomes of XOR activation by reduction of nitrite to NO^{160,163,256}.

In this study we applied comparative analysis on UC vessels, originated from neonates born to non-smoking and heavy smoker mothers (at least 10 cigarettes per day during full pregnancy), using structural analysis, molecular and biochemical approaches, including *ex vivo* stress response monitoring model system. We provide evidence that maternal smoking induces structural and molecular damages in a vessel specific manner; the extent of the alterations is proportional with their exposure level to the harmful materials, unfiltered by the placenta. The endothelial NOS3 related NO production pathway and the alternative/rescue mechanisms are influenced at different level of regulation. In the artery, though the NOS3 expression is downregulated, its increased activation by phosphorylation, probably will result in sufficient bioavailable NO level to deal with the hypoxic conditions. In the vein however, NOS3 activation is reduced, but alternatively, NOS3-independent NO production pathways - XOR and NOS2 expression - are upregulated. Maternal smoking can exert marked effect not only on the UC vein endothelium, but also on the arteries, suggesting a general functional impairment, which might have relevance to the major etiologies of cardiovascular diseases. We also found, that the stress response pathways are impaired upon acute-stress exposition in UC veins with smoker origin. Furthermore, we assume an overall decline of transcriptional mechanisms, but in parallel we found a kind of adaptation-like reaction against heavy metals in our smoker-derived samples.

Our results clearly demonstrate that maternal smoking induced alterations are vessel specific and most likely are close reflection to the *in vivo* circumstances of the prenatal development. Furthermore, we provide evidence that in a highly hypoxic environment, with low bioavailability of NO, an elevated nitrite / nitrate pool unravels the recently described protective role of XOR.

The significance of our study is the possible contribution to a better understanding of the molecular changes that occur upon intrauterine toxic exposure, and in-depth knowledge of the affected pathways may determine novel therapeutic targets for the clinic and applied researches.