

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

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**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.**

## BEVEZETÉS

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 meghosszabbításának tekinthetők. Az oxigénben és tápanyagban dús vért a köldökzsinór véna szállítja a méhlepénytől a magzathoz, a két artéria pedig oxigénben szegény vért szállít vissza, a placenta felé. Ennél fogva a köldökzsinór erek közvetlenül és elsődlegesen kitétek minden olyan káros anyagnak, amelyeket a placenta nem képes kiszűrni, így az állapotukban bekövetkező változások jelezhetik a méhen belüli fejlődést érintő károsodásokat. 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.). Az egyik legfontosabb paraméter a bioaktív nitrogén-monoxid (NO) mennyisége, amely meghatározza az endotéliális funkciót és szabályozza az redox egyensúlyt. A 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. Az aktiváció több szinten szabályozott például dimerizáció, poszttranszlációs módosítások és fehérje-fehérje kölcsönhatások által. Így 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 homeosztatis viszonyok fenntartásában, így morfológiai és funkcionális elváltozásaik egyértelműen hozzájárulnak a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásához.

Annak ellenére, hogy keveset tudunk a toxikus anyagok magzati kitétségre 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 vonhatnak maguk után. 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 hipoxia és az elégtelen magzati vérellátás. Emellett egy nemrégiben publikált kemo-biológiai interaktóm analízis megerősítette, és bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a dohányfüst komponensei intenzíven befolyásolják a génextpressziót mind embrionális, mind pedig a magzati fejlődési időszakban. 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. Amennyiben csökken a NOS3-függő NO termelés / hozzáférhetőség, alternatív kompenzációs mechanizmusok aktiválódhatnak. Az erek endotélje emellett folyamatos kapcsolatban áll a keringő vörösvértestekkel (VVT), és a közelmúltban számos kórkép esetén számoltak be kettejük szoros kapcsolatáról. 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 a membránt alkotó lipidjeik összetételében. Ezek együttesen hozzájárultak a károsodott VVT-NOS3 aktivációhoz, mely egyértelmű összefüggésbe hozható az anyai dohányzással. Az eredmények így azt valószínűsítik, hogy ez az útvonal nem érvényesülhet kompenzációs mechanizmusként. A menekítés másik kézenfekvő megoldása az indukálható nitrogén-oxid-szintáz (NOS2) expressziójának növekedése az endotéliumban, mivel katalitikus aktivitása (100-1000-szerese a NOS3-nak). Emellett potenciális jelölt a xantin-oxidoreduktáz (XOR) aktiválása is. Bár ez utóbbi meglehetősen tünhet, 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 nitrát/nitrit redukcióján keresztül.

## CÉLKITŰZÉSEK

Kiinduló hipotézisként feltételeztük, hogy a helytelen anyai életmód, mint pl. a dohányzás, indukálhatja a köldökzsínér 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 köldökzsínér ereket ért közvetlen károsodásra, hanem az újszülöttek vaszkuláris rendszerének általános állapotára is. Munkánk során a dohányos és nem-dohányos édesanyák újszülöttjeitől származó köldökzsínér artériák és vénák összehasonlító vizsgálatát tűztük ki célul. A projekt céljait az alábbi pontok szerint foglaltuk össze:

- 1) Vizsgálni a NOS3 endotéliális kifejeződését, illetve az aktivitását meghatározó 1177-es szerin (SER) foszforilációt, valamint a L-arginin szubsztrát kompetícióban jelentős szerepet betöltő, stressz hatásra indukálódó ARG1 expressziót
- 2) A NOS2 és XOR szerepének vizsgálata a lehetséges kompenzáció tükrében
- 3) Az eredményeink integrálása toxikus kitettség függvényében az artériák és vénák állapotának összevetésével
- 4) Az erek redox állapotának értékelése és makromolekula károsodásainak elemzése
- 5) Az endotél sejtek ultrastrukturájának vizsgálata szöveti és molekuláris szinten, illetve ezzel párhuzamosan a sejtek életképességének vizsgálata
- 6) Akut stressz hatásokra bekövetkező válaszreakciók összehasonlító elemzése a kontroll és dohányos mintacsoportok vénáiban génextpressziós szinten

## ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- 1) Transzmissziós elektronmikroszkópia
- 2) Immunhisztokémia fagyasztott köldökzsínór metszeteken
- 3)  $O_2^{\bullet-}$  *in situ* detektálása dihidroetídiummal
- 4) Konfokális mikroszkópia
- 5) Konfokális felvételek kiértékelése egy általunk kidolgozott, objektív, szemikvantitatív megközelítéssel
- 6) Humán köldökzsínór véna endotél sejtek (HUVEC) izolálása
- 7) Immuncitokémia frissen izolált HUVEC sejteken
- 8) Viabilitás tesztek Annexin V és propídium-jodid felhasználásával
- 9) Flow citometria és analízis
- 10) *Ex vivo* akut stresszválasz indukciós modell kidolgozása és alkalmazása
- 11) Köldökzsínór erek izolálása, porítása és homogenizálása
- 12) A teljes nitrogén-oxid származékok (tNOx) koncentrációjának meghatározása Griess-reakcióval
- 13) RNS kivonás, reverz transzkripció
- 14) Kvantitatív *real-time* PCR

## ELÉRT EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

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. Eredményeinkkel 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.

Eredményeink alapján a következő kijelentéseket tehetjük:

- 1) A NO termelődés leginkább a toxikus terhelés által közvetlenül érintett vénákban sérült, amely a NOS3 SER1177-es pozíció foszforilációjának elmaradására vezethető vissza. Az artériákban 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 kompetitív ARG1 enzim 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.
- 2) A NOS2 és XOR expresszió jelentős indukciót mutatott a vénákban. 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. 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. Ezzel szemben az artériákban menekítő útvonalak aktiválódása elmarad.

- 3) Az elsődleges kitettséggű vénákban megfigyelt makromolekula károsodásokhoz nagyban hozzájárulhat a megnövekedett NOS2 által rövid idő alatt, nagy mennyiségben szintetizált NO. Ez az útvonal egy erősen oxidatív környezetben a nitrozatív stressz irányába tolja 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<sup>-</sup> képződik egy spontán reakcióban. A potenciálisan ONOO<sup>-</sup>-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. 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 marker mindkét értípusban összefüggésbe hozható a NOS2 expresszióval. A DNS kettős törés és a hibajavítást értékelő 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.
- 4) A transzmissziós elektronmikroszkópia során megfigyelt ultrastrukturális változások szintén az ér típusok különböző fokú kitettségre 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 CASP3 mediált nagy mértékű sejtpusztuláshoz vezet. Az MMP-9 – TIMP-1 arányok vizsgálata során a véna esetében bizonyítást

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

- 5) Az alap expressziók összehasonlítása során azt tapasztaltuk, hogy az *mt3* kivételével az összes vizsgált gén (*hsp90*, *mmp-9*, *timp-1*, *mt1e*, *mt2a*) alacsonyabban expresszálódik a dohányos vénákban. Ez alapján a dohányos vénát érő közvetlen károsító hatások a transzkripciós mechanizmusok általános csökkenéséhez vezetnek. A Cd<sup>2+</sup> kezelés hatására a dohányos csoport reakciója kevésbé volt kifejezett a kontroll mintákhoz képest. Ezzel párhuzamosan feltételezzük, hogy a folyamatos (több hónapon át tartó) stresszhatás miatt ezen gének expressziós szintje soha nem is érte el a kontroll szintet. A kontroll vénák számára a Cd<sup>2+</sup> egy újonnan megjelenő stresszfaktort jelentett, ezzel szemben a dohányos rendszer reakciója az *mt* gének expressziója alapján azt bizonyítja, hogy már korábban is történt nehézfém-expozíció.



## **TÁMOGATÁS**

Kutatásainkat a GINOP 2.3.2-15-2016-0040 („MyoTeam”) pályázat keretein belül végeztük.

## PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

MTMT azonosító: 10051798

### A doktori eljárás alapját képező közlemények:

1. Zahorán, S.; Szántó, P.R.; Bódi, N.; Bagyánszki, M.; Maléth, J.; Hegyi, P.; Sári, T.; Hermes, E. Sustained Maternal Smoking Triggers Endothelial-Mediated Oxidative Stress in the Umbilical Cord Vessels, Resulting in Vascular Dysfunction. *Antioxidants* 2021, 10, doi:10.3390/antiox10040583.
2. Dugmonits, K.N.; Ferencz, Á.; Zahorán, S.; Juhász, R.; Talapka, P.; Orvos, H.; Hermes, E. Elevated Levels of Macromolecular Damage Are Correlated with Increased Nitric Oxide Synthase Expression in Erythrocytes Isolated from Twin Neonates. *BRIT J HAEMATOL* 2016, 174, 932–941, doi:10.1111/bjh.14156.

### Referált folyóiratban megjelent közlemények:

1. Zahorán, S.; Szántó, P.R.; Bódi, N.; Bagyánszki, M.; Maléth, J.; Hegyi, P.; Sári, T.; Hermes, E. Sustained Maternal Smoking Triggers Endothelial-Mediated Oxidative Stress in the Umbilical Cord Vessels, Resulting in Vascular Dysfunction. *Antioxidants* 2021, 10, doi:10.3390/antiox10040583. IF: **5,014**
2. Dugmonits, K.N.; Chakraborty, P.; Hollandi, R.; Zahorán, S.; Pankotai-Bodó, G.; Horváth, P.; Orvos, H.; Hermes, E. Maternal Smoking Highly Affects the Function, Membrane Integrity, and Rheological Properties in Fetal Red Blood Cells. *OXID MED CELL LONGEV* 2019, doi:10.1155/2019/1509798. IF: **5,067**
3. Zhou, Z.; Mahdi, A.; Tratsiakovich, Y.; Zahorán, S.; Kovamees, O.; Nordin, F.; Uribe, G.A.; Alvarsson, M.; Ostenson, C.; Andersson, D.; et al. Erythrocytes From Patients With Type 2 Diabetes Induce Endothelial Dysfunction Via Arginase I. *J AM COLL CARDIOL* 2018, 72, 769–780, doi:10.1016/j.jacc.2018.05.052. IF: **17,93**

4. Dugmonits, K.N.; Ferencz, Á.; Zahorán, S.; Juhász, R.; Talapka, P.; Orvos, H.; Hermes, E. Elevated Levels of Macromolecular Damage Are Correlated with Increased Nitric Oxide Synthase Expression in Erythrocytes Isolated from Twin Neonates. BRIT J HAEMATOL 2016, 174, 932–941, doi:10.1111/bjh.14156. IF: **5,67**

**Összesített impakt faktor: 33,681**

**Egyéb közlemények:**

1. Zahorán, S.; Hermes, E. Az Oxidatív Stressz És Endotél Diszfunkció Összefüggéseinek Vizsgálata Humán Köldökszínór Modellrendszerben.; Poór, P., Blázovics, A., Eds.; Szegedi Tudományegyetem: Szeged, 2019; p. 18.
2. Chakraborty, P.; Dugmonits, K.N.; Zahorán, S.; Hermes, E. Mapping the Morphological and Functional Alterations of the Red Blood Cells in Active Maternal Smoking during Pregnancy. FEBS OPEN BIO 2018, 8.
3. Zahorán, S.; Dugmonits, K.N.; Szántó, P.; Bartos, K.; Hermes, E. A terhesség alatti dohányzás rövid és hosszú távú hatásának molekuláris vizsgálata a köldökszínór endotél diszfunkciójának és a lehetséges kompenzációs hatások tükrében. In Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság IX. Kongresszusa és az MTA ÉKB Mikroelem Munkabizottságának Tudományos Ülése; Mézes, M., Ed.; SzIE: Gödöllő, 2017; pp. 28–28 ISBN 978-963-269-666-9.
4. Kiss, A.A.; Zahorán, S.; Popovics, N.; Márton, K.; Monika, R.; Hermes, E.; Boldogkői, Z.; Katalin, C.; Mink, M. Chronic Inflammation, Oxidative-Nitrosative Stress, Mitochondrial Dysfunction, Improper Integrin Expression, Loss of Sarcomeres and Proteolysis of Myofibrillar Proteins Allow Diagnosis of Muscular Dystrophy in Drosophila Type IV Collagen Col4a1 Mutants.; Nikos, K., Ed.; Spetses, 2017; pp. 85–85.
5. Zahorán, S.; Dugmonits, K.N.; Bódi, N.; Hermes, E. Cord Endothelial Dysfunction Can Be Sensed by Circulating Red Blood Cells? FEBS J 2017, 284, 122–122.

6. Chakraborty, P.; Dugmonits, K.N.; Ferencz, Á.; Zahorán, S.; Hermes, E. P 097 - Is Twin Pregnancy Being a Medical Boon? – Comparative Evaluation on Oxidative Stress in Multiple Pregnancy 2017.
7. Zahorán, S.; Dugmonits, K.N.; Hermes, E. Novel Insights of Nitric Oxide Signaling: The Importance of Red Blood Cells Activity in Twin Neonates.; Vancouver, 2016; pp. 73–73.
8. Zahorán, S. A dohányzás károsító hatásának molekuláris vizsgálata dohányzó és nem dohányzó édesanyáktól született újszülöttek köldökzsinór mintáiban. In XXXII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia; Putnoky, P., Galambos, A., Eds.; Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Kar (PTE TTK): Pécs, 2015; pp. 78–78 ISBN 978-963-642-739-9.
9. Zahorán, S.; Dugmonits, K.N.; Hermes, E. A dohányzással összefüggésbe hozható fémfelhalmozódások hatásainak vizsgálata humán köldökzsinór mintákon.; Lugasi, A., Fébel, H., Eds.; 2015; pp. 33–34.
10. Dugmonits, K.N.; Ferencz, Á.; Zahorán, S.; Hermes, E. Az antioxidáns vélelmi rendszer vizsgálata intrauterin növekedési retardációval született újszülöttekben. In Tavasz szél: absztraktkötet 2015; Csiszár, I., Ed.; Doktoranduszok Országos Szövetsége (DOSZ): Budapest, 2015; pp. 385–385 ISBN 978-963-397-702-6.
11. Zahorán, S.; Ferencz, Á.; Dugmonits, K.N.; Hermes, E. Fémfelhalmozódás és oxidatív stressz: a dohányzás hatásainak molekuláris vizsgálata humán köldökzsinór mintákon.; 2015; pp. 44–44.
12. Ferencz, Á.; Dugmonits, K.N.; Zahorán, S.; Hermes, E. Little babies-big warriors: The antioxidant response in the umbilical cord of neonates with intrauterine growth restriction. In Molecules of Life. FEBS3+ Meeting. 11th Meeting of the Slovenian Biochemical Society; Janko, K., Nataša, P.U., Eds.; Slovenian Biochemical Society: Ljubljana, 2015; pp. 252–252 ISBN 978-961-93879-1-7.
13. Dugmonits, K.N.; Juhász, R.; Ferencz, Á.; Zahorán, S.; Hajnalka, O.; Hermes, E. Smoking and Pregnancy: Molecular Study of Oxidative Stress Response in the Human Umbilical Cord. FEBS J 2014, 281, 8–9.

## **TÉMAVEZETŐI NYILATKOZAT**

Alulírott Dr. Hermes Edit, Zahorán Szabolcs doktorjelölt témavezetőjeként kijelentem, hogy jelen doktori értekezés, és annak téziseiben foglalt eredmények a jelölt önálló munkáját tükrözik. Kijelentem továbbá, hogy a doktori eljárás alapját képező közlemények nem kerültek más fokozatszerzési eljárásban felhasználásra.

Szeged, 2021. április 08.

---

Dr. Hermes Edit