

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és  
Informatikai Kar

Környezettudományi Doktori Iskola

**Doktori (Ph.D.) Értekezés**

*A terhesség alatti dohányzás hatásának vizsgálata a  
magzati és felnőttkori eritrocitákra: morfológiai, reológiai  
és funkcionális vizsgálatok*

Hidjapusztayné Dugmonits Krisztina Nikoletta

Témavezető:

Dr. habil. Hermes Edit

egyetemi docens

Társtémavezető:

Prof. Dr. habil. Orvos Hajnalka

egyetemi tanár



Szeged

2021

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
1. Rövidítések jegyzéke.....	4
2. Bevezetés .....	5
3. Irodalmi áttekintés.....	7
3.1 A szabadgyökök és a dohányzás hatása a szervezetre .....	7
3.2 Terhesség alatti dohányzás hatásai.....	12
3.3 Az eritrociták általános jellemzése.....	16
3.4 Az eritrociták szerepe a NO tárolásában és szintézisében.....	20
3.4.1 Nitrogén monoxid szintáz család .....	21
3.4.2 NOS3 szerkezete és szabályozása.....	21
4. Célkitűzések .....	26
5. Anyagok és módszerek .....	27
5.1 Mintagyűjtés és mintafeldolgozás.....	27
5.2 RNS preparálás fagyasztott mintákból az argináz-1 transzkript mennyiségének meghatározására.....	28
5.2 Reverz transzkripció.....	28
5.3 Kvantitatív polimeráz láncreakció .....	28
5.4 Primerek.....	29
5.5 Morfológiai vizsgálatok és adatelemzés eozin festett vérkeneteken.....	29
5.6 Eritrociták reológiai tulajdonságainak vizsgálata .....	30
5.7 Lipidomikai vizsgálatok eritrocitákon.....	31
5.8 Fluoreszcencia aktivált sejtválogatás és analízis eritrocitákon.....	31
5.9 Spektrofotometriás mérések .....	33
5.9.1 Fehérje koncentráció meghatározása .....	33
5.9.2 Peroxinitrit mérés.....	33
5.10 <i>Ex vivo</i> kezelések.....	34
5.10.1 Nehézfém kezelés.....	34

5.10.2	<i>Candida parapsilosis</i> fertőzés.....	34
5.11	Statisztikai analízis .....	35
6.	Eredmények .....	36
6.1	Mintagyűjtés .....	36
6.2	Eritrociták morfológiai változásainak vizsgálata vérkeneten .....	39
6.2.1	Kadmium kezelés.....	41
6.2.2	<i>Candida parapsilosis</i> fertőzés .....	42
6.3	Eritrociták reológiai tulajdonságainak vizsgálata .....	44
6.4	NOS3 funkcióját befolyásoló tényezők vizsgálata eritrocita membránokon ...	46
6.4.1	NOS3 poszttranszlációs módosítása .....	46
6.4.2	Argináz-1 mRNS és fehérje vizsgálata .....	48
6.4.3	NOS3 expresszió vizsgálata a morfológiai variánsokban .....	50
6.5	Az anyai dohányzás hatása a peroxinitrit szintjére .....	52
6.6	Lipidperoxidáció vizsgálata a 4-hidroxi-nonenal-fehérje adduktumok mérésével FACS analízissel.....	53
6.7	Lipidösszetétel vizsgálat.....	55
7.	Eredmények megbeszélése .....	58
8.	Köszönetnyilvánítás .....	63
9.	Felhasznált irodalom .....	64
10.	Összefoglalás .....	77
11.	Summary .....	82
12.	Függelék.....	86

## 1. Rövidítések jegyzéke

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intracelluláris Ca <sup>2+</sup> koncentráció
4-HNE	4-hidroxi-nonenal
AFM	atomerő mikroszkóp ( <i>Atomic force microscopy</i> )
Akt	protein kináz B
ARG	argináz
BH <sub>4</sub>	5,6,7,8-tetrahidropterin
CAM	kalmodulin
Chol	koleszterin
D	terhesség alatt dohányzó édesanyától született újszülött köldökzsínór artéria teljes vér
DA	terhesség alatt dohányzó anyai vénás teljes vér
DA-Eritrocita	terhesség alatt dohányzó anyai vénás eritrocita frakció
D-Eritrocita	terhesség alatt dohányzó édesanyától született újszülött köldökzsínór artéria eritrocita frakció
FACS	fluoreszcencia aktivált sejtválogatás és analízis ( <i>Fluorescence activated cell sorter</i> )
FAD	flavin adenin dinukleotid
FMN	flavin mononukleotid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hidrogén peroxid
K	kontroll terhességből született újszülött köldökzsínór artéria teljes vér
KA	kontroll anyai vénás teljes vér
KA-Eritrocita	kontroll anyai vénás eritrocita frakció
K-Eritrocita	kontroll terhességből született újszülött köldökzsínór artéria eritrocita frakció
MS	tömegspektrometriás analízis ( <i>Mass spectrometry</i> )
NO	nitrogén monoxid
NOS3	endotéliális nitrogén monoxid szintáz ( <i>Endothelial nitric oxide synthase</i> )
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	szuperoxid gyök
OH <sup>•</sup>	hidroxil gyök
ONOO <sup>-</sup>	peroxinitrit
PB	foszfát puffer
PBS	foszfáttal puffereelt sóoldat
PC	foszfatidilkolin
PE	foszfatidil-etanolamin
PFA	paraformaldehid
PI	foszfatidil-inozitol
PL	foszfolipid
p-NOS3	NOS3 foszforilált formája a Szerin <sup>1177</sup> -es oldalláncon
PS	foszfatidil-szerin
PUFA	többszörösen telítetlen zsírsavak ( <i>Polyunsaturated fatty acid</i> )
ROS	reaktív oxigén gyökök ( <i>Reactive oxygen species</i> )
SM	szfingomielin

## 2. Bevezetés

A szív- és érrendszeri betegségek világszerte vezető haláloknak számítanak. A kardiovaszkuláris megbetegedések egyik fő rizikófaktor a dohányzás, melynek oka a dohányfüstben megtalálható több mint 4700 kémiai vegyület, közöttük immunomodulátor toxinok, és szabadgyökök. Az immunomodulátor toxinok közül a nikotin és a szénmonoxid, a szabadgyökök közül a szuperoxid anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), a nitrogén monoxid (NO), valamint a dohányban megtalálható fémek közül a kadmium, az arzén és a nikkel játszhat kiemelt szerepet a kórkép kialakulásában. Ezek közvetlen, vagy közvetett módon szabadgyök képződést indukálnak a szervezetben, melyek kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásában is szerepet játszanak, az ér endotél réteg károsítása révén (U.S. Department of Health and Human Services, 2010). Ha ez a fokozott szabadgyök képződés hosszú ideig fennáll, akkor az antioxidáns rendszer kimerülésével oxidatív stressz alakul ki, ami vaszkuláris diszfunkcióhoz vezethet.

Habár a felnőttek esetében az erek idegi szabályozás alatt is állnak, a NO szerepe mégis elengedhetetlen a vazodilatációban. Ennek szintézisét elsősorban az endotéliális nitrogén monoxid szintáz (NOS3) végzi. Az enzim aktiválásához szükség van megfelelő mennyiségű L-arginin szubsztrátra, a NOS3 alegységeinek dimerizációjára, a kooperációs partnerek jelenlétére és a Ser<sup>1177</sup> oldallánc foszforilációjára. Ekkor a NOS3 enzim NO-ot termel. Ezen feltételek bármelyikének hiányában, a NO helyett a láncreakciót indító  $O_2^{\bullet-}$  képződik (Oliveira-Paula et al., 2016).

Terhesség során a magzat egy kvázi hipoxiás környezetben fejlődik és a szövetek magasabb oxigén igénye miatt fokozottabb a szabadgyök képződés. A kapcsolatot a magzat és az édesanya között a köldökzsinór tartja fenn. Fontos megemlíteni, hogy a köldökzsinór erek nem rendelkeznek beidegzéssel, következésképpen a NO kulcsfontosságú szerepet játszik a vaszkuláris rendszer működésében, így a magzat megfelelő oxigén ellátottságában is. A placenta egyik fő szerepe, hogy meggátolja az anyai vérrel érkező káros anyagok átjutását a magzati keringésbe. Ez a szűrő funkció azonban nem teljes, a már említett káros összetevők egy része átjuthat a placentán.

A magzat megfelelő ütemű fejlődését a köldökzsinór erek és az erekben keringő eritrocita populáció koordináltan befolyásolja. Kutatócsoportunk köldökzsinór ereken végzett vizsgálatait azt mutatják, hogy a terhesség alatti dohányzás a köldökzsinór erek endotél sejteinek morfológiai változást indukálja. Nagyméretű vakuólák megjelenése,

kondenzálódott sejtmag és az endotél sejtsor folytonossági hiánya volt megfigyelhető, melyek együttesen endotél diszfunkcióra engednek következtetni. 2018/2019-es közlemények felhívták a figyelmet az eritrociták és az endotél sejtek közötti szoros kölcsönhatásra, aktív kommunikációra (Zhou et al., 2018; Davidson et al., 2019). Ennek előzményeként megemlíthetjük, hogy míg hosszú időn keresztül az eritrociták fő funkcióinak elsősorban az oxigén szállítást, és az endotél sejtek által termelt NO tárolását tekintették, egy 2014-ben megjelent közlemény alapján, az eritrociták nem csupán tárolni képesek a NO-t, hanem rendelkeznek az endotéliális NOS3-hoz hasonló enzimmal, és képesek a NO szintézisre is (Cortese-Krott and Kelm, 2014).

Egy 2018-ban publikált eredmény szerint az eritrociták argináz (ARG) enzimmal is rendelkeznek, amit eddig elsősorban a májban és más szövetekben írtak le (Diederich et al., 2018). Ez azért fontos a számunkra, mert az ARG kompetícióban van a L-argininért a NOS3-mal, így a fokozott mennyiségű ARG képes megakadályozni a NOS3 dimerizációt (Ignarro et al., 2001).

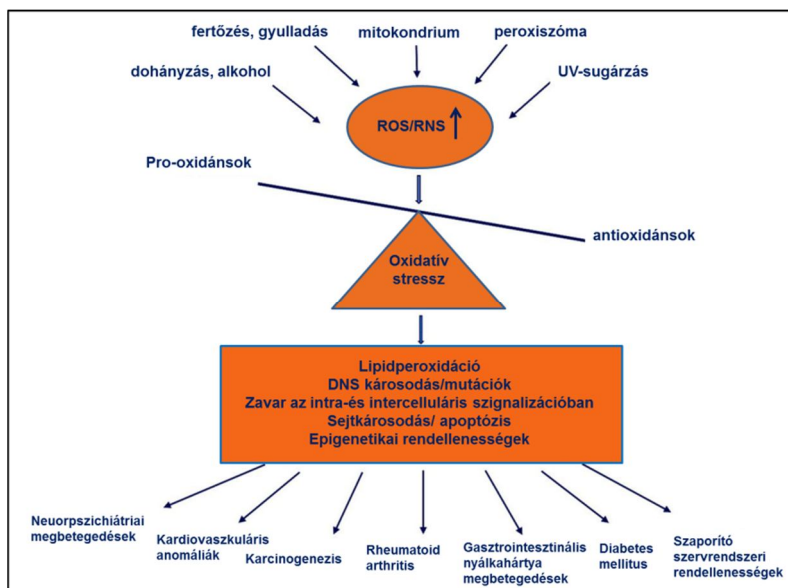
Ezen ismeretek alapján munkánk kezdetén a fő kérdésünk az volt, hogy egy endotéliális diszfunkcióval a háttérben az eritrociták képesek-e egyfajta mentési mechanizmusra a saját NOS3 aktiválásuk révén. Vizsgáltuk a szabadgyök akkumulációt eritrocita populációban, valamint ennek hatását a membrán lipid összetételére, és az eritrociták rehológiai paramétereire.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1 *A szabadgyökök és a dohányzás hatása a szervezetre*

A környezeti stresszhatásokra való gyors reagálás képessége általános tulajdonsága az élőlényeknek (Chrousos, 2009). A szabadgyökök, reaktív oxigén/nitrogén tartalmú molekulák, (ROS/RNS) sejtszintű felhalmozódása szoros összefüggésbe hozható a környezeti stresszhatásokkal (Chrousos and Gold, 2003). Külső elektronhéjukon, egy vagy több párosítatlan elektronnal rendelkeznek emiatt fokozott a reakciókészségük. Legfontosabb szabadgyökök között említjük a  $O_2^{\bullet-}$ -t, a hidroxil gyököt ( $OH^{\bullet}$ ), alkoxil gyököt és a triplet oxigént. ROS-ok közé soroljuk a nem gyökjellegű, de erős oxidáns hatású molekulákat is, mint pl. a peroxidok (hidrogén-peroxid -  $H_2O_2$ , szerves peroxidok), a hipoklórsav, a szinglet oxigén, a peroxinitrit ( $ONOO^-$ ) vagy az ózon (Wood, 1988; Winterbourn, 2008).

A ROS-ra/szabadgyökökre vonatkozó széleskörű kutatások alapján ma már elmondhatjuk, hogy fontos szerepet töltenek be alapvető élettani folyamatokban is; a sejtkommunikációban, a keringés szabályozásában és sok egyéb folyamat mellett nélkülözhetetlenek az immunrendszer számára is. Fokozott jelenlétüket endogén és exogén hatások indukálhatják. Exogén tényezők közé sorolhatóak a különböző sugárzások (UV, radioaktív), fertőzések, valamint egyes életmódbeli sajátosságok, mint a dohányzás vagy az alkohol fogyasztás. Endogén tényezőkként tartjuk számon a gyulladásos folyamatokat, vagy a mitokondriális légzési lánc működése során keletkező szabadgyök képződést (1.ábra) (Bisht and Dada, 2017).



**1. ábra: A ROS képződés és az oxidatív stressz következményei**

Oxidatív stressz állapot kialakulhat abban az esetben, ha a szabadgyökök képződés fokozódik, illetve, ha az antioxidáns védelmi rendszer kimerül. A hosszútávon fennálló oxidatív stressz állapot makromolekula károsodást (lipidperoxidáció, DNS törés, fehérje nitráció), sejtkárosodást, illetve apoptózist is indukálhat (Bisht and Dada, 2017).

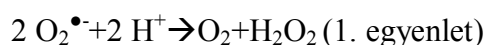
Az oxidatív stressz következményeinek kivédésére egy antioxidáns védelmi rendszer alakult ki az evolúció során (Spector, 2000). Az antioxidánsok hivatottak a fiziológiásnál magasabb mennyiségben előforduló szabadgyököket semlegesíteni, és/vagy az általuk indukált káros folyamatokat megakadályozni. Az antioxidáns védelemnek három szintjét különböztetjük meg. Az első védelmi vonalba tartoznak az antioxidáns enzimek, mint például a szuperoxid dizmutáz (SOD) és a kataláz (KAT), melyek gyökkioltó folyamatokat katalizálnak (Mccord and Fridovich, 1969; Kono and Fridovich, 1982). Képesek a fokozott mennyiségben jelenlévő szabadgyökök semlegesítésére, illetve a láncreakciók iniciációjának megakadályozására, ezáltal a makromolekula károsodás kivédésére. A védelmi rendszer második vonalaként a kis molekulású antioxidánsok (A-, E-, és C-vitamin) lépnek fel a károsító gyökökkel szemben úgy, hogy képesek megszakítani a gyökös láncreakciókat (Buettner, 1993). A már károsodott makromolekulák helyreállítását vagy eltávolítását a védelmi rendszer harmadik vonalába tartozó hőssokk fehérjék, lipázok, proteázok, DNS *repair* enzimek végzik (Gutteridge and Halliwell, 1990; Berlett and Stadtman, 1997; Cooke et al., 2003).

Az egyik fontos exogén tényező a dohányzás, mely fokozhatja a szabadgyökök mennyiségét a szervezetben. Magyarországon a férfiak 32%-a, míg a nők 24,8%-a



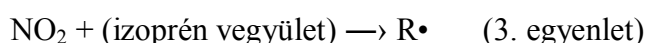
dohányzik. Egy 2016-ban készült statisztika alapján hazánkban férfiak esetében a halálozások 26,25%-a, nők esetében 13,98%-a hozható kapcsolatba a dohányzás okozta szövődeményekkel ("Tobacco atlas," 2016). Mivel maga a dohányzás csupán egy életmódbeli tényező, így a leginkább kivédhető halálokok között tartják számon. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) becslése szerint a dohányzás jelenleg évente közel hatmillió halálesetért felelős - ami hat másodpercenként egy halálozást jelent. Ha nem történik változás a dohányzási trendben, ez a szám 2030-ig évente nyolcmillió halálesetre emelkedhet (Mathers and Loncar, 2006).

A dohányzás károsító hatásaiért főként a dohányfüstben található anyagok tehetők felelőssé. A dohányfüst több, mint 4700 kémiai vegyület komplex elegye, és szabadgyökök, nehézfémek és egyéb oxidáló szerek magas koncentrációját tartalmazza (Pryor, 1992). A dohányfüstöt alapvetően két fázisra oszthatjuk, megkülönböztetünk gáz és kátrány fázist (Pryor, 1992). Mindkét fázisban találhatók szabadgyökök, ugyanakkor a két fázis rendkívül különböző összetételt mutat. A gáz fázisban található szabadgyökök rövid életidejűek, míg a kátrány fázis magas koncentrációban tartalmaz stabil, hosszú élettartamú gyököket, mint pl. kinon gyököket.



A  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -ből a SOD enzim által katalizált reakció során  $\text{O}_2$  és  $\text{H}_2\text{O}_2$  keletkezik (1. egyenlet) (Church and Pryor, 1985).

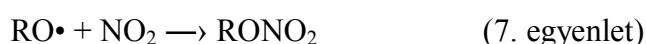
A gáz fázis oxigén és szén központú szerves gyökeinek életideje kevesebb, mint 1 másodperc (Pryor et al., 1983). Azonban az idő előrehaladtával koncentrációjuk magas marad, mivel egymással dinamikus egyensúlyi állapotot tartanak fenn, így folyamatosan keletkeznek és lebomlanak (Pryor, 1992). Mindez a gáz fázisban található NO kémiai tulajdonságaira vezethető vissza (Pryor and Stone, 1993). Nevezetesen, hogy a NO képes lassan nitrogén-dioxiddá ( $\text{NO}_2$ ) alakulni, mely aztán reakcióba lép a füst más olyan összetevőivel, mint például az izoprén vegyületek. Így alakulnak ki szén központú szerves gyökök ( $\text{R}^{\bullet}$ ) (2. és 3. egyenlet). Ebből következően ezen gyökök más reakcióból származó metastabil termékeként foghatók fel (Church and Pryor, 1985).



A szerves gyökök további sorsát a következő egyenletekkel lehet szemléltetni:



Miután kialakultak, az  $R\bullet$  gyökök gyorsan reakcióba lépnek a füst  $O_2$  tartalmával, így peroxil gyökök ( $ROO\bullet$ ) keletkeznek (4. egyenlet). A  $ROO\bullet$ -k a NO által katalizált reakció során deoxigenálódnak, így alkoxil gyökök ( $RO\bullet$ ) alakulnak ki (5. egyenlet). Az  $RO\bullet$  mellett keletkező  $NO_2$  pedig egy újabb láncreakciót képes inicializálni (Church and Pryor, 1985). A láncreakció terminációja a 6-8. egyenlet alapján valósulhat meg, melyek során peroxi-nitrátok ( $ROONO_2$ ), alkil-nitrátok ( $RONO_2$ ) és alkil-nitritek ( $RONO$ ) keletkeznek:



A fokozott oxidatív terhelés következményeképpen számos létfontosságú molekula nitrációja, és oxidációja valósulhat meg. A fehérjék tirozin oldalláncainak nitrálódása 3-nitrotirozin (3-NT) képződéshez vezet, amely a NO-függő oxidatív károsodás markere. A NO és a  $ONOO^-$ -mediált 3-NT képződés a krónikus dohányosok vérplazmájában és vérlemezkéiben emelkedett szintet mutat (Petruzzelli et al., 1997; Takajo et al., 2001). Pignatelli és munkatársai kísérleteik során kimutatták, hogy a dohányzók vérében szignifikánsan magasabb a nitrált- és oxidált fibrinogén, mint a nemdohányzók esetében, melyek fontos szerepet játszanak a vas háztartásban és a sejtmembránok stabilitásában (Pignatelli et al., 2001).

A megemelkedett ROS szint jelentős membránkárosodást eredményez a fokozott lipidperoxidáció következményeként (Ayala et al., 2014). A lipidperoxidáció általában olyan folyamatként írható le, amelynek során az oxidáló szerek, például a ROS-ok megtámadják a szén-szén kettős kötéseket tartalmazó lipideket, különösen a többszörösen telítetlen zsírsavakat (PUFA) (Yin et al., 2011). A glikolipidek, a foszfolipidek (PL) és a koleszterin (Chol) szintén közismert célpontjai a káros peroxidációs módosulásoknak. A membrán lipid peroxidációjára adott válaszként, valamint a sejtek metabolikus körülményeinek és hibajavító képességének megfelelően

a sejtek túlélése vagy halála indukálódik (Fruhworth et al., 2007; Kinnunen et al., 2012; Volinsky and Kinnunen, 2013).

A lipidperoxidáció teljes folyamata három lépésből áll: iniciációból, elongációból és terminációból (Kanner et al., 1987; Girotti, 1998; Yin et al., 2011). A lipidperoxidáció első lépésében a prooxidánsok, mint például a  $\text{OH}^\bullet$ , hidrogén elvonással allil-hidrogént, valamint szén-központú lipidcsoportot képeznek ( $\text{L}^\bullet$ ). Az elongáció fázisban a  $\text{L}^\bullet$ , lipidperoxil gyökké ( $\text{LOO}^\bullet$ ) reagál az oxigénnel, amely egy másik lipidmolekulától hidrogént von el, új  $\text{L}^\bullet$ -t (amely folytatja a láncreakciót) és lipid hidroperoxidot ( $\text{LOOH}$ ) eredményezve. A terminációs reakcióban antioxidánsok közreműködésével, mint például az E-vitamin, stabil termékek jönnek létre (Yin et al., 2011).

A 4-hidroxi-nonenal (4-HNE) a legintenzívebben vizsgált lipidperoxidációs végtermék, nemcsak fiziológias, hanem citotoxikus hatása miatt is. Gátolja a génexpressziót valamint elősegíti a különböző kóros állapotok kialakulását és progresszióját (Ayala et al., 2014). Az  $\alpha$ ,  $\beta$ -telítetlen elektrofil vegyületek, mint a 4-HNE, a 4-hidroxi-alkenálok végtermékének fő típusai, amelyeket az arachidonsav és nagyobb PUFA-k bomlásával, enzimatis vagy nem-enzimatis folyamatok útján keletkeznek (Esterbauer et al., 1991). A 4-HNE egy rendkívül reaktív vegyület, amely tartalmaz (i)  $\text{C} = \text{C}$  kettős kötést, amely célpont lehet a tiol csoportok Michael-addícióihoz, redukciójához vagy epoxidációjához, (ii) karbonil-csoportot, amely célpontja lehet a Schiff-bázis képződésének, oxidációjának vagy redukciójának illetve (iii) hidroxil-csoportot, amely ketonná oxidálható (Schaur, 2003).

A dohányzás befolyással lehet az emberi szervezet finoman szabályozott fém homeosztázisára is, melynek felbomlása szintén az oxidatív stressz fokozódásához vezethet (Bernhard et al., 2005; Frei et al., 1991). Az alumínium, a kadmium, a króm, a réz, az ólom, a higany, a nikkel és a cink mind megtalálhatók különböző koncentrációban a dohánynövényben (*Nicotiana tabacum*), a cigaretta papírban, a szűrőkben és a cigarettafüstben egyaránt. Bernhard és munkatársai eredményei alapján a cigarettafüstben lévő fémek a sejt-sejt kapcsolatok megszakadását, illetve citoskeletális károsodásokat okoznak, ezáltal drámai morfológiai változásokat idéznek elő, melyek a vaszkuláris endotélium diszfunkciójának kialakulásához vezethetnek (Bernhard et al., 2003). Ugyanakkor a fémek által közvetlen módon kiváltott fokozott szabadgyök

képződés szerepet játszhat a rákos folyamatok, *rheumatoid arthritis*, a kardiovaszkuláris anomáliák, vagy a *diabetes mellitus* kialakulásában is (Bisht and Dada, 2017).

### 3.2 Terhesség alatti dohányzás hatásai

A terhesség fokozott megterhelést jelent az anya szervezetére (Casanueva and Viteri, 2003). A terhességhez megnövekedett metabolikus igény társul, a szöveteknek több oxigénre van szükségük, így fokozódhat az oxidatív stressz kialakulásának a veszélye (Saikumar et al., 2013).

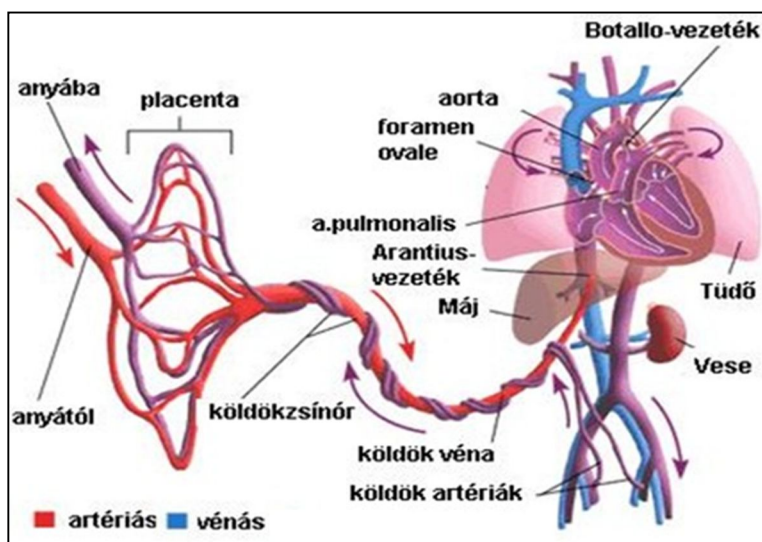
Terhesség során a fizikai kapcsolatot az anya és a magzat között a placenta és a köldökzsinór biztosítja. Az anyai és a magzati vér nem keveredik egymással, mivel a placenta szöveti *barrier*ként funkcionál. A placenta eredete kettős, a magzati membránok és a méhnyálkahártya fúziójával keletkezik (Maltepe and Fisher, 2015). A méhlepény egyik fő szerepe, hogy meggátolja az anyai vérrel érkező káros anyagok átjutását a magzati keringésbe. Ez a szűrő funkció azonban nem teljes. A kisebb molekulák, fémek, gázok egy része könnyedén átjuthat a placentán. Kulcsfontosságú funkciója a placentának, hogy oxigenizálja a magzat felől érkező „fáradt” vért (Wick et al., 2010).

A placenta átjárható a szabadgyökök számára, sőt ezek a terhesség előrehaladtával a placentában is kialakulhatnak (Myatt and Cui, 2004). A szabadgyökök a magzati struktúrákban módosíthatják a sejtciklusban, jelátvitelben és homeosztázis-kontrollban résztvevő gének aktiválódását, hozzájárulva az endogén össejt-javító mechanizmusok defektusához (Tran et al., 2011), súlyos esetben betegségek kialakulásához is vezethetnek (Buonocore et al., 2002; Faux et al., 2009; Vargas et al., 2013).

A placentával ellentétben a köldökzsinór kizárólag magzati eredetű, a terhesség 12. hetére éri el végleges formáját (Burton and Jauniaux, 2015). A köldökzsinór egy összekötő szerv a magzat és a méhlepény között, mely biztosítja az oxigén és a tápanyagok szállítását. Hossza emberek esetében körülbelül 50-70 cm, átmérője pedig kb. 2 cm (Ente and Penzer, 1991). A humán köldökzsinór három véreteret tartalmaz, kettő artériát és egy vénát, melyek egy rugalmas kötőszövetbe (Wharton kocsonya) ágyazottan helyezkednek el (2.ábra) (Mauro et al., 2011). A köldökzsinór véna oxigénben és tápanyagban gazdag vért szállít az anyai oldal felől a magzat felé, míg a

két artéria feladata a magzat felől a salakanyagban gazdag, oxigénben szegény vér szállítása a méhlepény felé (2.ábra). A köldökzsín erek nem állnak idegi szabályozás alatt (Fox and Khong, 1990).

A magzat megfelelő ütemű fejlődését a köldökzsín erek állapota mellett az erekben keringő eritrocita populáció állapota határozza meg. Az eritrocita populáció felelős a magzat megfelelő oxigén ellátottságáért (Hamasaki and Yamamoto, 2000).



**2. ábra: Magzati keringés vázlatos ábrázolása**

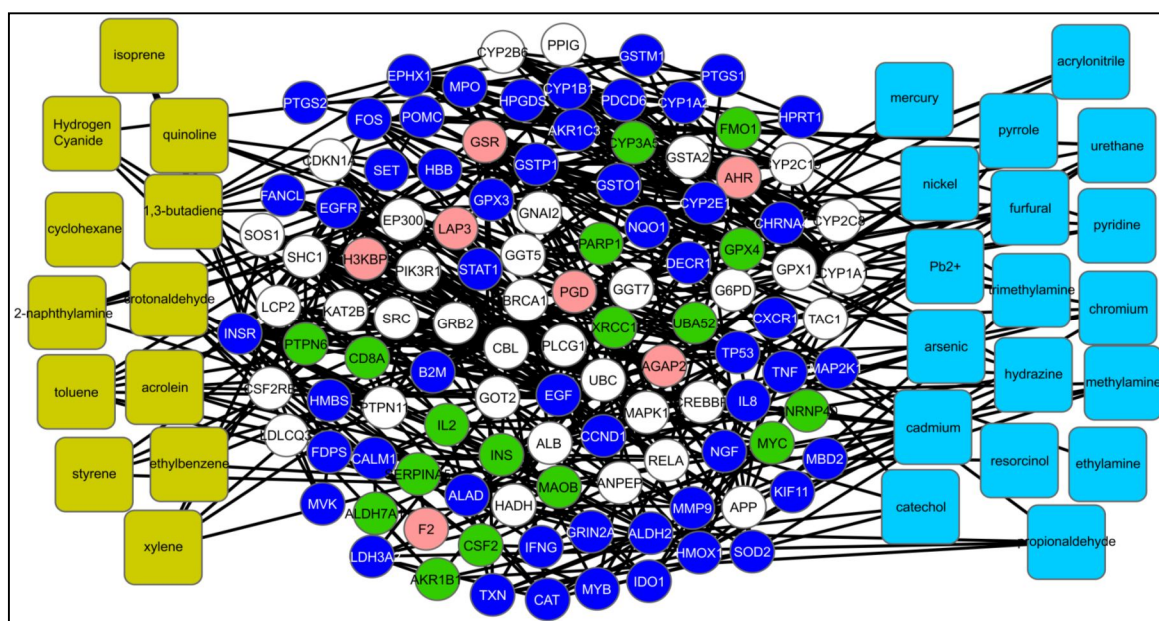
Forrás: <https://image.slidesharecdn.com/fetalcirculation-170503130321/95/fetal-circulation-3-638.jpg?cb=1493816617>

A terhesség alatti aktív dohányzás közvetlenül hat az édesanya szervezetére, valamint befolyásolja a magzat fejlődését is azáltal, hogy a már említett káros összetevők egy része, mely megtalálható a dohányfüstben, mint például nehézfémek, pro-oxidánsok, átjuthatnak a placentán (Department of Health and Human Services, 2006; U.S. Department of Health and Human Services, 2010).

Neuman és munkatársai számos olyan hatást megvizsgáltak, melyek befolyásolhatják a magzat fejlődését, beleértve a környezeti füst-expozíciót is. Azoknál a 4-6 éves korú gyermekeknél, akiknek az édesanyja a terhessége alatt dohányzott, az esetek 10,4%-ánál kimutatható volt a neheztített légzés, 6,6%-nál az asztmás megbetegedés (Neuman et al., 2012).

A terhesség alatti dohányzást számos más kisgyermekkori problémával is összefüggésbe hozták, mint például az elhízás (Oken et al., 2008). A felnőttkori dohányzási szokások kialakulása is jelentősebb volt a dohányos édesanyáktól született utódoknál (De Genna et al., 2017).

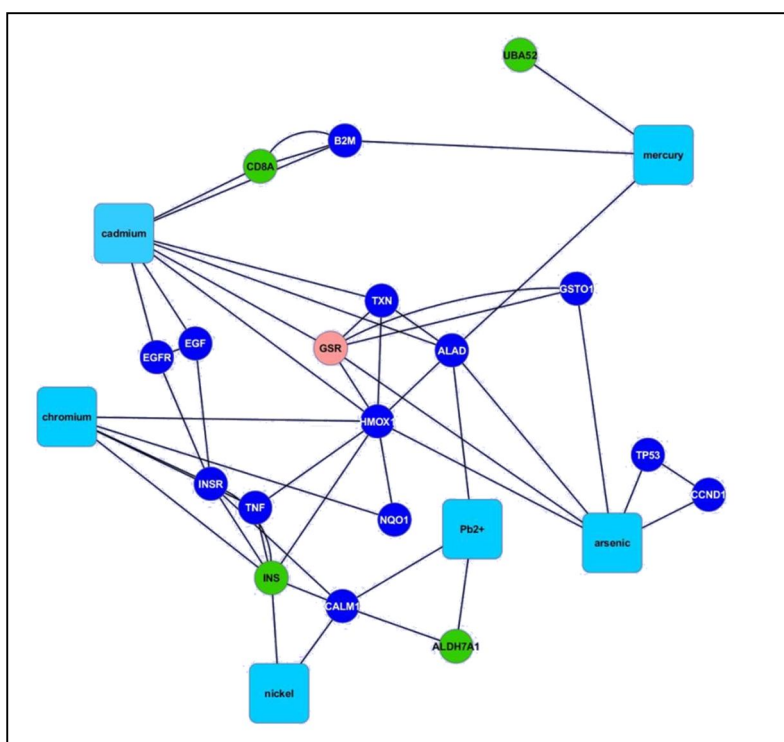
2013-ban Feltes és munkatársai összefüggést kerestek a terhesség alatti dohányzás során az anya és a magzat szervezetébe kerülő anyagok és az esetlegesen indukálódó gének között. Munkájuk során embrionális és magzati korban, placentából származó szövetminták és köldökzsinór vérminták génexpressziós és fehérje-fehérje kölcsönhatásait tartalmazó adatbázisokat vizsgáltak. A terhesség során megkülönböztetünk embrionális és magzati kort. Az előbbi a terhesség 12. hetéig tart, majd ezt követi a magzati kor. Vizsgálataik során kimutatták kémiai-biológiai megközelítések segítségével, hogy a dohány komponensek számos biológiai folyamat megzavarásában játszhatnak szerepet, beleértve a jelátvitelt, a hormonszintézist, az anyagcserét, a DNS-hibajavítást és a gyulladást (Feltes et al., 2013). A 3. ábra szemlélteti a fehérje-fehérje és kemikália-fehérje kapcsolatok hálózatát, melyet Feltes és munkatársai közöltek. Ez a bonyolult hálózat azt hivatott bemutatni, hogy a dohányzás milyen sokrétűen képes befolyásolni a szervezet működését már az embrionális kortól kezdve.



**3. ábra: Kémiai anyag-fehérje és fehérje-fehérje interakciók sematikus ábrázolása**

CentiScape nevű program segítségével határozták meg a szabadságfokokat és a nódusz csomópontokat a kirajzolódott hálózat egyes elemei között. 143 elem található a hálózatban, melyből 30 a dohányban megtalálható komponens, 53 fehérje (kék kör) melyek embrionális és magzati korban is megjelennek, 17 fehérje (zöld kör), melyek csak az embrionális és 7 (rózsaszín kör), melyek csak a magzati korban megjelenő fehérjéket jelölték. A hálózatban található még 36 olyan fehérje (fehér kör), melyek szintén érintettek ezen kemikáliák és fémek által, de expressziójukat a méhen belüli fejlődés során még nem igazolták. (Feltes et al., 2013).

A 4. ábrán látható a cigarettában található jelentősebb fémek és interakciós partnereik Cytoscape program által generált hálózata, melyet Feltes és munkatársai adatai alapján készítettem. Összesen 18 fehérjét rajzolt ki a program, melyből 13 embrionális és magzati korban is indukálódik fémek hatására. Négy olyan fehérje van, mely csak embrionális korban és csupán csak egy olyan, ami csak magzati korban mutatott indukciót. A hálózatok alapján a kadmium az a fém, amely a legtöbb fehérje kifejeződését befolyásolta terhesség alatt. A középpontban olyan antioxidáns molekulák állnak, mint például a hemoxigenáz 1 (HMOX1), tioredoxin (TXR) vagy a magzati korban megjelenő glutation reduktáz (GSR) (Feltes et al., 2013). Fő feladatuk a szabadgyökös láncreakció iniciációjának megakadályozása a szabadgyökök semlegesítése révén. A fémek tartós jelenléte apoptózishoz vezethet, melyet mi sem bizonyít jobban, mint hogy a hálózat végpontjai között számos apoptózis marker van jelen, pl. a tumorszupresszor p53 (TP53).



**4. ábra: A dohányfüstben megtalálható fémek és interakciós partnereik ábrázolása**

Az árba a Cytoscape program segítségével Feltes és mtsai alapján leírt kölcsönhatások alapján készült. Rózsaszín jelöli a magzati szövetben található, zöld az embrionális szövetre, sötétkék pedig a mindkét szövet típusra jellemző markereket.

Az eddigiek alapján elmondhatjuk, hogy a terhesség alatti dohányzás következtében a méhlepényen átjutva a magzatra is károsító hatással lehetnek azok a kemikáliák, fémek, pro-oxidánsok, melyek a dohányfüstből kerülnek az anya

szervezetébe. Ezek az ágensek közvetlenül károsíthatják a keringő eritrocitákat és a köldökzsinór erek közül főként a vénát (Zahorán és mtsai. közlésre benyújtva), ezen belül is az endotél sejteket, melyek a leginkább kitéttek ezeknek a hatásoknak. Ha sérül az endotél réteg, akkor az erek funkciója is sérül, ami hatással lehet a keringő eritrocitákra is.

### 3.3 *Az eritrociták általános jellemzése*

Az eritrociták morfológiáját Jan Swammerdam, holland biológus 1668-ban írta le. A humán eritrocitákat bikonkáv alak jellemzi, mely alapján diszkocitáknak is nevezzük őket. A felnőtt vérben keringő eritrociták átmérője 7,5-8,7  $\mu\text{m}$ , magasságuk 1,7-2,2  $\mu\text{m}$ . Az eritrocitáknak egyfajta rugalmassággal kell rendelkezniük, hogy a méretüknél kisebb kapillárisokon is át tudjanak jutni, majd ezután a formai változás után képesnek kell lenniük visszanyerni eredeti alakjukat (Mohandas and Gallagher, 2009). A bikonkáv forma esetén a strukturális változáshoz kevesebb energia kell és a felület is nagyobb, mint egy gömb alakú testnek, így képes nagyfokú deformabilitásra (Yeow et al., 2017).

Eritropoézis, azaz a vörsejtek képződési folyamata emlősök esetében először a 8. terhességi héttől kezdődően a magzati májban, majd a 9. héttől a lép részvételével indul (Palis et al., 1999). A magzati májban és a felnőtt csontvelőben a vérképző sejtek folyamatosan alakulnak ki pluripotens őssejtek kis populációjából, amelyek hematopoietikus vonalat alakítanak ki (Hattangadi et al., 2015). Az eritropoézis finom, rövid távú szabályozását a vese eredetű citokin, az eritropoetin szabályozza, amely hipoxiás körülmények között indukálódik (Rangarajan and Juul, 2014).

Felnőttek eritrocitái 120 napos élettartamúak. Az újszülöttek eritrocitáinak élettartama 60-90 nap (Pearson, 1967). A születést követő első 4-6 héten az eritrociták deformabilitási paraméterei még nem érik el a „normál” szintet (Hutchinson, 2000).

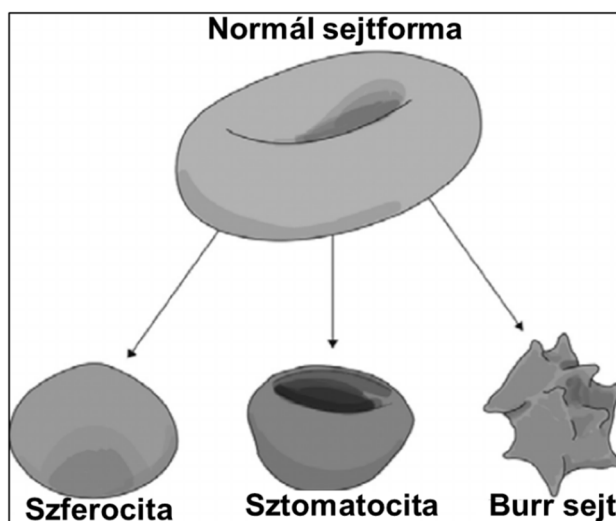
Az újszülöttkori eritrociták több glükózt fogyasztanak és magasabb ATP-szinttel rendelkeznek, mint a felnőtt eritrociták. A glutation-peroxidáz, a methemoglobin reduktáz és a szénsav anhidráz szintje viszont alacsonyabb az újszülöttek eritrocitáiban (Beutler et al., 2011). Az alacsonyabb enzim szintekből adódóan az újszülöttkori eritrociták hajlamosabbak az oxidatív károsodásra, ami methemoglobin és Heinz-testek (hemoglobin zárványok) (Greenberg, 1976) kialakulásához vezethet (Gross et al., 1967; Zipursky et al., 1983).



Normál körülmények között az eritrociták körülbelül 1%-a naponta újra képződik, ugyanakkor az eritrocita képződés jelentősen megnőhet akut vagy krónikus stressz idején, például akut trauma vagy hemolízis esetén.

Az eritrociták bikonkáv sejtformája megváltozhat, ha a fiziológiástól eltérő környezetbe kerülnek. A morfológiai variánsok kialakulásának oka lehet a membránhálózatuk függőleges és/vagy a vízszintes interakciókban bekövetkező változása is, melyek deformálhatósági problémákat okozhatnak (Kim et al., 2012).

Az eritrociták morfológiai variánsainak nagy számát ismerjük. Újszülöttek esetében az eritrociták nagyobbak és több fenotípus variációt mutatnak, mint a felnőttek eritrocitái (Forestier et al., 1991). Méretbeli különbségek alapján megkülönböztetünk mikrocitákat és makrocitákat. Sejtforma alapján tíz különböző variánst különböztethetünk meg; ún. target sejteket, szferocitákat, ovalocitákat, sztomatocitákat, akantocitákat, fragment sejteket, schisztocitákat, könnyecsepp formájú sejteket, Burr sejteket, valamint sarló sejteket. Ezek közül a morfológiai változatok közül az 5. ábrán a leggyakrabban kialakuló variánsok, a szferociták, a sztomatociták és a Burr sejtek láthatóak. Az alakbeli változásokat a sejtkörnyezet pH-jának, ozmolaritásának, biokémiai és metabolikus állapotának változásai indukálják (Reinhart and Chien, 1986; Wong, 1999). Emellett a Burr sejtek képződésének hátterében membránlipid összetétel átrendeződés is állhat, leginkább a foszfatidil-szerin (PS) és a foszfatidil-etanolamin (PE) külső membránlemezbe történő transzlokációja (Henszen et al., 1997).



5. ábra: Eritrociták morfológiai változatai (Payliss et al., 2015)

A felsorolt morfológiai variánsoknak klinikai diagnózisok felállításában is szerepük lehet. A sztomatociták, melyek általában ovális alakúak, középtájon egy

világosabb festődésű résszel, megjelenése például obstruktív máj betegségeknél és Rh izoimmunizációnál gyakori. A Burr sejtek és az akantociták megjelenhetnek stressz hatására, veseműködési zavarokra, foszfát hiányra. A szferocita forma a vashiányos anémiára jellemző (Ford, 2013). Ezeken kívül a könnyecsepp sejtforma is gyakran megfigyelhető vérkeneteken, melyeket arról lehet felismerni, hogy az eritrocita az egyik végén egy pontra kúposodik, hasonlítva egy cseppre. Több kóros állapotban is megfigyelték, azonban specifikusan egyikhez sem volt köthető (Ford, 2013).

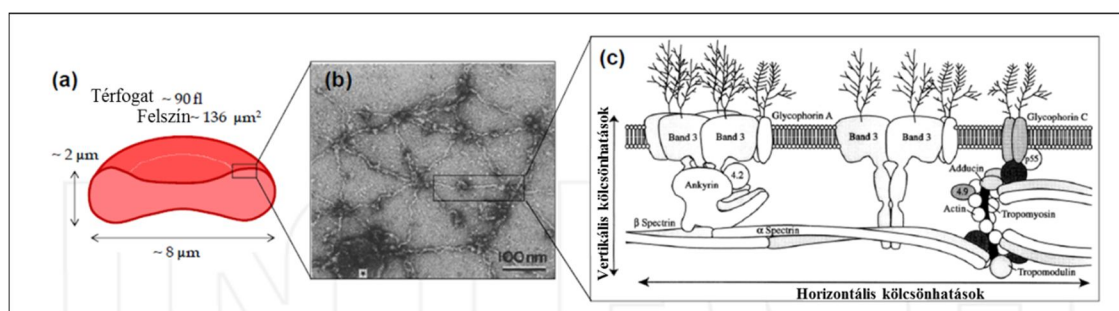
George Gulliver és William Hewson 1862-ben publikálta az emlősök vérében található eritrociták membránjainak elsődleges jellemzőit. Gorter 1925-ben leírta az eritrociták membrán szerkezetét. A lipid kettősrétegű plazmamembrán fontos szerepet játszik az egyedülálló bikonkáv alak fenntartásában, mely a funkciójuk szempontjából kritikus, reverzibilis deformálódás következtében lehetővé teszi mozgásukat a 2-3  $\mu\text{m}$  átmérőjű hajszálerekben is (Tse and Lux, 1999). Az eritrocita membrán körülbelül 39,5%-ban fehérjét, 35,1%-ban lipideket, 19,5%-ban vizet és 5,8%-ban szénhidrátokat tartalmaz (Yawata, 2003). Az emlős eritrocita membránokat poláros lipidek (foszfolipidek, szfingolipidek), szerin foszfatidok, és glikolipidek alkotják (Zachowski, 1993). Szerkezetük a glicerín-monofoszfátból, ill. az ebből képezhető foszfatidsavból vezethető le. A foszfatidsav szerin aminosavval képezett észtere a PS. A PS dekarboxilezésével PE-t kapunk, amit a metionin aminosav több lépéses reakcióban metilezve foszfatidil-kolinná (PC) alakít. A foszfatidil-inozitol (PI) a foszfatidsav mioinozittal képezett észtere. Az emlősök sejtmembránjának mintegy 5%-át alkotja (Lagace and Ridgway, 2013). A szfingolipidek is a poláros lipidekhez tartoznak, azonban alkohol komponensük nem glicerín, hanem a 4-szfingénin (szfingozin). A 4-szfingénin az emlősök sejtjeiben szabadon nem fordul elő. Nitrogénen acilezett származéka a ceramid és monofoszfátjának kolinnal képezett észtere a szfingomielin (SM) (Gault et al., 2010), mely szintén összetevője az eritrocita membránnak. Ezen összetett zsírsavak mellett a Chol is megtalálható a membránban (Payliss et al., 2015). Fontos megjegyezni, hogy a lipidek aszimmetrikusan oszlanak el az eritrocita membrán két membránlemeze (*leaflet*) között, valamint a Chol, a SM és az egyes glicerofoszfolipidek mennyisége a membrán két oldalán eltérő (Zachowski, 1993). Az eritrociták esetében a PC 65-75% -a és a SM 85% -a található meg a membránlemez külső oldalán, míg a PE 80-85% -a, a PS több mint 96% -a, a PI több mint 80% -a membránlemez belső oldalán található meg (Zachowski, 1993); a Chol egyenletesen

oszlik meg a membrán két oldalán. A lipidek közül a Chol és a SM biofizikai vizsgálata bizonyította, hogy részt vesznek a lipidraftok kialakításában (Giocondi et al., 2004).

Számos szerző beszámolt az eritrocita membránoknak a különböző betegségek során fellépő megváltozott lipidösszetételéről (Cooper et al., 1972; Owen et al., 1982). A többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA) fontos szerepet játszanak a membránok optimális fluiditásának és működésének fenntartásában, és számos biológiailag aktív molekula, az eikoszanooidok (prostaglandinok, leukotriének és tromboxánok) prekursorai. A PUFA összetételbeli változásai összefüggnek a sejtmembrán „folyékonyságának” változásával (Owen et al., 1982; Stubbs and Smith, 1984; Hagve, 1988), valamint többek között a kation transzporttal (Owen and McIntyre, 1978; Corrocher et al., 1987). Kim és munkatársainak eredményei alapján a PUFA-k, különösen az omega-3 zsírsavak az eritrocitákban a kardiovaszkuláris megbetegedések kockázatának mutatói lehetnek (Kim et al., 2018).

Az eritrociták membránszerkezete háromrétegű; egy külső szénhidrát-gazdag rétegből, transzmembrán fehérjékkel tűzdelt 4-5 nm vastagságú foszfolipid kettősrétegből, és egy hálószerű spektrin-aktin citoskeleton hálózattól áll. Utóbbi kapcsolódik a lipid kettősréteghez (Kim et al., 2012) (6. ábra).

A fehérjekötéseket magába foglaló kapcsolatokat két csoportba sorolhatjuk: az egyik a vertikális kölcsönhatások hálózata, míg a másik a kétdimenziós spektrikus hálózat kialakulásához kapcsolódó kötéseket biztosító horizontális interakciók (6. ábra C panel) (Kim et al., 2012).



**6. ábra: Az egészséges eritrociták membránjának, geometriájának (diszkocita forma) és spektrin hálózatának vázlatos ábrázolása**

Az a és b panel mutatja a spektrin hálózat kétdimenziós összeköttetését. A c panel az eritrocita membrán keresztmetszeti nézete vertikális és horizontális kölcsönhatásokkal (Kim et al., 2012).

A spektrin hálózat szerepet játszik az eritrociták nyírási rugalmassági tulajdonságainak alakulásában. Integrált és perifériás fehérjék kapcsolják össze a foszfolipid réteget és a spektrin hálózatot (Narla and Mohandas, 2017).

Az eritrociták nagy hatékonysággal képesek deformálódni, ezzel minimálisra csökkentik az áramlással szembeni ellenálló képességüket. A nagyfokú deformabilitáshoz a sejt bikonkáv alakja mellett a membrán viszkoelaszticitása és a sejtplazma viszkozitása is hozzájárul. A rigidebb eritrociták kevésbé képesek a kapillárisokon átjutni, és emellett növelik a trombózisra való hajlamot (Aarts et al., 1986). A megnövekedett rigiditást elsősorban a plazmamembrán összetevőinek csökkent fluiditása, a citoszkeleton és a citoplazmatikus viszkozitás határozza meg (Du et al., 2014). Az eritrocita membrán deformálódási képességét az elasztikus és a plasztikus képességeik teszik lehetővé. A Binnig és munkatársai által bevezetett atomerő mikroszkópos (AFM) technika (Binnig and Quate, 1986) segítségével az eritrociták reológiai paraméterei vizsgálhatók (Discher et al., 1994).

Az AFM technika fejlődésével lehetővé vált a biológiai minták fiziológiához közelítő körülmények között történő vizsgálata (Engel and Müller, 2000; Yang et al., 2011). A deformabilitási paramétereket egy adott erőhatást követően erővonalak segítségével az egész sejt felszínén mérni tudjuk, így szolgáltat egy általános képet a sejt deformálódási tulajdonságairól (Girasole et al., 2012). Ezen mérhető paraméterek egyike az elaszticitás, mely az eritrociták kisebb érbe való bejutáshoz szükséges alakváltozását jellemzi. A plaszticitás pedig ezzel ellentétes, azt jellemzi, milyen hatékonysággal képes visszanyerni bikonkáv alakját.

### ***3.4 Az eritrociták szerepe a NO tárolásában és szintézisében***

Az eritrociták oxigénszállító funkciója mellett meg kell említenünk a szabályozó funkcióit is, melyek közül egyik a vérplazmában lévő szabad NO megkötése, azaz "NO süllyesztőként" működnek (Gladwin et al., 2004; Helms and Kim-Shapiro, 2013). Azonban Kleinbogard munkái alapján felmerült annak a lehetősége, hogy az eritrociták nem csak a NO tárolására, hanem annak szintézisére is képesek (Kleinbogard et al., 2006). Cortese-Krott és munkatársai bizonyították is, hogy a felnőtt eritrociták rendelkeznek saját nitrogén monoxid szintáz aktivitással, ezáltal képesek bioaktív NO szintézisére (Cortese-Krott et al., 2012; Cortese-Krott and Kelm, 2014). Kutatócsoportunk 2016-ban kimutatta, hogy a magzati eritrociták is rendelkeznek NOS3 enzimmel (Dugmonits et al., 2016).

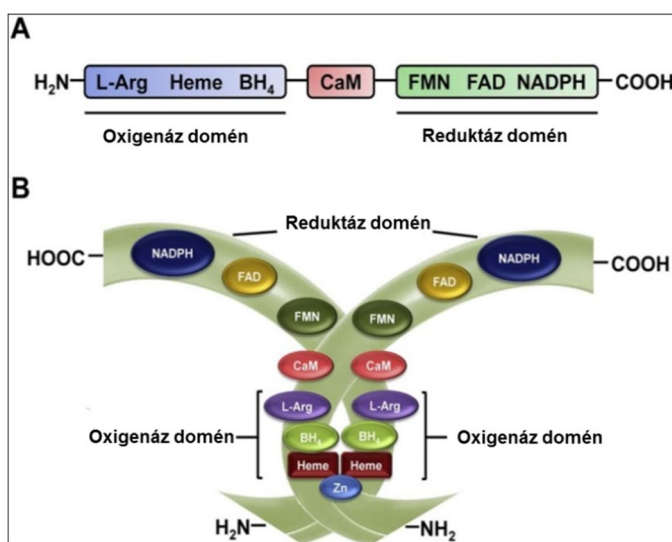
### 3.4.1 Nitrogén monoxid szintáz család (NOS)

A nitrogén monoxid szintáz család (NOS, EC 1.14.13.39) felelős a NO szintéziséért. Három izoformája ismert, a neuronális (NOS1), az indukálható (NOS2) és az endotéliális nitrogén monoxid szintáz (NOS3), melyeknek némileg eltérő fiziológiás és expressziós profiljuk van (Bredt, 1999). Kutatásunk fókuszában a NOS3 áll, mely az endotél sejtek mellett az eritrocitákban is megtalálható (Cortese-Krott and Kelm, 2014).

### 3.4.2 NOS3 szerkezete és szabályozása

A NOS3 az endotéliális- és izomsejtekben expresszálódik és az erek tónusának szabályozásában játszik fontos szerepet a NO termelése révén (Förstermann and Sessa, 2012). A NOS3 homodimer formában képes ellátni a funkcióját (Roman et al., 2002). Mindkét monomer tartalmaz egy N-terminális oxigenáz és egy C-terminális reduktáz domént, valamint egy, centrálisan elhelyezkedő kalmodulin (CaM)- kötő szekvenciát (Piazza et al., 2014; Volkmann et al., 2014) (7. ábra). A homodimer formát összekapcsolt, azaz *coupled* formának is nevezik. A másik, azaz az inaktív formája az ún. szétkapcsolt, azaz *uncoupled* forma.

A NOS3 oxigenáz doménje tartalmaz egy L-arginin, egy hem és egy 5,6,7,8-tetrahidropterin (BH<sub>4</sub>) kötő helyet. A reduktáz doménen a flavin adenin dinukleotid (FAD), a flavin mononukleotid (FMN) és a NADPH kötőhelyek találhatók (7. ábra A panel).



7. ábra: A NOS3 domén és dimer szerkezete

Az A panelen a NOS3 domén szerkezete, míg a B ábrán a dimer szerkezet látható. A C-terminális egy kalmodulin-kötő szekvencia kapcsolja össze az N-terminálissal (Oliveira-Paula et al., 2016).

A homodimer struktúrát a NOS3 esetében a BH<sub>4</sub> (Crane et al., 1998) és az oxigenáz domén cink-kötő része stabilizálja (Chen et al., 1994, 1995). A BH<sub>4</sub> a fokozott oxidatív stressz következtében oxidálódik, így képtelen ellátni az összekapcsoló funkcióját (Albrecht et al., 2003).

Humán NOS3 esetében a cink-kötődés a 94 és a 99-es pozícióban lévő ciszteinen történik meg mindkét monomeren, ami szerkezetileg, nem pedig funkcionálisan fontos. A BH<sub>4</sub> a két felület között kötődik a hem-hez Van der Waals- és hidrofób kölcsönhatásokkal (Fischmann et al., 1999). A BH<sub>4</sub> a hem prosztetikus csoport redoxpotenciáljának modulálásáért felelős.

Az elektrontranszfer elindításához a NADPH-nak kötődnie kell a C-terminális reduktáz doménhez. Ezen reduktáz doménen belül egy elektron átadás történik a NADPH-ból más kötött kofaktorokra; elsőként a FAD-ra, majd FMN-ra. Az FMN-kötő domén konformáció változása feltételezi, hogy az FMN domén „hintázik” a reduktáz és az oxigenáz domén között, hogy az elektronok az alegységek között áthaladhassanak. Ezután az elektron az oxigenáz doménre adódik át a hem-en keresztül, így redukálva azt. A redukált hem ezután katalizálja a NO szintézisét az L-argininből és az O<sub>2</sub> szubsztrátból, és így L-citrullin képződik melléktermékként (Hellermann and Solomonson, 1997).

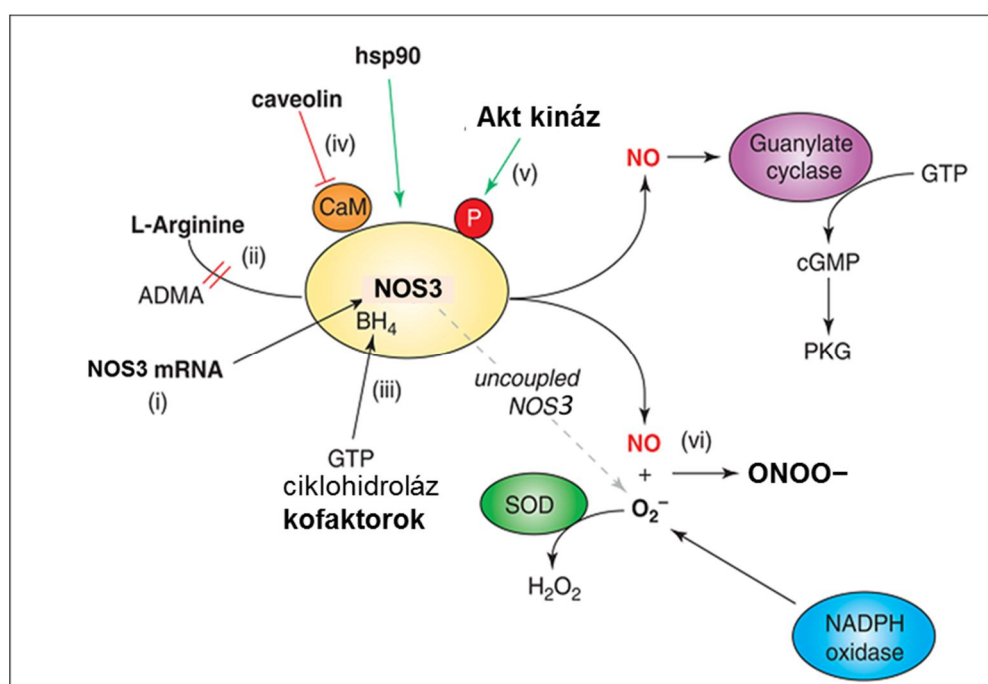
A NOS3 aktiválásának szabályozása a szubsztrát és a kofaktorok hozzáférhetőségétől függően (pl. a fokozott oxidáció következtében fellépő BH<sub>4</sub> csökkenésével), poszttranszlációs módosítások útján, vagy a celluláris lokalizáció és/vagy protein-protein kölcsönhatások révén valósul meg (Albrecht et al., 2003).

A NOS3 aktivációjának szabályozása endotél sejtekben rendkívül jól jellemzett. A NOS3 aktivitása nagymértékben függ az intracelluláris kalcium koncentrációjának ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) növekedésétől, amely az endoplazmatikus retikulumból (ER) szabadul fel a receptor függő ligandumok által, mint például acetyl-kolin, bradikinin vagy a hisztamin. A NOS3 aktiválható úgy is, ha a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> szint hosszú ideig nem emelkedik olyan mértékben, hogy stimuláló hatással legyen (Fleming, 2010; Siragusa and Fleming, 2016).

A NOS3 N-terminális régióban három acilező hely található a 2, 15, 26-os aminosavakon. A 2-es glicin még a transzláció során mirisztoilálódik. Ez a membrán lokalizációhoz, illetve ezt megelőzően a kaveolin 1-gyel (Cav-1) való kapcsolat kialakításához szükséges. A 15. és a 26. cisztein aminosavak poszttranszlációs

palmitoilálódnak. Mindezek a módosítások elengedhetetlen feltételei a NOS3 további aktivációjának (Prabhakar et al., 2000).

A NOS3 aktivációját befolyásoló főbb tényezők a következők: a szubsztrát (L-arginin) megfelelő mennyisége, a dimerizáció, mely a BH<sub>4</sub> mennyiségétől függ, a membrán-kötött állapot, melyben fontos szerepet játszik a palmitoiláció, mely a Golgi komplextől vezikuláris transzport során fehérje-fehérje interakciók révén valósul meg, valamint foszforilációs lépések, ahol megkülönböztetünk aktiváló (Ser<sup>1177</sup>, Ser<sup>633</sup>) és deaktiváló (Thr<sup>495</sup>) foszforilációt (Bauer et al., 2003) (8. ábra). Mindezek elengedhetetlen feltételei annak, hogy a NO termelés megtörténjen.



**8. ábra: A NOS3 aktivációjának szabályozása**

A NOS3 által termelt NO biológiai hasznosíthatósága több szinten szabályozott, beleértve a NOS3 mRNS vagy fehérje expressziót; illetve az L-arginin mennyiségén, azaz a szubsztrátján keresztül; kofaktoraival (BH<sub>4</sub>), melyet a GTP ciklohidroláz katalizál; fehérje-fehérje kölcsönhatások révén, például az Cav-1 (gátló, piros) vagy hsp90 (stimuláló, zöld); poszttranszlációs módosításokkal, mint például az Akt és más kinázok (stimuláló, zöld) foszforilációja Ser<sup>1177</sup>-ben; végül a NO-nak a szuperoxiddal való reakciója révén. Rövidítések: ADMA, aszimmetrikus dimetil-arginin; BH<sub>4</sub>, tetrahidrobiopterin; NOS3, endotél-nitrogén-oxid-szintáz; GTP, guanozin-5'-trifoszfát; hsp90, 90 kDa-os hősokk-fehérje; NO, nitrogén-monoxid; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, szuperoxid; ONO<sup>-</sup>, peroxinitrit-anion; PKG, protein kináz G; SOD, szuperoxid-dizmutáz (Huang, 2009).

Az egyik legszélesebb körben tanulmányozott foszforiláció a Ser<sup>1177</sup>, amely a reduktáz doménen a karboxi-terminális részen helyezkedik el (Mount et al., 2007). A Ser<sup>1177</sup> foszforiláció növeli a Ca<sup>2+</sup>/CaM-kötődés által közvetített NOS3 aktivációt (Chen et al., 1999; Michell et al., 2002). Az 5' AMP-activated protein kinase (Chen et al.,

1999) és Akt kinázok (Dimmeler et al., 1999; Michell et al., 1999; Fulton et al., 1999), a protein kináz A (Boo et al., 2002; Michell et al., 2002), a CaM/Ca<sup>2+</sup> függő protein kináz (CaMKII) (Fleming et al., 2001), a protein kináz G (PKG) (Butt et al., 2000) és a protein foszfatáz 2A (Michell et al., 2001) mindegyike részt vehet a Ser<sup>1177</sup> oldallánc foszforilációjának szabályozásában. Az, hogy ennyi kináz képes a szabályozásban részt venni azt tükrözi, hogy a Ser<sup>1177</sup> rendkívül fontos szerepet játszik a NO szintézis szabályozásában.

Az L-arginin a NOS3 és az Argináz-1 (ARG1) közös szubsztrátja. Az ARG (EC 3.5.3.1) egy hidrolitikus enzim, amely az L-arginint karbamiddá és L-ornitinné alakítja, amely a poliamin szintézis prekursora. Az emlősökben két különböző ARG enzimet írtak le (1. és 2. típusú), amelyeket külön gének kódolnak, és specifikus szubcelluláris lokalizációval és szöveti eloszlással rendelkeznek. Az ARG1 citoszolikus enzim, amely elsősorban a májban van jelen, de az endotél és simaizom sejtek is expresszálják (Ignarro et al., 2001), míg az ARG2 elsősorban a mitokondriumban található, és jelentős mértékben expresszálódik a vesében (Jenkinson et al., 1996). A közelmúltban immunhisztokémiai módszerek alkalmazásával patkány aorta endotél sejtjeiről kimutatták, hogy konstitutív módon mindkét formát képesek expresszálni (Berkowitz et al., 2003). Ezen adatok alapján feltételezhető, hogy az érrendszeri argináz aktivitás modulálja az L-arginin intracelluláris szintjét, ami módosítja az NOS által termelt NO mennyiségét (Mori, 2007; Caldwell et al., 2015). A NO koncentrációja a szervezetben az ARG1 és a NOS3 expressziójának és/vagy aktivitásának egyensúlyától függ. Az emelkedett ARG1 aktivitás csökkenti a NOS3 szubsztrát hozzáférését, ezáltal csökkentheti a NO termelődését (Harrison, 1997; Durante et al., 2000).

Az endotél sejtek által termelt NO jelentős szerepet játszik az erek normál működésének fenntartásában. Endotél diszfunkció esetén sérülhet az erekben NOS3 expresszió, vagy az aktiváció nem megy végbe. Ebben az esetben az eritrociták kompenzáló szerepet tölthetnek be a saját NOS3 aktivációjuk révén (Cortese-Krott and Kelm, 2014). Az eritrocita-eredetű NO keletkezése befolyásolhatja a véráramlás sebességét is, hiszen a NO hatással van az eritrociták deformálódási képességére is (Simmonds et al., 2014). A NO számos más biológiailag hasznos funkciója is ismert, úgy, mint a vérlemezék aggregációjának gátlása vagy a simaizom relaxáció serkentése. Mindezeket az oldható guanilát cikláz közvetíti, amely a GTP-t cGMP-be konvertálja, és ezáltal aktiválja a PKG (Martin et al., 2005; Tsai et al., 2011). Robert Furchgott,



Louis Ignarro és Ferid Murad 1998-ban a NO szív- és érrendszerbeli kulcsfontosságú szerepének vizsgálataért fiziológiai/orvostudományi Nobel-díjat kaptak (Shu et al., 2015).

Az eritrocitákban található NOS3 szerkezete jelentős mértékben megegyezik az endotél sejtekben leírtakkal, ezáltal valószínűsíthető, hogy az eritrocitákban a fehérje aktiválási folyamata számos aspektusban hasonlíthat az endotél sejtekben végbemenő folyamathoz (Özüyaman et al., 2008).

#### 4. Célkitűzések

Napjainkban a fejlett országok halálozási statisztikájában a szív és érrendszeri betegségek vezető helyet töltenek be. Kialakulásuk háttere felnőtt korban jól ismert, a klasszikus rizikó faktorai közé tartozik a dohányzás, mely fokozott szabadgyök képződéssel, oxidatív károsodás indukálásával endotéliális diszfunkciót és a vér reológiai paramétereinek romlását eredményezi. Az anyai dohányzás következményeként a placentán átjutó toxikus anyagok befolyásolhatják a magzat méhen belüli fejlődését, esetenként hosszú távú egészségügyi károsodást is okozva. Munkánk során feltételeztük, hogy a magzati fejlődést befolyásoló tényezők, úgy, mint az eritrociták morfológiai, funkcionális és reológiai jellemzőinek változásai, mintegy lenyomatai az embriót ért káros hatásoknak. Ennek megfelelően kerestük azokat a paramétereket, melyek egy esetleges korai jelzőrendszerként szolgálhatnak, nem csupán az eritrocitákat ért károsodásra, hanem az újszülöttek vaszkuláris rendszerének állapotára is.

Vizsgálataink során kerestük a kapcsolatot az eritrociták

- fenotipikus változása és a stressz adaptáció
- morfológiai változásuk és a NOS3 aktivációt befolyásoló tényezők
- szabadgyökök/erős oxidánsok akkumulációja,
- a membrán lipid összetétel és a deformálódási képesség között.

## 5. Anyagok és módszerek

### 5.1 *Mintagyűjtés és mintafeldolgozás*

A köldökszinór artériából származó vér és anyai vénás vérminták a Szegedi Tudományegyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájáról származnak. A mintavétel és a minták feldolgozása a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Regionális Humán Orvosbiológiai Kutatásetikai Bizottság engedélyével (engedélyszám: 149/2012 és 16/2014) az 1964-ben megjelent Helsinki Nyilatkozatban megfogalmazott elvekkel megegyezően, a tájékoztatott anyák hozzájárulásával történt. 2014 januárja és 2018 júniusa között 98 nemdohányzó (kontroll), és 90 dohányos édesanya vénás- illetve újszülöttjeik köldökszinór vérmintáit gyűjtöttük össze. Minden esetben olyan mintákat gyűjtöttünk, ahol a terhesség a 37-41. gesztációs hét között fejeződött be. Mind a kontroll, mind a dohányzó csoportba csak olyan mintákat gyűjtöttünk, melyek komplikációmentes terhességből származtak. A mintagyűjtés során kizáró ok volt, ha a terhesség során az édesanyánál felmerült egészségügyi probléma, például gesztációs diabetesz vagy kardiovaszkuláris megbetegedés. Dohányos minták esetében a fentebb említett kritériumokon kívül feltétel volt, hogy az édesanya saját bevallása szerint naponta elszívjon legalább 10 szál cigarettát. A minták feldolgozása során készítettünk vérkeneteket, valamint a molekuláris biológiai és biokémiai vizsgálatokhoz az etilén-diamin-tetraecetsavval (EDTA) alvadásgátolt vért 5 perc 200 g-vel történő centrifugálással (Thermo Scientific Heraeus Fresco 17 Refrigerated Micro Centrifuge, 24-PI Rotor; 230 VAC) plazma és eritrocita frakcióra különítettük el. Az eritrocita frakciónak kizárólag az alsó 2/3-át használtuk fel. A mintákat a kísérlet típusától függően vagy rögtön felhasználtuk, vagy folyékony nitrogénben történő fagyasztás után -80 °C-on tároltuk.

A továbbiakban a kontroll terhességből született újszülöttek köldökszinór artériájából származó teljes vér esetében a **K**, míg a dohányos édesanyától született újszülöttek esetében a **D** rövidítést használom. Az anyai vérmintáknál hasonlóképpen; a kontrollként tekintett anyai teljes vért **KA**, míg a dohányos anyai teljes vért **DA** néven rövidítem. Az izolált eritrocita populáción végzett kísérleteknél a rövidítések a következőképpen alakulnak: **K-Eritrocita**, **D-Eritrocita**, **KA-Eritrocita** illetve **DA-Eritrocita**.

## 5.2 RNS preparálás fagyasztott mintákból az argináz-1 transzkript mennyiségének meghatározására

A fagyasztott vérmintákból körülbelül 100 mg-ot 1,2 ml RNazolB oldatban (Tel-test, Inc.) homogenizáltunk (2 perc, 1500 fordulatszám/perc), és a gyártótól származó instrukciókat követve össz-RNS-t preparáltunk. Röviden összefoglalva; a homogenizátumokat 2-szer extraháltuk kloroformmal és centrifugáltuk (20 perc, 17000 g, 4 °C), majd a felső, vizes fázisból 0,75 térfogatnyi izopropanollal kicsaptuk az RNS-t. A csapadékot egy éjszakán át 75%-os etil-alkoholban mostuk, majd dietil-pirokarbonáttal kezelt vízben oldottuk fel.

Az RNS koncentrációjának és tisztaságának meghatározását NanoDrop (ThermoScientific) készülékkel végeztük az  $OD_{1A_{260}} = 40 \mu\text{g/ml}$  RNS összefüggést alkalmazva. Amennyiben az  $A_{260}/A_{280}$  arány nagyobb volt 1,8-nál, akkor a minta tisztaságát megfelelőnek tekintettük. Az RNS minták intaktságát 1,2%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Néhány minta esetében az elektroforézis mellett Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) készüléket használtunk, mely az úgynevezett „Lab-on-chip” technikát használja az RNS intaktságának meghatározására. Ezzel a technikával megfelelőnek tekintjük az RNS minőségét, ha a *RNA Integrity Number* (RIN) indexe legalább 7 volt.

## 5.2 Reverz transzkripció (RT)

A cDNS szintézis 5  $\mu\text{g}$  totál RNS-ből kiindulva 20  $\mu\text{l}$  végtérfogatban történt. A templát RNS-t 500 pmol random hexamer primer (Promega) jelenlétében 95 °C-on denaturáltuk, majd 200 U M-MuLV reverz transzkriptáz (Thermo Scientific), 20 pmol dNTP keverék (Thermo Scientific) és 1x RT reakció puffer (Thermo Scientific) jelenlétében 10 percig 37 °C-on, majd 45 percig 42 °C-on inkubáltuk. A reakciót 5 perces 65 °C-on történő inkubálással állítottuk le, majd a mintákat -20 °C-on tároltuk.

## 5.3 Kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR)

Az amplifikálásokhoz templátként 100 ng cDNS-t használtunk fel reakciónként 20  $\mu\text{l}$  végtérfogatban Luminaris Color HiGreen Low ROX qPCR Master Mix-ben (Thermo Scientific). Az Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System készüléket alkalmazva a reakció során a következő lépések mentek végbe: elődenaturálás 10 perc

95 °C-on, majd 40 ciklus során a következő beállításokat alkalmaztuk: denaturálás 15 másodperc 95 °C-on, *annealing* 60 másodperc 63-65 °C-on, szintézis 60 másodperc 72 °C-on. Minden amplifikálás során vizsgáltuk a primerek működésének hatékonyságát is, amit egy úgynevezett disszociációs görbe felvételével tudtunk megtenni. A vizsgált mRNS mennyiségét a 18S RNS mennyiségére normalizáltuk, és a számításokat  $\Delta\Delta C_t$  módszer (Livak and Schmittgen, 2001) alapján végeztük, mintánként 3-3 párhuzamost alkalmaztunk két független sorozatban.

#### 5.4 Primerek

A primerek tervezése során az NCBI Blast programot alkalmaztuk. Humán génszekvenciákra specifikus primereket terveztünk, törekedve arra, hogy a *forward* és reverz primerek különböző exonon helyezkedjenek el.

Primer	
18S RNS	<i>Forward:</i> GAAACGGCTACCACATCCAAGG <i>Reverz:</i> CCGCTCCCAAGATCCAACACTACG
Argináz-1	<i>Forward:</i> TGGCAAGGTGGCAGAAGTCA <i>Reverz:</i> TCCTTGGCAGATATACAGGG

1. táblázat: Az általunk tervezett primerek szekvenciái

#### 5.5 Morfológiai vizsgálatok és adatelemzés eozin festett vérkeneteken

A vérmintákból készült keneteket hővel fixáltuk 150 °C-on 15 percig (Pinheiro and Lockner, 1963). Az eozinos festésekhez a keneteket 1 percre 96%-os etanolba mártottuk, majd 5 percre eozin alkoholos oldatába (Sigma-Aldrich) merítettük. A víztelenítés felszálló alkoholsorban (70%, 90%, 95% és abszolút etanol) történt. A keneteket száradás után Mounting Medium (Sigma-Aldrich) felhasználásával lefedtük, és mikroszkóppal (Nikon Eclipse 80i, 40 x-es objektív és 100 x-os immerziós objektív) vizsgáltuk. A képeket QImaging RETIGA 4000R kamerán keresztül és Capture Pro 6.0 szoftverrel készítettük, és Image J 1.49v szoftverrel analizáltuk (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Az adatelemzés az MTA-SZBK Mikroszkópos Képfeldolgozó és Gépi Tanulási Csoport protokollja alapján történt. A képfeldolgozás MatLab

(<https://www.mathworks.com/products/matlab.html>) szoftverrel készült. Minden képet az előfeldolgozó lépés során minőségi ellenőrzésnek vetettünk alá az elemzés kezdeti szakaszában, mely a mikroszkópos képek megvilágítási korrekcióiból állt, amit a *CIDRE* (*correct illumination distributions with regularized energy minimization*) módszer (Smith et al., 2015) használatával végeztünk el. Ezek alapján a nem megfelelő minőségű képek kizárásra kerültek az elemzésből. A sejtek azonosítását és szegmentálását CellProfiler (Carpenter et al., 2006) automatikus *bioimage* elemző szoftverrel végeztük el (elérhető a <http://cellprofiler.org> címen), amely a sejtek morfológiai jellemzőinek kinyerésére szolgáló módszer. Egy intelligens elemző szoftverrel, az *Advanced Cell Classifier-rel* (Horvath et al., 2011), (ACC, <http://cellclassifier.org>) azonosítani és kvantifikálni tudtuk a képeken jelen lévő sejtformákat. Finomítva a köztük lévő döntési síkokon, gépi tanulási módszerekkel, mint például az aktív tanulás, minimális felhasználói beavatkozás mellett pontos adatokat kaphattunk a program segítségével a különböző sejtformák arányairól.

### 5.6 Eritrociták reológiai tulajdonságainak vizsgálata

Az eritrociták rugalmassági méréseit az MTA-SZBK Biofizikai Intézetében atomerő mikroszkópos vizsgálatokkal, Asylum Research MFP-3D atomerő mikroszkóppal végeztük el (Asylum Research, IgorPro 6.32A szoftver). A mintákat arannyal bevont konzolra helyeztük (Olympos), pozícionálásukhoz Zeiss Axiovert 200 optikai mikroszkópot használtunk. A kísérletek során 30 pN/nm névleges rugóállandót és 37 kHz rezonanciafrekvenciával ellátott V alakú hegyet alkalmaztunk.

A mérések előtt az egyes konzolok rugóállandóját kalibrálni kellett minden alkalommal (Hutter and Bechhoefer, 1993; Sader et al., 2012). A mérésekhez 20  $\mu\text{l}$  eritrocita populációt 500-szorosára hígítottunk fiziológiás sóoldatban (0,9% NaCl). A hígított oldatot Petri-csésze fedőfelületére cseppentettük. A mérés során minden esetben 15x15  $\mu\text{m}^2$  területet választottunk ki. Mindegyik pontnál erőhatás-görbét vettünk fel, melyeket 8  $\mu\text{m/s}$  sebességgel rögzítettünk, 0,5 nN maximális terhelés mellett és 2 kHz mintavételi frekvenciával.

Az elasztikus és plasztikus munkát az egyes erőhatás-görbék különbsége alapján számoltuk ki. Az elasztikus munka azt mutatja meg, hogy a sejt 0,5 nN erőhatásra történő benyomódásához mennyi energia szükséges, míg a plasztikus munka olyan energiát jelöl, amely a sejt eredeti állapotába való visszatéréséhez szükséges. Ezek

arányát az elasztikus index jelenti, amely értéke 1, ha tökéletesen rugalmas anyagról van szó, illetve 0, ha tökéletesen plasztikus anyagot vizsgálunk. A kiértékelést MatLab program (MathWorks) alkalmazásával végeztük (Starzyk et al., 1997; Boey et al., 1998).

### 5.7 Lipidomikai vizsgálatok eritrocitákon

A lipidomikai vizsgálatokat az MTA-SZBK Molekuláris Stresszbiológiai csoportjával együttműködve készítettük. Az eritrocita frakciót foszfát pufferes sóoldatban (1x PBS, pH 7,4) hemolizáltuk, majd 17.000 g-vel 10 percig 4 °C-on hideg 0,05 M-os foszfát pufferben (PB, pH 7,4) annyiszor mostuk, amíg a felülúszó teljesen áttetsző nem lett (Steck and Kant, 1974). Végeredményül eritrocita membránt kaptunk, melyen egyfázisú metanolos extrakciót végeztünk (Péter et al., 2017). A tömegspektrometriás (*mass spectrometry*, MS) lipid analíziseket egy Orbitrap Fusion Lumos eszközzel (Thermo Fisher Scientific) végeztük el, amely TriVersa NanoMate-tel (Advion BioSciences) volt felszerelve (Peksel et al., 2017). Az ionforrást a Chipsoft 8.3.1 szoftver vezérelte. Az ionizációs feszültség pozitív és negatív módban +1,3 kV és -1,9 kV volt, és az ellennyomást mindkét üzemmódban 1 psi-re állítottuk. Az ionátviteli kapilláris hőmérséklete 330 °C volt. Az akvizíciókat  $R_{m/z} 200 = 240000$  tömeg felbontással hajtottuk végre.

Lipid standardként Avanti Polar Lipideket (Alabaster) alkalmaztunk. Az extraháláshoz és az MS analízishez használt oldószerek a Merck és a Thermo Scientific, valamint a Sigma-Aldrich cégtől származtak.

### 5.8 Fluoreszcencia aktivált sejtválogatás és analízis (FACS) eritrocitákon

Az eritrocita populációt 1 órán át 4 °C-on 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk, melyet centrifugálási lépés követett (200 g, 4 °C, 5 perc) (Cortese-Krott et al., 2012). A mosási lépések után a sejteket permeabilizáltuk 0,05 M-os PB-ben hígított 0,1%-os végkoncentrációjú Triton-X-100 oldattal 30 percen át szobahőmérsékleten. Megakadályozandó a nem-specifikus kölcsönhatásokat a sejteket egy órán keresztül szobahőmérsékleten blokkoló oldatban inkubáltuk (A blokkoló oldat összetétele 4% BSA (Bovine Serum Albumin), 5% NGS (Normal Goat Serum) 0,05 M-os PB-ben feloldva). Az elsődleges ellenanyag hozzáadásával a mintákat egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. Az elsődleges ellenanyagokat a megfelelő koncentrációra hígítottuk 1% BSA

és 5% NGS 0,05 M-os PB-ben. A megfelelő másodlagos ellenanyag hozzáadása után 2 órás inkubáció következett szobahőmérsékleten. Az ellenanyagok eltávolítása utána csapadékot 200 µl 0,05 M-os PB-ben vettük fel FACS analízishez.

A FACS analízisek során minden esetben alkalmaztunk ún. vak mintát, mely az autofluoreszcencia szintjét hivatott reprezentálni. Az autofluoreszcencia kizárása után azokat a sejteket vettük figyelembe, melyek intenzitása nagyobb volt, mint  $10^1$ . A Szegedi Biológiai Kutatóközpontban végeztük a FACS analízist BD FACS Calibur™ (BD Biosciences) eszközzel. Az eredmények kiértékelését a FlowJo x 10.07r2 szoftver segítségével végeztük.

A FACS analízissel párhuzamosan fluoreszcens mikroszkópos felvételeket is készítettünk az SZTE-ÁOK I. számú Belgyógyászati Klinikán található Zeiss LSM880 típusú konfokális mikroszkóppal.

Az immuncitokémiai festésekhez a következő ellenanyagokat használtuk fel (2. táblázat).

<b>Elsődleges ellenanyagok</b>			
<b>Név</b>	<b>Típus</b>	<b>Gyártó</b>	<b>Hígítás</b>
anti-NOS3	egér poliklonális	Santa Cruz	1: 200
anti-NOS3	nyúl poliklonális	Santa Cruz	1: 100
anti-pSER <sup>1177</sup> NOS3	nyúl poliklonális	Sigma	1: 100
anti-HNE	egér monoklonális	abcam	1: 100
anti-Argináz 1	nyúl monoklonális	Biocare	1: 100
<b>Másodlagos ellenanyagok</b>			
<b>Név</b>	<b>Típus</b>	<b>Gyártó</b>	<b>Hígítás</b>
Alexa 647	egér poliklonális	abcam	1: 400
Alexa 488	nyúl poliklonális	abcam	1: 400

**2. táblázat: Felhasznált elsődleges és másodlagos ellenanyagok listája**



## 5.9 Spektrofotometriás mérések

A mérésekhez az eritrocita frakcióból desztillált vízzel 10x-es hemolizátumot készítettünk.

### 5.9.1 Fehérje koncentráció meghatározása

A fehérje koncentráció meghatározását Folin-Ciocalteu reagenssel, 750 nm-en végeztük (Lowry et al., 1951). 150  $\mu$ l hemolizált mintához 750  $\mu$ l „C” oldatot adtunk. A „C” oldat az „A” és „B” oldat 50:1 arányú elegye. Az „A” oldat 20 g/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,2 g/l K-Na-tartarát és 0,1 M NaOH összetételű, míg a „B” oldat 5 g/l koncentrációjú  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  oldat volt. 10 perc szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a reakcióelegyhez 75  $\mu$ l kétszeresére hígított Folin-Ciocalteu-reagenst adtunk. 30 perc elteltével spektrofotometráltunk. A koncentráció meghatározásához kalibrációs egyenes felvétele szükséges, melyet szarvasmarha-szérum albuminból készült hígítási sor alapján vettünk fel. A méréseket 750 nm-en GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Scientific) spektrofotométerrel végeztük.

### 5.9.2 Peroxinitrit (ONOO<sup>-</sup>) mérés

A méréseket 302 nm-en végeztük. A módszer alapja az, hogy a  $\text{ONOO}^-$  magas pH-n stabil, de semleges pH-n gyorsan bomlik. A hemolizátumokat elsőként 1 M NaOH-ban mértük le (2  $\mu$ l hemolizátum és 500  $\mu$ l 1 M NaOH). Az abszorbancia növekedését addig mértük, amíg a stabil egyensúlyt el nem érték. A hemolizátumokat ezután 100 mM PB-hez (pH 7,4) adtuk a fent említett arányban és mértük az abszorbanciát (Huie and Padmaja, 1993).

Az  $\text{ONOO}^-$  koncentrációját a Lambert-Beer törvény ( $\epsilon_{\text{ONOO}^-} = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) alkalmazásával, a két különböző pH-értéken mért abszorbancia különbsége alapján számítottuk ki. A végső eredményeket a fehérje koncentrációhoz viszonyítva adtuk meg.

## 5.10 *Ex vivo* kezelések

### 5.10.1 Nehézfém kezelés

A kezelés során az eritrocita mintákat nehézfém terhelésnek vetettük alá. A kezelést kadmium-acetát oldat formájában végeztük. Az oldatok koncentrációját a  $\text{Cd}^{2+}$ -ra vonatkoztatva adjuk meg. Az általunk használt két koncentráció a 0,5 ng/μl és 20 ng/μl volt. Az inkubálást 30 percig 37°C-on végeztük. A kezelés végeztével a morfológiai vizsgálatokhoz vérkeneteket készítettünk. A  $\text{Cd}^{2+}$  koncentráció kiválasztásához végzett előkísérletekhez Witeska és munkatársai publikációját vettük alapul (Witeska et al., 2011).

### 5.10.2 Candida parapsilosis fertőzés

A teljes vért *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) törzsszel fertőztük meg  $10^7$  gombasejt/1 ml vér végkoncentrációban (Csonka et al., 2017). A kezelés 20 órán át tartott 37 °C-os,  $\text{CO}_2$  inkubátorban (5%). Kontrollként hasonló körülmények között inkubált fertőzetlen mintát használtunk. A gombanövekedés kontrolljaként a fertőzendő vérmennyiség térfogatával megegyező szérummal (fetal bovine serum, FBS) kiegészített RPMI 1640 (pH 7,2±0,2) tápoldatot fertőztünk ugyancsak  $10^7$  gombasejt/1 ml végkoncentrációban.

Az ölési hatékonyság (mely azt fejezi ki, hogyan befolyásolja a vér a *Candida parapsilosis* szaporodási képességét) kiszámolására a következő formulát használtuk;

$$\text{ölési hatékonyság (\%)} = \frac{\text{CFURPMI} - \text{CFU}_{\text{minta}}}{\text{CFU RPMI}} \times 100,$$

ahol  $\text{CFU}_{\text{RPMI}}$  a gazdag táptalajon növesztett gombák növekedési rátája, míg a  $\text{CFU}_{\text{minta}}$  a teljes vérben mutatja a gomba növekedési képességét. A CFU meghatározása a következőképpen zajlott: az inkubációs idő leteltével az előző napon fertőzött mintákból 100x hígítást készítettünk, majd ezekből 10-10 μl-t gazdag táptalajra szélesztünk, 3-3 párhuzamosban. A csészéket 37°C-on inkubáltuk 20 órán át, majd meghatározzuk a telepszámot és ölési hatékonyságot számoltunk a kontroll csészén felnőtt telepek számát összevetve a fertőzött vérmintákból származó telepek számával (Csonka et al., 2017).

### 5.11 Statisztikai analízis

A molekuláris biológiai, valamint az immuncitokémiai vizsgálatok során nyert adatokat egyfaktoros varianciaanalízissel (ANOVA) és Newman-Keuls teszttel analizáltuk GraphPad Prism 6.0 (1999-2012 GraphPad Software Inc.) szoftver használatával. A kapott eredményeket diagramokon ábrázoltuk, az értékeket átlag $\pm$ SD formában tüntettük fel. A szignifikancia szintjét minden esetben  $*p < 0,05$  valószínűségi értékben határoztuk meg.

Az atomerő mikroszkópos mérések eredményeinek kiértékelését Kruskal-Wallis rangsorolással végeztük. Az eredmények közti különbséget szignifikánsnak tekintettük, ha a  $p < 0,05$ .

A MS analízist követően a lipid fajtákat a LipidXplorer szoftverrel azonosítottuk (Herzog et al., 2011). Az eredményeket a membrán lipidek mól%-ában fejezzük ki, és az átlagok $\pm$ SD értéket ábrázoltunk. A szignifikanciát a Student-féle t-eloszlás határozta meg. Az OPLS-DA-t MetaboAnalysis alkalmazásával (Xia and Wishart, 2016) végeztük el a minták kiértékelését.

## 6. Eredmények

### 6.1 *Mintagyűjtés*

A mintagyűjtés a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Regionális Humán Orvosbiológiai Kutatásetikai Bizottság engedélyével (149/2012 és 16/2014), az édesanyák írásos jóváhagyásával történt 2014 januárja és 2018 júniusa között. Az anyák vénás, és az újszülöttjeik köldökzsinór artériájából származó vérminták egyidőben kerültek levételre és feldolgozásra.

Az Anyagok és módszerek első fejezetében tárgyaltaknak megfelelően olyan terhesség esetén gyűjtöttünk mintát, ahol nem merült fel a magzatot vagy az édesanyát érintő komplikáció a terhesség alatt, mint például intrauterin magzati distressz, preeklampszia, gesztációs diabétesz mellitus, HELPP szindróma (eritrociták szétesése, emelkedett májenzimek és alacsony vérlemezke szám jellemző). Ezek a kritériumok mind a kontroll, mind a dohányos csoport esetén fennálltak. Munkánk során csak olyan mintákat dolgoztunk fel, ahol a terhesség a 37. vagy azutáni héten fejeződött be. A dohányos csoporton végzett kísérleteinkbe a fent említett kritériumokon kívül csak azokat az édesanyáktól és újszülöttjeiktől származó mintákat vontuk be, akik bevallottan legalább 10 szál cigaretta/nap terhelésnek voltak kitéve az egész terhesség során.

Az etikai engedély értelmében a kórlapokhoz hozzáférhettünk, így információt kaphattunk az édesanya és az újszülött adatairól (mint például az anya életkora, a terhesség alatti súlygyarapodása, a szülés időtartama, az újszülött 1 és 5 perces APGAR értéke, a gesztációs hét, az újszülött születési súlya és a hematokrit értékei). Az APGAR értéket a következő szempont rendszer vizsgálatával határozzák meg: szívfrekvencia, légzés, izomtónus, reflexingerlékenység, bőrszín.

A 3. táblázat foglalja össze a főbb paraméterekből készült statisztikák eredményeit.

	<b>Kontroll csoport</b>	<b>Dohányos csoport</b>
<b>Mintasám (db)</b>	98	90
<b>anyai életkor (év)</b>	32,09±5,2	27,7±6,3
<b>újszülött születési súly (g)</b>	3490,4±476,2	2912,7±614,68(****)
<b>gesztációs hét</b>	39,5±1,121	38,4±2,70
<b>mellkas körfogat (cm)</b>	33,1± 1,84	30,94±2,79(****)
<b>fej körfogat (cm)</b>	34,49±1,44	32,50±2,19(****)
<b>APGAR (1 min)</b>	9,37±0,73	8,89±1,11(*)
<b>APGAR (5 min)</b>	9,97±0,03	9,86±0,14
<b>újszülött hematokrit érték (%)</b>	44,15±8,07	43,61±8,73
<b>Cigaretta fogyasztás (szál/nap)</b>	0	10-20

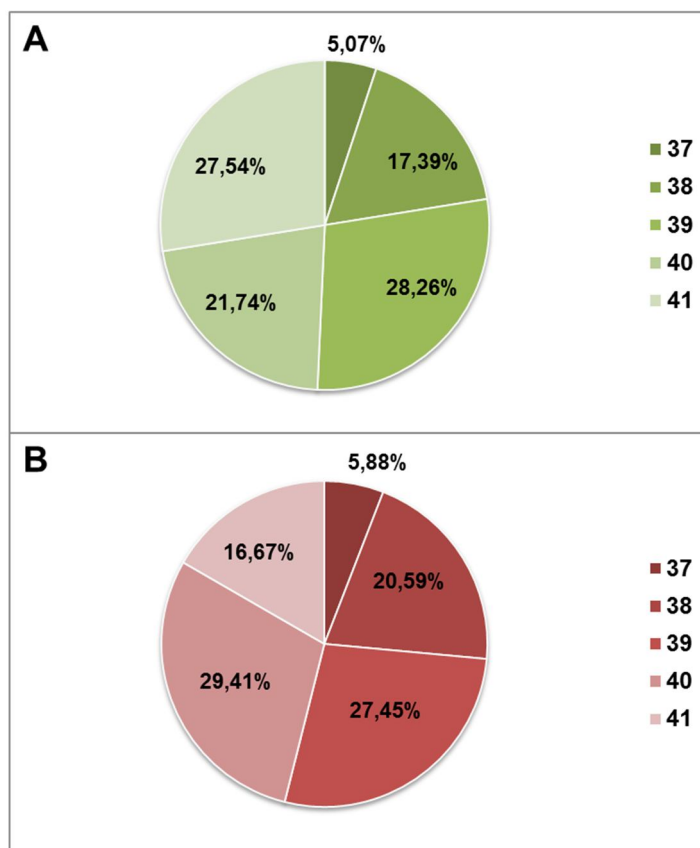
**3. táblázat: A kontroll és a dohányos mintacsoportok paramétereinek összehasonlítása**

Az adatok az átlag értékeknek felelnek meg, illetve  $\pm$  SD értékeket is feltüntettünk. A szignifikancia szintjét \*p < 0,05 és \*\*\*\*p < 0,0001 valószínűségi értékben határoztuk meg.

A szülés módja alapján két csoport határozható meg; a császármetszéssel, illetve a hüvelyi szüléssel született újszülöttek. A kontroll és a dohányos mintákban közel azonos arányban oszlik meg a két szülési mód. Előkísérleteink során nem találtunk szignifikáns különbséget, ha a szülés módja alapján csoportosítottuk az eredményeinket, így a továbbiakban ezt a paramétert nem vettük figyelembe.

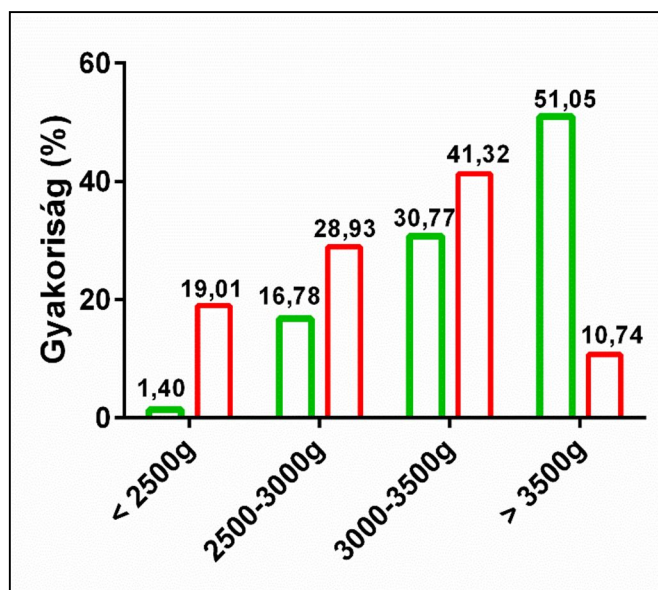
A gesztációs hetek megoszlását figyelembe véve, illetve születési súlyok gyakoriságáról részletes statisztikai elemzést készítettünk. A gesztációs hetekről készült statisztika a 9. ábrán, míg a születési súlyok gyakoriságára vonatkozó adatok a 10. ábrán láthatóak.

Az újszülöttek több mint 70%-a mindkét csoport esetében a 39. gesztációs héten vagy azt követően született. A további két gesztációs időhöz tartozó gyakorisági értékek között sem jelentkezett szignifikáns eltérés (9. ábra).



**9. ábra: Kontroll és dohányos anyaktól született újszülöttek születési hetének eloszlása**  
**A:** kontroll édesanyák **B:** dohányzó édesanyák újszülöttjeinek születési hetének gyakoriságát mutatja

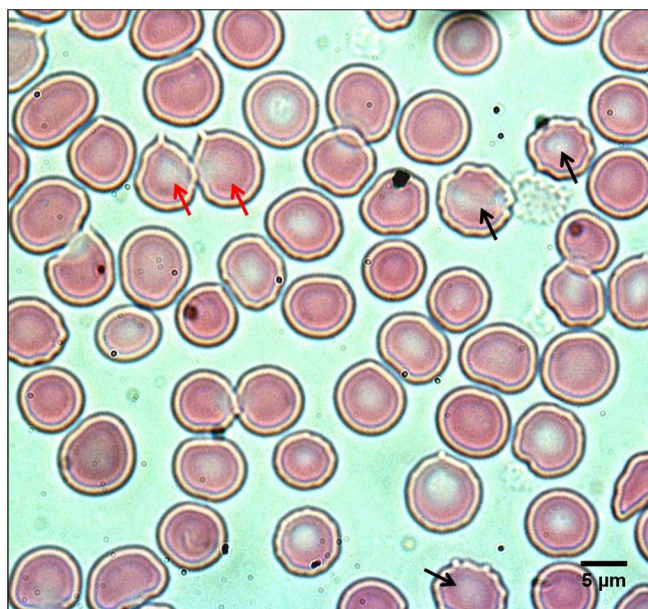
Elmondható, hogy a terhesség alatt nem dohányzó édesanyáktól született újszülöttek (10. ábra, zöld színnel ábrázolva) több mint a fele (51%) 3500 g-nál nagyobb súllyal jött a világra. Ezzel szemben, a terhesség alatt folyamatosan dohányzó édesanyáktól született újszülöttek (10. ábra, piros oszlop) 10,74%-a tartozott a 3500 g feletti súlycsoportba. Az is elmondható, hogy a nem dohányzó édesanyák újszülöttjeinek csupán csak a 1,4%-a született 2500 g alatti súllyal, míg a dohányzó édesanyák esetében ez a szám 19% volt az általunk gyűjtött minták esetében.



10 ábra: Születési súlyok alakulása nem dohányzó (zöld) és dohányzó (piros) édesanyáktól született újszülöttek esetében

## 6.2 Eritrociták morfológiai változásainak vizsgálata vérkeneten

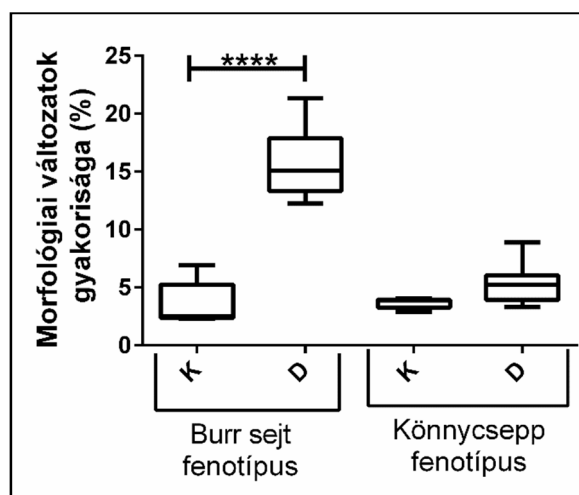
Az eritrociták morfológiáját vérkeneteken vizsgáltuk eozin-festést követően. A 11. ábrán egy reprezentatív fénymikroszkópos felvételt mutatunk be, melyen jelöltük a két leggyakoribb morfológiai formát, a Burr sejt, illetve a könnyecsepp fenotípust.



11. ábra: Reprezentatív fénymikroszkópos felvétel eozin festett vérkenetről  
Fekete nyilak a Burr sejteket, míg a piros nyilak a könnyecsepp fenotípust jelölik.

A Burr sejt, illetve a könnyecsepp fenotípus jól elkülöníthető a biconkáv formától, így lehetőség volt arra, hogy aktív tanulás során, az Advanced CellProfiler®

program felismerje és számszerűsítse ezen alakok gyakoriságát. Az eredményeket a 12. ábrán mutatjuk be.



**12. ábra: Eritrociták morfológiai változatainak gyakorisága nem dohányzó és dohányzó édesanyáktól született újszülöttek esetében**

A sejtszámolást Advanced CellProfiler® programmal végeztük teljes vérből készült keneteken. Az ábrán a Burr sejt és a könnycsepp fenotípus gyakoriságát mutatjuk be. K mintából n=7956 sejt/20 mintát, míg D mintákból n=15745 sejt/15 mintát vizsgáltunk meg. A szignifikancia szintjét \*\*\*\*p <0,0001 valószínűségi értékben határoztuk meg.

A Burr sejt gyakoriságának vizsgálata során a K és D csoportok összehasonlítását követően elmondható, hogy a Burr sejtek gyakorisága a dohányos mintacsoportban (15%) szignifikánsan, mintegy ötszörösére emelkedett a kontroll eritrocita populációhoz (3%) viszonyítva (12. ábra). Ez a jelentős növekedés azt sugallja, hogy a terhesség alatti dohányzás során bekerülő káros anyagok hatással vannak a fejlődő magzat eritrocitáinak membránszerkezetére. A könnycsepp alakú fenotípus gyakoriságának összehasonlítása során nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget (12. ábra).

Az eozin festett vérkenetek mikroszkópos vizsgálata során számos más fenotípust is azonosítottunk. Azonban az apróbb méretbeli különbségek és kisebb deformációk nagyon nehezen számszerűsíthetők az általunk használt programmal, mivel az eltérések kicsik és az előfordulási gyakoriságuk alacsony, így a „tanító példák” száma - mely alapján a program analizál - kevés.

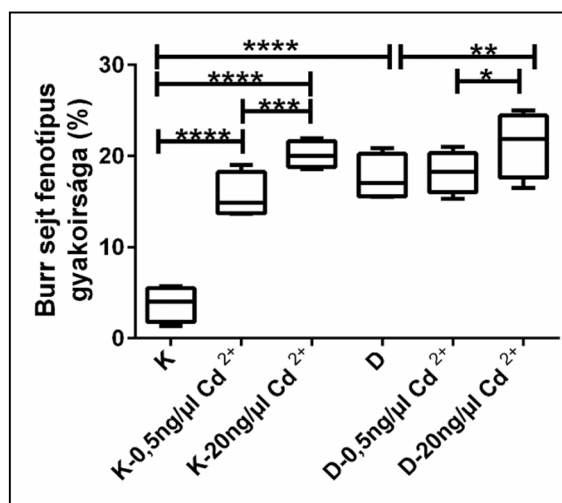


### 6.2.1 Kadmium kezelés

Terhesség alatti dohányzás során az anya szervezetébe kerülő káros anyagok, mint pl. a nehézfémek (pl.  $\text{Cd}^{2+}$ ), átjuthatnak a méhlepényen a magzat szervezetébe is. Így egy *ex vivo* kísérletben  $\text{Cd}^{2+}$  kezelést követően vizsgáltuk a morfológiai változások gyakoriságát.

A kísérleteink során a K és D csoportokból származó vérmintákat nehézfém terhelésnek vetettük alá. A teljes vér-kezelésekhez kadmium-acetátot ( $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ) alkalmaztunk. A Burr sejtek megjelenésének gyakoriságát a 13. ábrán mutatjuk be. A K csoportba tartozó sejtek már a  $0,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$   $\text{Cd}^{2+}$  koncentrációra is rendkívül érzékenyen reagáltak; a kezeletlen mintához viszonyítva a Burr sejtek gyakorisága közel ötszörös növekedést mutatott. A fenotípus megjelenése koncentráció-függést mutatott; a  $20 \text{ ng}/\mu\text{l}$ -es kezelés hatására tovább emelkedett a Burr sejtek száma. A D mintacsoportban eleve magas volt a Burr sejtek aránya és csak a magasabb  $\text{Cd}^{2+}$  koncentráció hatására történt szignifikáns emelkedés, a növekedés mértéke csupán 25%-os volt (13. ábra).

Ezekből a kísérletekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a dohányos anyák újszülöttjeinek eritrocitaiban - valószínűleg a terhesség alatti folyamatos expozíció miatt - egyfajta rezisztencia alakulhatott ki a nehézfémekkel, konkrétan a  $\text{Cd}^{2+}$  terheléssel szemben.



**13. ábra: Kadmium kezelést követően megjelenő Burr sejt gyakoriság**

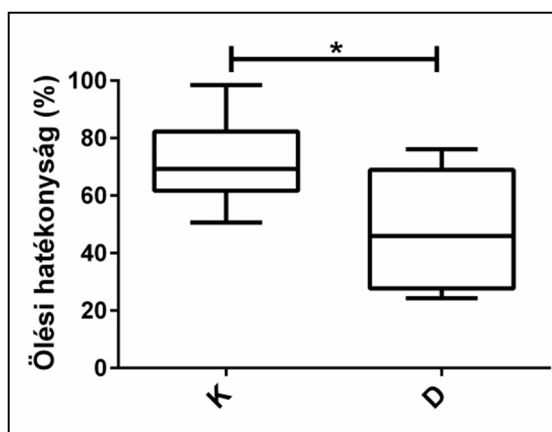
Az ábrán a K és D minták kezeletlen, valamint a  $0,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$  és  $20 \text{ ng}/\mu\text{l}$   $\text{Cd}^{2+}$  kezelésük eredményei láthatóak. A szignifikancia meghatározására egyutas ANOVA, Neuman-Keuls *post-hoc* tesztet alkalmaztunk. A szignifikancia szintjét \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  és \*\*\*\* $p < 0,0001$  valószínűségi értékekben határoztuk meg. A gyakoriság számolásánál a kísérletbe bevont sejt és mintaszám a következőképpen alakult: K  $n=8500$  sejt/10 minta, K- $0,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$   $4589$  sejt/10 minta, K- $20 \text{ ng}/\mu\text{l}$   $4958$  sejt/10 minta, D minta esetén  $n=8300$  sejt/8 minta, D- $0,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$   $3489$  sejt/8 minta, D- $20 \text{ ng}/\mu\text{l}$   $5487$  sejt/10 minta.

A könnyecsepp fenotípus gyakoriságában nem tapasztaltunk szignifikáns változást nehézfém terhelés hatására sem a K, sem a D csoport esetében.

### 6.2.2 *Candida parapsilosis* fertőzés

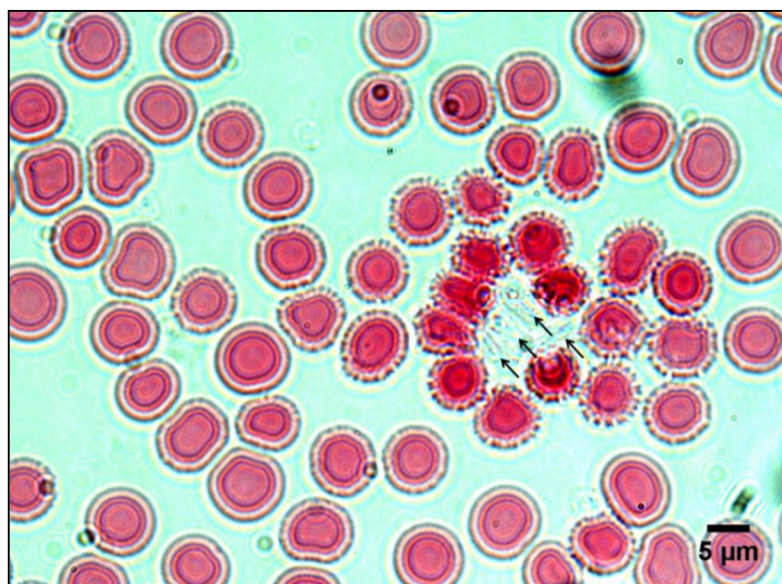
A *Candida parapsilosis* egy humán patogén gomba, mely leggyakrabban a kézről és a gasztrointesztinális traktusból izolálható (Neu et al., 2009), illetve könnyen terjed horizontálisan, ami növeli a nozokomiális fertőzések kockázatát (Pfaller and Diekema, 2007). A véráramot érintő szisztémás megbetegedések kiváltó kórokozói között a *Candida* fajok előfordulása a negyedik leggyakoribb (Wisplinghoff et al., 2004). Ha a *Candida* törzsek gyakoriságát hasonlítjuk össze, akkor a harmadik leggyakoribb fertőzést kiváltó kórokozó a *Candida parapsilosis* (Pfaller et al., 2010). Egy 2014-ben megjelent tanulmány szerint az intenzív ápolásra szoruló újszülöttek körében a szisztémás gombafertőzések egyharmadát *C. parapsilosis* okozta (Pammi et al., 2014).

Az újszülöttekről rendelkezésre álló adatok alapján feltételeztük, hogy a *C. parapsilosis*-sal, mint stresszorral nem „találkoztak” korábban a fejlődő magzatok. A vérminták *C. parapsilosis*-sal való fertőzésével teszteltük, hogy a dohányos mintákban tapasztalt  $\text{Cd}^{2+}$ -mal szembeni tolerancia más szabadgyök indukáló ágensekre, mint pl. egy gombafertőzés, is jellemző-e. Kísérleteink során teljes vért fertőztünk *C. parapsilosis* törzsszel, és első körben a gombák vérben való szaporodását vizsgáltuk. A K minták ölési hatékonysága átlagosan 68% körüli, míg a D mintáké 45% körüli (14. ábra).



**14. ábra:** Teljes vér *Candida parapsilosis*-ra gyakorolt hatása K és D csoportok esetén  
A grafikonok GraphPad szoftverrel, Neuman-Keuls teszttel készültek. A szignifikancia szintjét \* $p < 0,05$ , valószínűségi értékben határoztuk meg. Kísérletbe bevont minták száma K  $n=32$ , D  $n=25$  volt.

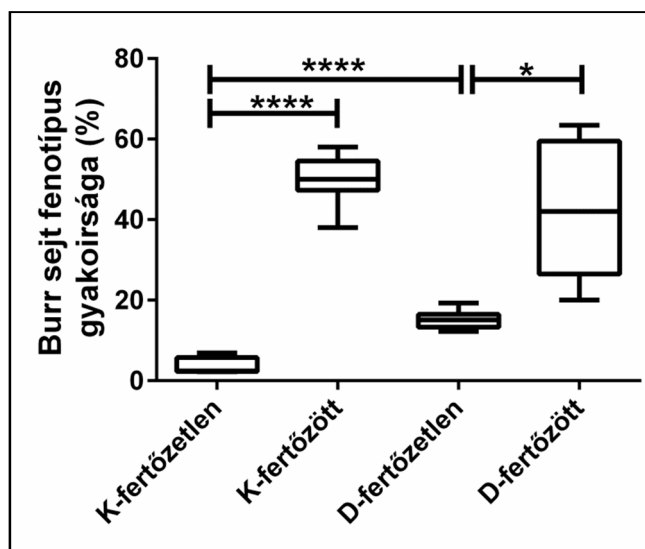
A morfológiai változások követése a  $\text{Cd}^{2+}$  terheléshez hasonlóan, eozin festett keneteken történt, fertőzetlen és fertőzött mintákon. A mikroszkópos vizsgálatok során nagyfokú növekedést figyeltünk meg fertőzés hatására a Burr sejtek gyakoriságában. Ez az állítás egyaránt igaz a dohányzó és nem dohányzó édesanyáktól származó újszülött csoportokra is. Ezen felül, azon eritrociták, melyek környezetében gomba található, egy kisebb, denzebb fenotípust mutatnak, melyre egy reprezentatív mikroszkópos felvételt mutatunk be a 15. ábrán.



**15. ábra: *C. parapsilosis* fertőzés hatása az eritrociták morfológiájára**

Az ábrán egy eozin festett vérkenet látható, melyen a gomba eritrocitákra gyakorolt hatását mutatjuk. Fekete nyilak jelölik a *C. parapsilosis* gombát.

Az eozin festett képeken elvégeztük a fenotípus variánsok számolását az Advanced CellProfiler® program alkalmazásával. A könnyecsepp alakú sejtek száma *C. parapsilosis* fertőzés hatására nem emelkedett szignifikánsan, a Burr sejtek gyakoriságának változását a 16. ábra szemlélteti.



**16. ábra: Burr sejt fenotípus gyakorisága *C. parapsilosis* fertőzés hatására**

A grafikonok GraphPad szoftverrel, Neuman-Keuls teszttel készültek. A szignifikancia szintjét \* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  valószínűségi értékben határoztuk meg. Kísérletbe bevont sejtszám K- fertőzetlen  $n=5962$  sejt/10 minta, K-fertőzött  $n=7212$  sejt/10 minta, D-fertőzetlen  $n=6832$  sejt/8 minta, D-fertőzött  $n=9099$  sejt/8 minta volt.

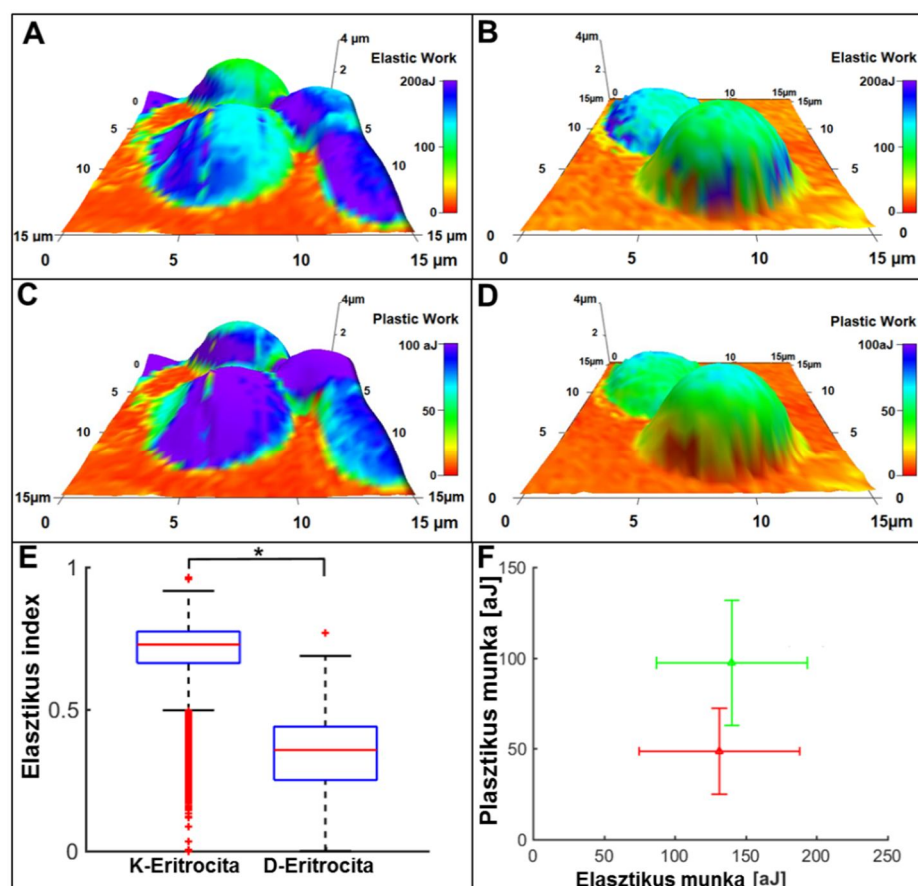
Elmondhatjuk, hogy mind a K, mind a D csoport esetén a gombafertőzés hatására jelentős növekedést tapasztalunk a Burr sejt fenotípusban. A K populációban a növekedés csaknem 10-szeres, míg D minták esetén ez a növekedés 2,5-szeres a kezeletlen mintákhoz viszonyítva (16. ábra).

### 6.3 Eritrociták reológiai tulajdonságainak vizsgálata

Az elaszticitás fontos jellemzője olyan sejteknek, melyek folyamatosan mechanikai stimulushoz vannak kitéve, mint például az eritrociták, melyek képesek átjutni a legkisebb átmérőjű kapillárisokon is a deformálódási képességüknek köszönhetően. Az elaszticitás, vagy rugalmasság, melyet a Young-modulus jellemez, a sejtmembránra egy adott erővel alkalmazott behatás által kiváltott deformáció mértékéből adódik (Végh et al., 2011). A plaszticitás az erre az erőre adott válaszreakciót fejezi ki, azaz, hogy mennyire képes az erőhatás után visszanyerni eredeti alakját a sejt.

Ebben a fejezetben az atomerő mikroszkópos kísérleteink eredményét foglalom össze. A vizsgálatokat izolált eritrocitákon végeztük, jelölésük K- és D-Eritrocita.

Mind a két csoportban 100-100 sejten végeztük el a méréseket. Az eredményt a 17. ábra szemlélteti.



**17. ábra Deformabilitás vizsgálat atomerő mikroszkóppal K-Eritrocita és D-Eritrocita vérmintákon**  
 Az A-D ábrákon egy-egy reprezentatív atomerő mikroszkópos felvétel látható. A felső sor az elasztikus munkát szemlélteti a K-Eritrocita (A) és D-Eritrocita (B) csoportok esetén. A második sorban a plasztikus munka alakulása látható a K-Eritrocita (C) és D-Eritrocita (D) populációban. A reprezentatív ábrákon a színskála munka értékeket határoz meg Attojoule-ban (aJ). Az E ábrán az elasztikus indexet mutatjuk az összes általunk vizsgált mintán (100-100 sejt), ami a plasztikus és az elasztikus munka hányadosaként írható le. Az F ábrán az összes sejt adata látható plasztikus és elasztikus munkát tekintve. A K-Eritrocita csoportot zöld, a D-Eritrocita csoportot pedig piros színnel ábrázoltuk. A szignifikancia szintjét \* $p < 0,05$  valószínűségi értékben határoztuk meg.

A 17. ábra alapján, úgy a reprezentatív, mint az összesített adatokat értékelve, egyértelműen arra a következtetésre juthatunk, hogy a két csoport elasztikus munkavégzése közel azonos. A 17. ábra E panelje alapján elmondható, hogy az elasztikus index a D-Eritrocita populációban szignifikánsan alacsonyabb, mely abból adódik, hogy a plasztikus munka szignifikánsan kisebb, mint K-Eritrocita csoport esetében. Eredményeink azt sugallják, hogy a csökkent plasztikus munka miatt később nyerik vissza a D-Eritrociták a bikonkáv alakjukat, ami a leghatékonyabb funkcionalitást hordozza, így a magzat oxigén ellátottsága valószínűleg nem megfelelő.

Vizsgálatainkat párhuzamosan az édesanyáktól származó vérmintákon is elvégeztük. Az eredmény a Függelék 1. ábráján tekinthető meg. Elmondható, hogy a

dohányzás közvetlen hatása a felnőtt eritrociták elaszticitására és plaszticitására hasonló változást eredményezett, mint amit a közvetett hatás következményeként mértünk a köldökzsinór vérminták esetében.

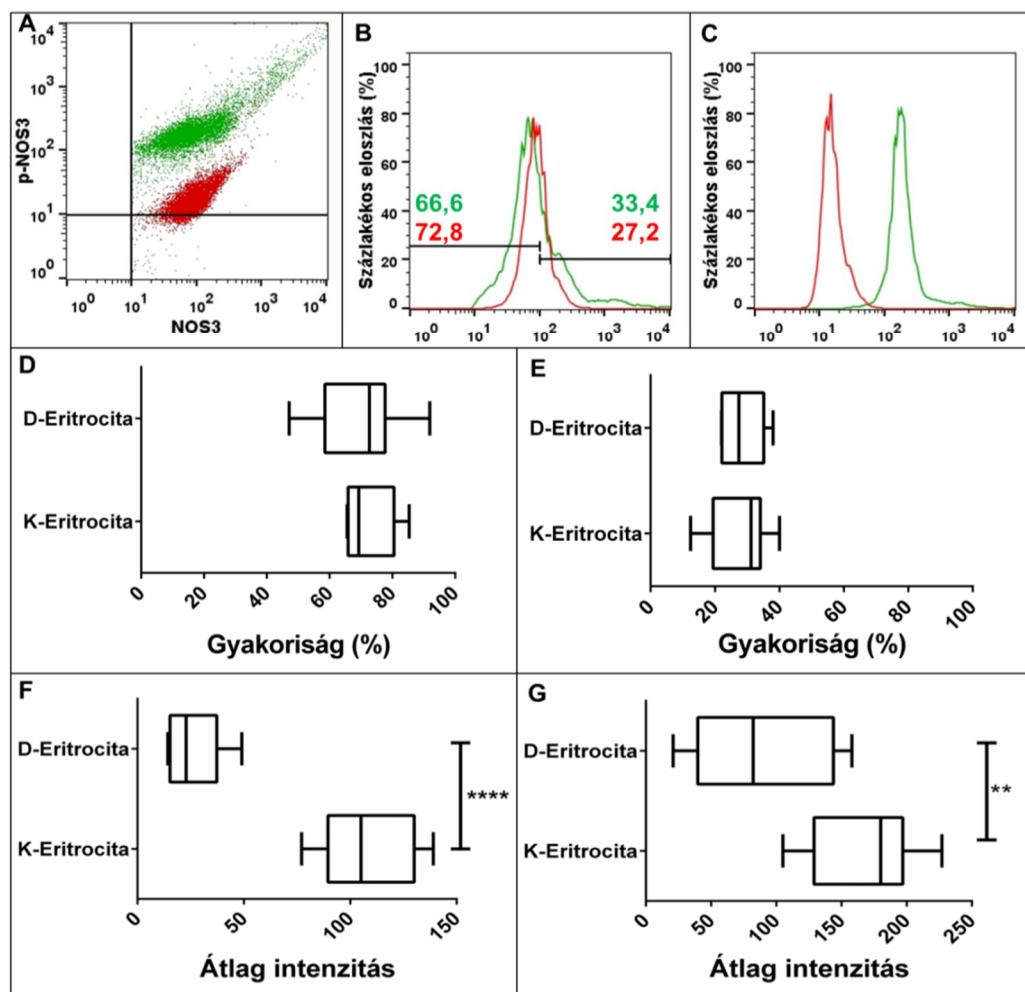
#### **6.4 NOS3 funkcióját befolyásoló tényezők vizsgálata eritrocita membránokon**

##### **6.4.1 NOS3 poszttranszlációs módosítása**

A NOS3 fehérje mennyiségét és foszforilációját a Ser<sup>1177</sup> pozícióban, immuncitokémiai eljárást követően FACS analízissel vizsgáltuk. Anti-NOS3 és anti-p-NOS3 elsődleges ellenanyagokat használva kettős festést végeztünk. A FACS kiértékelések során önkényesen a 10<sup>2</sup> intenzitás értékben határoztuk meg az alacsony és a magas NOS3 expresszió határát. Eredményeinket a 18. ábra foglalja össze.

A NOS3 fehérje mennyiségében, ezen belül is az alacsony és magas NOS3 expresszió mértékében, nem tapasztalható szignifikáns különbség a kontroll és a dohányos csoporton belül (18. ábra A-B panel). Ugyancsak hasonló volt az alacsony és magas NOS3-at expresszáló sejtek megoszlása is a két mintacsoportban (18. ábra D-E panel).

A NOS3 expresszióval szemben, a fehérje foszforilációjának mértéke a Ser<sup>1177</sup> pozícióban jelentősen elmaradt a dohányzás következményeként (18. ábra C panel). Az alapszintű NOS3-at expresszáló sejtek esetében ez körülbelül egy 80%-os (18. ábra F panel), míg a magas NOS3-at expresszáló sejteknél 60%-os csökkenést jelent (18. ábra G panel).



**18. ábra: K- és D-Eritrocita immuncitokémiai jelölésének elemzése flow citometriás (FACS) módszerrel**

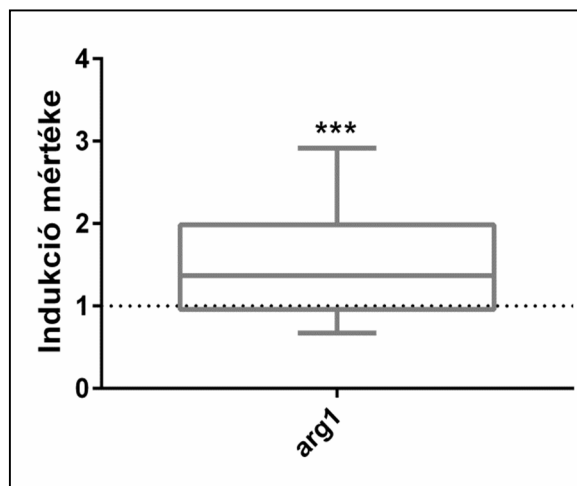
A piros szín jelöli a D-Eritrocita, a zöld a K-Eritrocita mintákat az A-C panelen. **A:** egy reprezentatív dot plot, mely az immuncitokémiai festések eredményét mutatja, anti-NOS3 és anti-p-NOS3 ellenanyagokra. **B:** reprezentatív hisztogram a NOS3 expresszió alakulásáról. **C:** reprezentatív hisztogram a p-NOS3 szintjének alakulásáról. A **D** panelen az alap, míg az **E** panelen a magas NOS3 expressziót mutató eritrocita populációk gyakoriságát mutatjuk be. Az alap NOS3 expresszáló sejteken belül a foszforiláció mértékét a **F** panel, míg a magas NOS3 expresszáló sejteken belüli foszforiláció mértékét a **G** panel mutatja. Az ábrák GraphPad szoftverrel, a statisztikák egyutas ANOVA Neuman-Keuls *post-hoc* teszttel készültek. A szignifikancia szintjét \* $p < 0,01$ , illetve \*\*\*\* $p < 0,0001$  valószínűségi értékben határoztuk meg. A FACS analízissel vizsgált minták száma D-Eritrociták esetén  $n = 60$ , K-Eritrociták esetében  $n = 50$  volt.

Vizsgálatainkat az édesanyáktól származó vérmintákon is elvégeztük. Az eredmény a Függelék 2. ábráján tekinthető meg. Azt tapasztaltuk, hogy a felnőtt eritrocitákban a NOS3 fehérje mennyisége és az eritrociták eloszlása az alap és magas NOS3 alcsoportok között hasonló eredményt mutat, mint amit a köldökszínór vér esetében bemutattunk. Hasonlóan, a foszforiláció mértéke is jelentősen elmarad dohányzó édesanyák esetében a nemdohányzókéétól.

#### 6.4.2 *Argináz-1 mRNS és fehérje vizsgálata*

A NOS3 aktiváció egyik szabályozó fehérjéje az ARG1, mivel közös a szubsztrátjuk, így kompetícióban állnak egymással (Yang et al., 2013).

Első megközelítésben az *arg1* mRNS mennyiségét vizsgáltuk a két eritrocita csoportban. A qPCR eredmények összesítése a 19. ábrán látható.



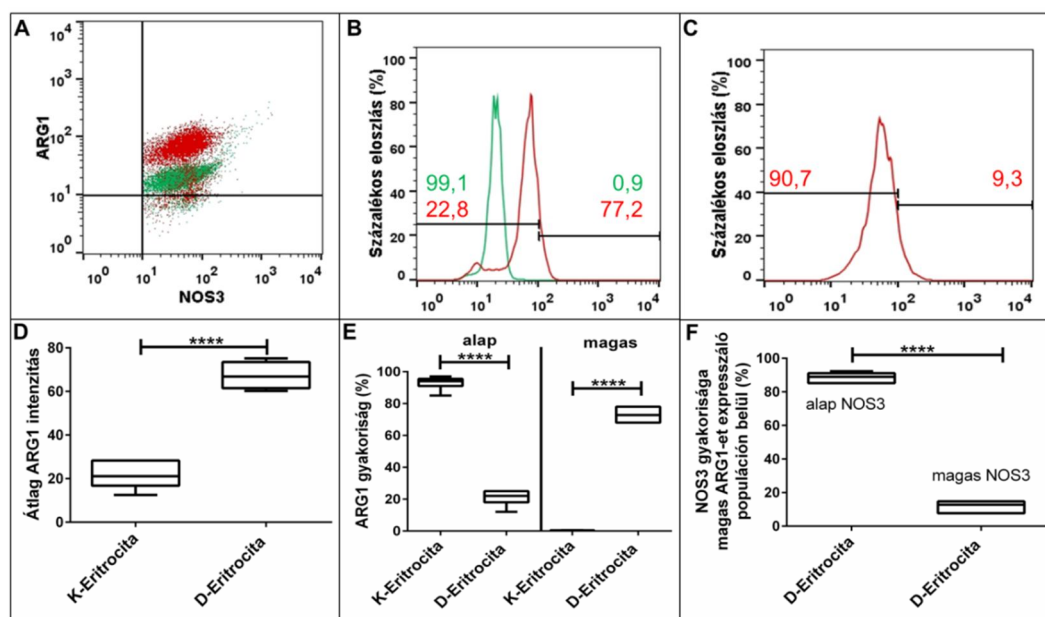
**19. ábra: *arg1* gén kifejeződése a D-Eritrocita csoportban**

A vizsgálatot kvantitatív PCR módszerrel végeztük. A vizsgálat során belső kontrollként a 18S RNS-t használtunk, melyre normalizáltuk a kapott értékeket. A grafikonon a K-Eritrocita csoport *arg1* mRNS szintjét a 1-nél lévő pontozott vonallal jeleztük. A szignifikancia szintjét \*\*\* $p < 0,001$  valószínűségi értékben határoztuk meg. A vizsgálatba bevont mintaszám K-Eritrociták esetében  $n=20$ , míg D-Eritrociták esetében  $n=15$  volt.

A 19. ábra alapján elmondhatjuk, hogy az anyai dohányzás indukálta az *arg1* expressziót, ~20%-kal magasabb mRNS szintet detektáltunk a D-Eritrocita populációban.

Az ARG1 fehérje mennyiséget immuncitokémiai eljárás után FACS analízissel határoztuk meg. A D-Eritrocitákban jelentősen magasabb az ARG1 fehérje mennyisége a K-Eritrocita csoporthoz viszonyítva (20. ábra A-B, D panel). A K-Eritrociták esetében a sejtek közel 100%-a alapszintű ARG1 szintet, míg a D-Eritrocita sejtek  $\frac{1}{4}$ -e alap,  $\frac{3}{4}$ -e pedig magas ARG1 szintet mutat (az alap és a magas ARG1-et expresszáló populáció között a határt önkényesen  $10^2$  értékben határoztuk meg) (20. ábra B, E panel).





**20. ábra: ARG1 kifejeződésének vizsgálata K- és D- Eritrocita mintákban**

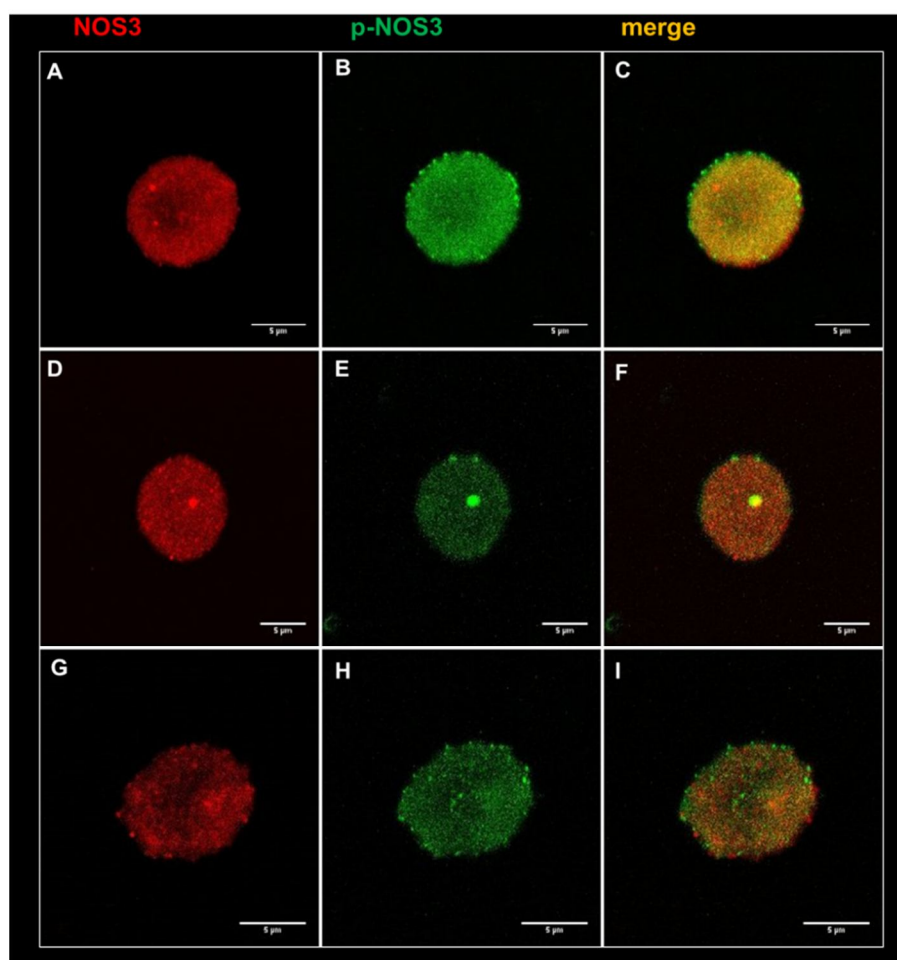
Az ábrákon zölddel a K-Eritrocita, a pirossal pedig a D-Eritrocita mintákat jelöltük. **A:** reprezentatív *dot plot*, melyen a NOS3/ARG1 immuncitokémiai jelölés látható FACS analízis során. **B:** az ARG1 pozitív sejtek hisztogramját szemlélteti a K- és D-Eritrocita csoportban. **C:** a NOS3 kifejeződését mutatja a magas ARG1-et expresszáló eritrocita populáción belül a D-Eritrocita csoportban. A **D-F** paneleken az általunk vizsgálatba bevont minták összefoglaló ábráját mutatjuk be. A **D** panelen az ARG1-re vonatkozó intenzitás, az **E** panelen az ARG1 gyakorisága látható az alap és a magas intenzitás tartományon belül, míg az **F** panelen a magas ARG1-et expresszáló eritrocita populáció NOS3 eloszlása látható. A szignifikancia mértékét \*\*\*\* $p < 0,0001$ -ben határoztuk meg. Az ábrák GraphPad szoftverrel, a statisztikák egyutas ANOVA Neuman-Keuls *post-hoc* teszttel készültek. A kísérletbe bevont mintaszám K-Eritrocita  $n=10$ , D-Eritrocita  $n=15$  volt.

A 20. ábra C és F paneljén azon sejtek NOS3 szintjét mutatjuk be, melyek magas ARG1 expressziót mutatnak a D-Eritrocita csoportban; a magas ARG1-et expresszáló sejtek ~90%-a alap szintű, míg ~10%-a magas szintű NOS3 expressziót mutat.

A korábbiakhoz hasonlóan ARG1 esetében is elvégeztük vizsgálatainkat KA-és DA-Eritrocita csoportokon is. Az eredményeket a Függelék 3. ábráján mutatjuk be. Az anyai dohányos minták esetében lényegesen alacsonyabb növekedés mutatható ki az ARG1 fehérje mennyiségi növekedésében a D-Eritrocita mintákban tapasztaltakhoz képest (Függelék 3. ábra D panel). Az alap és magas ARG1-et kifejező sejtpopulációk eloszlásában, és a magas ARG1-et kifejező sejtpopuláción belüli NOS3 eloszlásában hasonló eredményt kaptunk, mint a magzati eritrociták esetén.

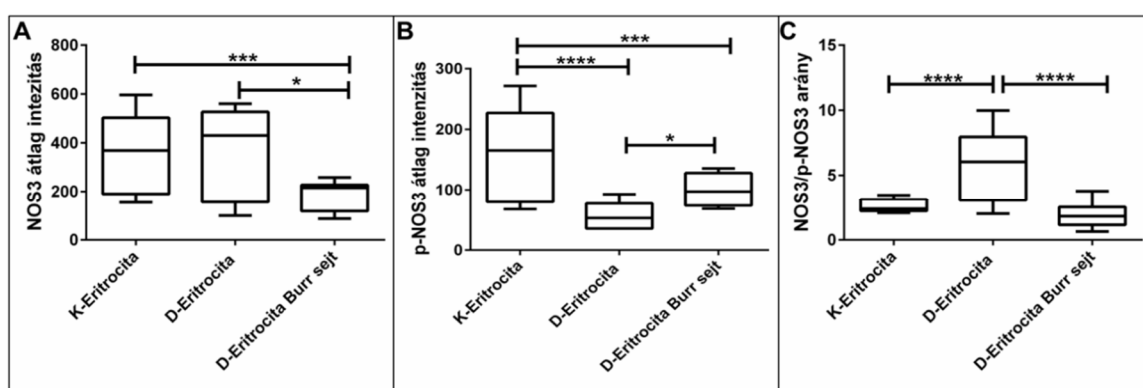
#### 6.4.3 *NOS3 expresszió vizsgálata a morfológiai variánsokban*

Az eritrociták alakja és a megfelelő deformálódási képességük kulcsfontosságú szereppel bírnak a biológiai funkciójuk ellátásában. Ezért számos mintából a FACS analízissel párhuzamosan konfokális mikroszkópos vizsgálatokat is végeztünk, hogy a NOS3 expressziót, illetve a foszforilációs szintet sejtformához köthessük. Ehhez Zeiss LSM880 konfokális mikroszkópot használtunk (21. ábra A-I panel). Az összehasonlítások alapján, a morfológiai különbségeket figyelembe véve, a D-Eritrocita csoporton belül a Burr sejtek ~55%-kal alacsonyabb NOS3 expressziót mutattak, mint a K- és D-Eritrocita csoport biconkáv sejtjei (21. ábra A, D, G panel, 22. ábra A panel).



**21. ábra: Konfokális mikroszkópos felvétel morfológiai variánsokról**  
K-Eritrocita (A-C) és D-Eritrocita (D-F) normál, biconkáv alakú sejtjeinek NOS3 (A, D) és p-NOS3 (B, E) jelölése. C, F, I panelek az egymásra vetített képet mutatják, G-I: D-Eritrocita Burr sejtforma. A felvételt Zeiss LSM 880 konfokális mikroszkóppal készítettük, 40x-es objektívvel. A felvételek során a vizsgálni kívánt sejtekre a következő zoom beállításokat alkalmaztuk: A-C= 4,486, D-F=6,865, G-I=10,019. A méretarány minden képen 5µm-t jelöl.

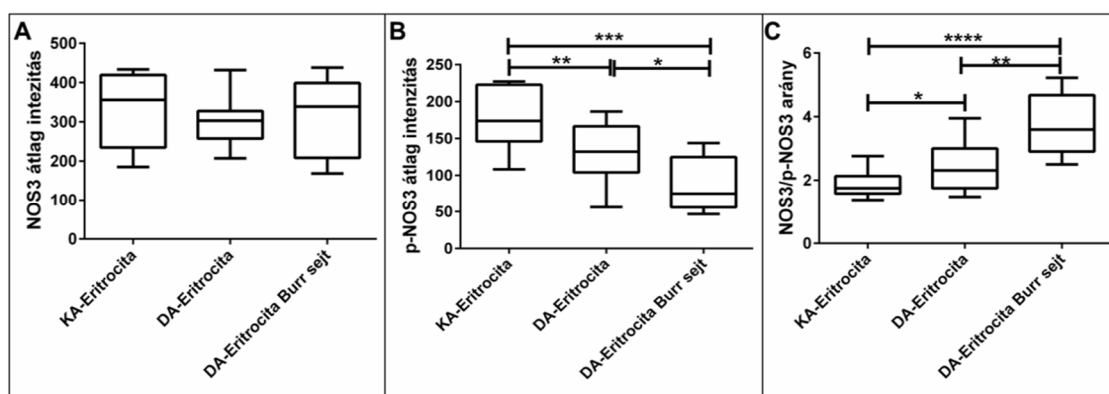
A D-Eritrocita populáció „egészségesnek tűnő” bikonkáv sejtjei nem mutatnak jelentős változást a NOS3 expressziót tekintve, a foszforilációs szintjük azonban csaknem ~50%-kal csökkent az anyai dohányzás következményeként (21. ábra B, E panel, 22. ábra B panel). A Burr sejtek estében csökkent NOS3 expressziót és ezzel párhuzamosan közel azonos mértékben csökkent foszforilációs szintet tapasztaltunk (22. ábra C panel). Ezen eredmény alapján valószínűsíthető, hogy a Burr sejtek esetében nem a foszforilációs útvonal sérül, hanem a NOS3 expressziója/RNS vagy fehérje stabilitása az, ami érintett. A Burr sejtek NOS3 foszforilációs szintje közel azonos a K-Eritrociák bikonkáv sejtjeinél tapasztaltakkal (22. ábra C panel).



**22. ábra: Eritrocita morfológiai variánsok NOS3 expressziójának, illetve a NOS3 foszforilációjának kvantitatív kiértékelése**

**A:** NOS3 intenzitás, **B:** p-NOS3 intenzitás, **C:** NOS3/p-NOS3 intenzitásának aránya a különböző sejtformákban. Az ábrák GraphPad szoftverrel, Neuman-Keuls teszttel készültek. A szignifikancia szintjét \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , illetve \*\*\*\* $p < 0,0001$  valószínűségi értékben határoztuk meg. A kísérletbe bevont mintaszám a következő volt: K-Eritrocita bikonkáv  $n=50$  sejt/5 független minta, D-Eritrocita bikonkáv  $n=50$  sejt/5 független minta, D-Eritrocita Burr sejt  $n=20$  sejt/5 független minta

A magzati eritrociták mellett az édesanyák eritrocitáin is elvégeztük a mikroszkópos vizsgálatokat és ebben a kísérlet sorozatban tapasztaltuk a legnagyobb különbséget a felnőtt és a köldökvér között. Felnőtt eritrocitákra jellemző, hogy a NOS3 expressziójában nem tapasztalható különbség a normál bikonkáv és a Burr sejtek között, ellentétben a fentebb tárgyaltakkal (23. ábra A panel). A DA-Eritrocita bikonkáv sejtjeiben alacsonyabb szintű foszforilációt tapasztaltunk a KA-Eritrocita csoporthoz viszonyítva; a DA-Eritrocita Burr sejtekben ez a foszforilációs szint még alacsonyabbnak mutatkozott (23. ábra B panel).



**23. ábra: Normál és morfológiailag eltérő sejtek NOS3 és p-NOS3 mintázatának kvantifikálása KA- és DA-Eritrocita csoportban**

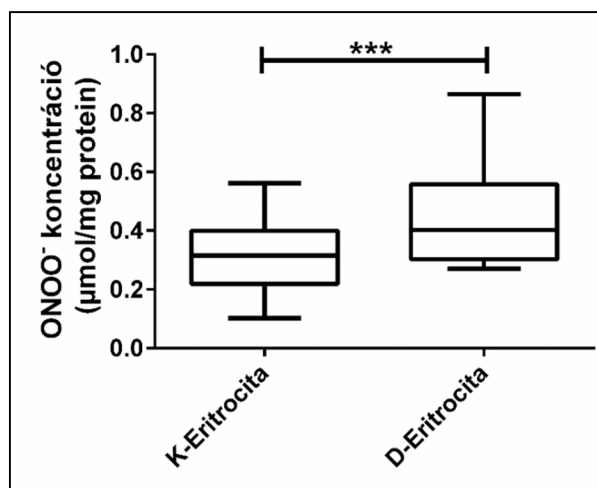
**A:** NOS3 intenzitás, **B:** p-NOS3 intenzitás, **C:** NOS3/p-NOS3 intenzitásának aránya a különböző sejtformákban. Az ábrák GraphPad szoftverrel, Neuman-Keuls teszttel készültek. A szignifikancia szintjét \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , illetve \*\*\*\* $p < 0,0001$  valószínűségi értékben határoztuk meg. A kísérletbe bevont mintaszám a következő volt: KA-Eritrocita bikonkáv  $n=50$  sejt/5 független minta, DA-Eritrocita bikonkáv  $n=50$  sejt/5 független minta, DA-Eritrocita Burr sejt  $n=20$  sejt/5 független minta.

A NOS3/p-NOS3 arányokat vizsgálva elmondhatjuk, hogy a szignifikánsan nem különböző NOS3 expresszióhoz Burr sejtek esetén rendkívül alacsony foszforilációs szint tartozik DA-Eritrocita csoportban (23. ábra C panel).

### 6.5 Az anyai dohányzás hatása a peroxinitrit szintjére

Irodalomból ismert, hogy a lipidperoxidáció egyik kiváltó oka a megnövekedett ONOO<sup>-</sup> szint. A ONOO<sup>-</sup> a O<sub>2</sub><sup>•-</sup> és NO spontán reakciója révén alakul ki. A O<sub>2</sub><sup>•-</sup> mennyisége jelentősen megnövekedhet dohányzás hatására, mind az anyai, mind a köldökzsinór vérben (Pretorius et al., 2013). Tovább emelkedhet a O<sub>2</sub><sup>•-</sup> szintje, amennyiben a megnövekedett ARG1 expresszió következtében gátlódik a NOS3 dimerizáció. Ebben az esetben a biológiailag hasznosítható NO helyett O<sub>2</sub><sup>•-</sup> termelődik a NOS3 által.

Eritrocita mintákon végzett kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a ONOO<sup>-</sup> szintje a D-Eritrocita mintákban 1,5-szer magasabb, mint a K-Eritrocita csoportban (24. ábra).



**24. ábra: A peroxinitrit mennyiség alakulása K- és D-Eritrocita mintákban**

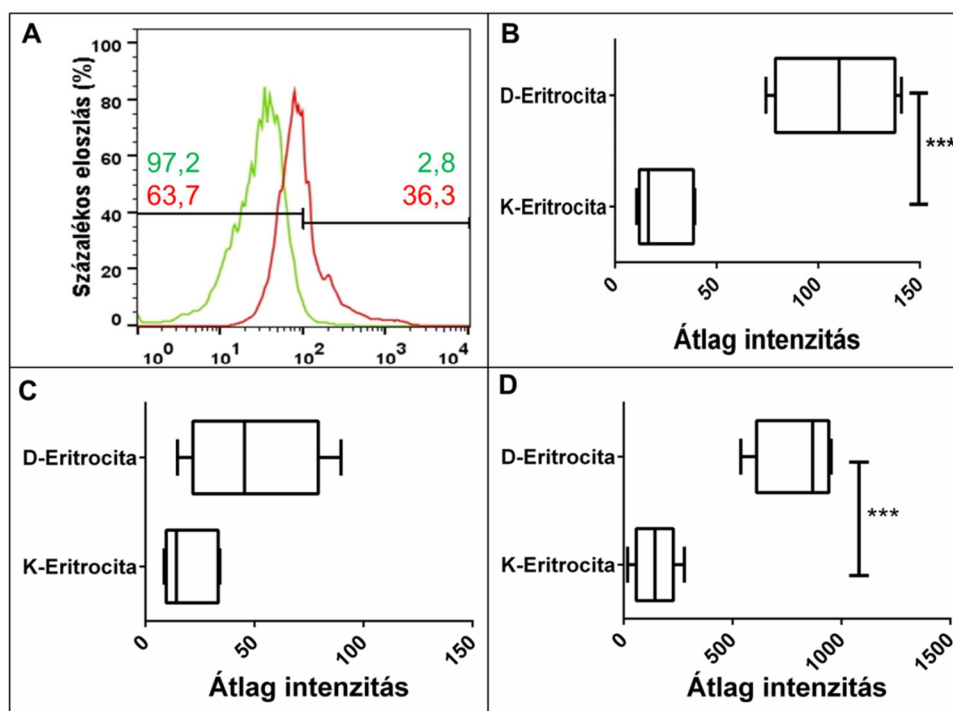
K- és D-Eritrocita sejtek ONOO<sup>-</sup> szintjét mutatja az ábra. A doboz ábra GraphPad szoftverrel, Neuman-Keuls teszttel készült. A szignifikancia szintjét \*\*\*p < 0,001, valószínűségi értékben határoztuk meg.

Kísérletbe bevont minták K-Eritrocita n=10, D-Eritrocita n=15

A KA- és DA-Eritrocitákon végzett mérések alapján az anyai mintákban egy kisebb mértékű emelkedés tapasztalható a ONOO<sup>-</sup> szintben, melynek eredménye a Függelék 4. ábráján látható.

#### **6.6 Lipidperoxidáció vizsgálata a 4-hidroxi-nonenal-fehérje adduktumok mérésével FACS analízissel**

A bemutatott ONOO<sup>-</sup> szint emelkedésének egyik következménye lehet a membránlipidek oxidációja. A membránkárosodás során képződő 4-hidroxi-nonenal (4-HNE) adduktokat képez a fehérjékkel és ezáltal immumfestéssel nyomon követhetővé válik (Schaur et al., 2015). A lipidperoxidáció vizsgálatához membránt preparáltunk és immuncitokémiai jelölést végeztünk anti-4-HNE specifikus ellenanyaggal, majd FACS analízist végeztünk. A D- és K-Eritrocita vizsgálatok eredményei a 25. ábrán láthatóak.



**25. ábra: K- és D-Eritrociták 4-HNE szintje (Ha arra A**

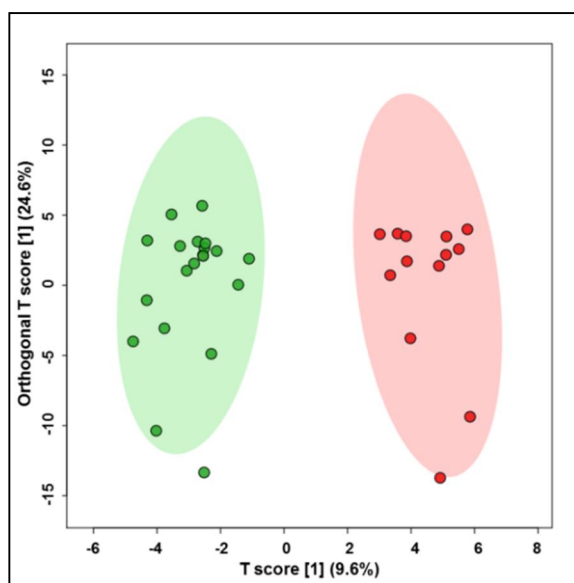
A hisztogramon zöld jelöli a K-Eritrocitákat, piros pedig a D-Eritrocitákat. **A:** reprezentatív hisztogram, mely a 4-HNE szintjét mutatja az egész populáción belül **B-D:** az általunk vizsgált minták eredményeinek összefoglalásából készült statisztikai analízis eredményét mutatja. **B:** a NOS3 pozitív populáción belüli 4-HNE intenzitást mutatja, **C:** alapszintű NOS3-at expresszáló populáción belül és **D:** a magas NOS3-at expresszáló populáción belüli intenzitást ábrázolja. A doboz ábrák GraphPad szoftverrel, Neuman-Keuls teszttel készültek. A szignifikancia szintjét \*\*\* $p < 0,001$  valószínűségi értékben határoztuk meg. Kísérletbe bevont minták K-Eritrocita  $n = 50$ , D-Eritrocita  $n = 42$ .

Szignifikáns növekedés mutatható ki a D-Eritrociták 4-HNE szintjében K-Eritrocitákhoz viszonyítva. A teljes NOS3 pozitív populációt tekintve ez a mennyiségi különbség közel 6-szoros, az alapszintű NOS3-at expresszáló populáción belül 3-szoros, míg a magas NOS3-at expresszálni képes eritrocita populáción belül körülbelül 4,5-szeres 4-HNE mennyiségbeli változás tapasztalható.

KA- és DA-Eritrocita populációt is bevontuk a vizsgálatokba, melynek eredménye a Függelék 5. ábráján látható. A teljes NOS3 pozitív populációt tekintve DA-Eritrociták esetében a növekedés közel 5-szörös. Az alapszintű NOS3-at expresszáló populáción belül a DA-Eritrociták esetében 5-szörös, míg a magas NOS3-at expresszálni képes eritrocita populáción belül körülbelül 1,5-szeres 4-HNE mennyiség figyelhető meg. Utóbbi mértéke elmarad a D-Eritrocitákban tapasztaltaktól.

## 6.7 Lipidösszetétel vizsgálat

A D-Eritrocita mintákon tapasztalt emelkedett ONOO<sup>-</sup>, a 4-HNE képződés és a reológiai eredmények után vizsgáltuk, hogy történt-e lényegi változás az eritrocita membránok lipid összetételében. Az eredmények a 26. és 27. ábrán láthatók.

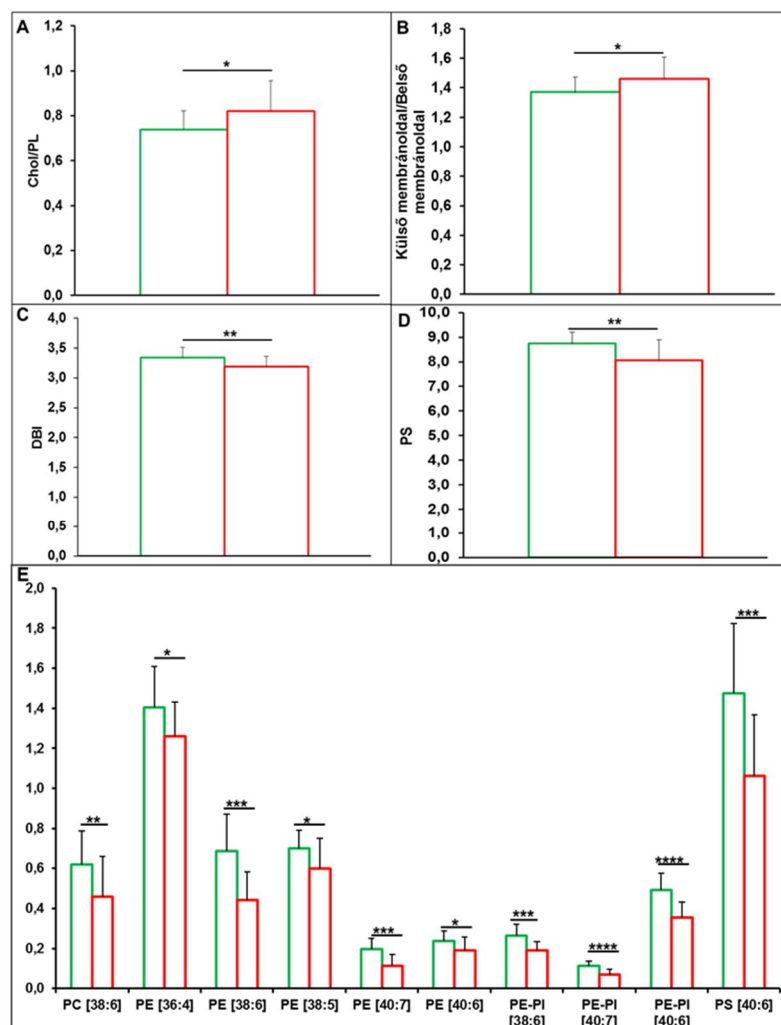


**26. ábra: K- és D-Eritrocita Ortogonális szűrővel ellátott PLS diszkriminancia analízis; PLS Legkisebb négyzetek elvén működő projekciós módszer (*orthogonal partial least squares discriminant analysis*, OPLS-DA) eredménye**

Zöld a K-Eritrocita, míg a piros a D-Eritrocita csoportot reprezentálja.

A 26. ábra egy többváltozós statisztikai analízis, az OPLS-DA eredményét mutatja. A lipidomikai elemzés során a két minta csoport egyértelműen elkülöníthető volt lipid összetételük alapján. A permutációs tesztek ( $n=1000$ ) során a jósolhatóság, azaz a  $Q^2$  ( $Q^2 = 0,63$ ,  $p < 0,001$ ), valamint a jó illeszkedés, azaz az  $R^2$  ( $R^2=0,95$ ,  $p < 0,001$ ) megfelelt a kritériumnak, így ezek alapján az OPLS-DA elemzés eredményes volt.

A 27. ábrán látható Chol/PL arány követése lehetővé teszi a membrán rigiditások összehasonlítását (Owen et al., 1982). D-Eritrociták esetében a Chol/PL arány szignifikánsan magasabb, mint a K-Eritrocitákban (27. ábra A panel). Vizsgáltuk továbbá a külső-, illetve belső membránlemez lipidösszetételének arányát, mely a 27. ábra B paneljén látható. Megállapítható, hogy D-Eritrocita mintákban ez az arány szignifikánsan magasabb, ami azt mutatja, hogy a belső membránlemezben kevesebb lipid található, mint K-Eritrociták esetében.



**27. ábra: A fontosabb membránlipidek mennyiségének összehasonlítása a kontroll és a dohányos csoportokban**

Zölddel a K-, míg pirossal a D-Eritrocitákat jelöltük. **A:** koleszterin/foszfolipidek aránya, **B:** a foszfolipid bilayer külső és belső oldalán található lipidek aránya, **C:** DBI: double bond index. **D:** PS: foszfátidil-szerin alakulását mutatja **E:** Többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmazó foszfolipidek mól%-a. A szignifikanciát a Student-féle t-eloszlás határozta meg. A szignifikancia szintjét \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, illetve \*\*\*\*p < 0,0001 valószínűségi értékekben határoztuk meg. A vizsgálatba bevont mintaszám K-Eritrociták esetében n=25, míg D-Eritrociták esetében 20 volt.

A foszfolipidekben észterezett zsírsavak telítettségének meghatározására az ún. double bond index-et (DBI) használják, mely érték alapvetően meghatározza a membránok globális fluiditását. A DBI értéket a következőképpen kapjuk:

$$DBI = \sum (db \times [Li]),$$

ahol db a kettős kötések száma egy adott lipid fajtában, a [Li] jelzi a lipid fajták mól%-át a meghatározott lipidosztályban. D-Eritrocita minták esetében a DBI szignifikánsan alacsonyabb (27. ábra C panel), mint a kontroll csoportban, ami utalhat egy rigidebb membránra.



Manno és munkatársai kimutatták, hogy a membránlemez két oldalán asszimmetrikusan előforduló PS fontos a sejtmembránok mechanikai tulajdonságainak fenntartásában (Manno et al., 2002), mivel mind az  $\alpha$ -, mind a  $\beta$ -spektrinnek vannak PS kötőhelyei, melyek révén biztosított a kötődés más citoszkeletális fehérjével (Zhang et al., 2013). D-Eritrociták membránjának mindkét oldalán a PS szignifikánsan alacsonyabb mértékben van jelen, ami a 27. ábra D paneljén látható. Az E panelen néhány többszörösen telítetlen zsírsavat tartalmazó foszfolipid aránya látható K- és D-Eritrocita csoportokban. Mivel ezek a telítetlen zsírsavak vannak leginkább kitéve a szabadgyökök általi károsodásnak, nem meglepő módon a D-Eritrocitákban - mintegy a károsodás mértékét jelezvén - alacsonyabb koncentrációban vannak jelen, mint a K-Eritrocitákban.

## 7. Eredmények megbeszélése

Kutatócsoportunk köldökzsinór metszeteken végzett vizsgálatai alapján azt tapasztaltuk, hogy terhesség alatt dohányzó édesanyáktól született újszülöttek köldökzsinójában az erek endotél sejtjei morfológiájukban és funkciójukban sérültek (Zahorán és mtsai. közlésre benyújtva). Az endotél sejtek citoplazmájában megjelentek nagyméretű vakuólumok, melyek szinte az egész citoplazmát kitöltik. Emellett a köldökzsinór vénák esetében a sejtmagok kondenzálódása figyelhető meg, mely a sejthalál mechanizmusok indukciójára utalhat. Fontosnak tartom ismét hangsúlyozni, hogy a köldökzsinór erek nem állnak idegi szabályozás alatt, ezért az endotél sejtekben található NOS3 által termelt NO fontos szerepet játszik a véráramlás helyi szabályozásában (Fox and Khong, 1990). A köldökzsinór endotélium funkcionális integritása alapvető fontosságú a fejlődő magzat megfelelő oxigén- és tápanyag-ellátásához. Zhou és munkatársai 2018-ban publikált cikkükben bizonyították, hogy az érendotél sejtek és az eritrociták kommunikálnak egymással (Zhou et al., 2018). Így felmerül a kérdés, hogy endotéliális diszfunkció esetén a magzati eritrociták képesek-e egyfajta „menekítő” útvonal bekapcsolására.

A 2014-ben megjelent Cortese-Krott és munkatársai által publikált közleményből ismert, hogy a felnőtt izolált eritrociták rendelkeznek NOS3-mal és képesek NO-t termelni (Cortese-Krott and Kelm, 2014).

Úgy gondoljuk, hogy az újszülöttkori megbetegedések patofiziológiájának megértéséhez nélkülözhetetlen a magzati eritrociták morfológiai és funkcionális vizsgálata. Terhesség során az édesanya szervezetének megnő az oxigén igénye, így nő a szabadgyökök mennyisége is (Casanueva and Viteri, 2003). A sejtekben lévő szabadgyökök fiziológiás szintje szabályozza a női ivarrendszer különféle jelátviteli útvonalait. A különböző endogén és exogén stimulusok hatására a szervezetben felszaporodó szabadgyökök felboríthatják a pro-oxidánsok és az antioxidánsok közötti egyensúlyt, ami oxidatív stressz kialakulását eredményezi (Al-Gubory et al., 2010). Kutatócsoportunk 2016-ban elsőként publikálta, hogy az újszülöttek eritrocitái is rendelkeznek aktív NOS3 enzimmel, és az ikerterhesség, mint „stressz faktor”, az egyes terhességhez viszonyítva fokozott NOS3 kifejeződést eredményez (Dugmonits et al., 2016). A dolgozatban összefoglalt munkánk során egy, természetében más jellegű stressz faktor, a terhesség alatti dohányzás hatását vizsgáltuk mind az anya, mind a fejlődő magzat eritrocitáinak morfológiai és molekuláris paramétereire. Dohányzás

során a szervezetbe kerülő szabadgyökök, illetve szabadgyök képződést indukáló vegyületeknek köszönhetően a már fennálló oxidatív stressz mértéke tovább növekedhet (Rua et al., 2014). Ezen ismeretek birtokában vizsgáltuk, hogy az anyai dohányzás következményeként a placentán átszűrődő toxikus anyagok milyen módon befolyásolják a magzat oxigén ellátását. Vizsgáltuk az eritrociták morfológiai, funkcionális és reológiai paramétereit. Összefüggést kerestünk a köldökzsinór erek funkcionális változásai és az eritrocitákban végbemenő molekuláris változások között, valamint kerestük a választ arra a kérdésünkre, hogy az eritrociták dohányos háttérrel, képesek-e egyfajta kompenzációra/menekítő útvonal biztosítására a NOS3 fehérje aktivációján keresztül, endotéliális diszfunkció esetén. Feltételezésünk szerint a változások az embrió/magzatot ért káros hatások lenyomataiként tekinthetők.

Az eritrociták fenotipikus változásait első megközelítésben eozinfestett vérkeneteken vizsgáltuk. A Burr sejtek előfordulási gyakorisága a dohányzás hatására 5-szörösére emelkedett a kontroll mintákhoz képest. Bár egyértelműen nem következik, de a morfológiai sérülésekből következtethetünk a nem megfelelő oxigén szállító kapacitásra, mivel erre a bikonkáv sejtforma a legideálisabb. Terhesség alatti dohányzás során nehézfémek kerülhetnek az édesanya, valamint a placentán átjutva a magzat szervezetébe egyaránt. A fémek közvetlenül, vagy közvetve szabadgyökös reakciókat indíthatnak el (Gundacker and Hengstschläger, 2012). A szabadgyökök hatását felnőtt eritrociták morfológiai változására Sinha és munkatársai írták le. Munkájuk során különböző oxidánsokkal kezelték az eritrocitákat és vizsgálták a membrán deformációit (Sinha et al., 2015). Azt tapasztalták, hogy oxidáló ágensek hatására a normál, bikonkáv formájú eritrociták mellett nagy számban jelentek meg morfológia variánsok (Sinha et al., 2015). Az eritrociták morfológiai változásain kívül a reológiai paramétereket is befolyásolhatják oxidatív ágensek. Kísérleti bizonyítékok vannak arra, hogy az eritrociták ózonnal vagy  $H_2O_2$  történő kezelése hatással van a membrán fluiditására és deformálhatóságára (Şentürk et al., 2005).

Annak alátámasztásaként, hogy a terhesség alatti dohányzás következtében a magzat keringésébe bekerülő nehézfémek és pro-oxidáns molekulák hatásának következményeként jelentek meg a Burr sejtek, *ex vivo* kísérleteket végeztünk, mely során kadmiummal kezeltük az eritrocitákat. Eredményeink azt mutatták, hogy a D populációban egyfajta rezisztencia alakulhatott ki a fém vagy fém által kiváltott szabadgyök képződéssel szemben. A kadmium kezelés mellett, egy ugyancsak szabadgyök termelést indukáló stresszfaktor, a gombafertőzés hatását is vizsgáltuk. A

*Candida parapsilosis* fertőzés gyakran előfordul újszülöttek esetében (Chow et al., 2012). A morfológiai variánsok kisebb mennyiségben voltak megfigyelhetőek a D-Eritrocita populációban annak ellenére, hogy a gomba szaporodása kevésbé volt gátolt. Ebből valószínűsíthető, hogy nem magával a fémmel szemben, hanem a fokozottabb szabadgyökök mennyiséggel szemben alakul ki tolerancia ezekben a sejtekben.

Az anyai dohányzás hatását az eritrociták funkcionalitására a NOS3 expressziójának és aktiválásának vizsgálatával követtük. Ahhoz, hogy a NOS3 NO-ot termeljen, poszttranszlációs módosításokra van szükség. Az egyik ilyen lépés a Ser<sup>1177</sup> oldallánc foszforilációja (Fulton et al., 2001). D-Eritrocita csoport esetében azt tapasztaltuk, hogy a Ser<sup>1177</sup> szignifikánsan alacsonyabb szinten foszforilált már az egészséges kinézetű, bikonkáv alakú sejtekben is. Fontos kiemelni, hogy ez a molekuláris marker már jóval a morfológiai változások előtt jelzi a sejtek sérülését.

A NOS3 aktivációjának szabályozásában a foszforilációs módosításon kívül fontos szerepe van az ARG1-nek is. Az ARG1 szerepe az eritrocitákban még nem tisztázott (Spector et al., 1985), ugyanakkor Yang és munkatársai kimutatták, hogy a humán felnőtt eritrociták funkcionális ARG1-et expresszálnak, valamint ha gátolták expressziójukat, akkor fokozottabb NO termelődést tapasztaltak, melyet a NOS3 aktivitásának megnövekedése biztosított (Yang et al., 2013). A fokozott ARG1 szint számos betegségben szerepet játszik, beleértve a kardiovaszkuláris diszfunkciót is (Berkowitz et al., 2003; Hein et al., 2003), részben azért, mert az ornitin túlzott termelése az érfalban szerkezeti változást indukálhat (Durante, 2013). Másrészt, a NOS3 és az ARG1 közötti verseny hatással lehet a NOS3 dimer kialakulására és NO termelés helyett  $O_2^{\bullet-}$  képződéshez vezethet (Moali et al., 1998). Patológias állapotban a diszfunkcionális endotél és a keringő eritrociták között szoros kölcsönhatást mutattak ki a közelmúltban; a 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő betegek eritrocitái képesek voltak vaszkuláris endotél rendellenességet indukálni egészséges patkányból származó aortában, a fokozott ARG1 szintézis/aktivitás következményeként (Zhou et al., 2018). Kísérleteink során mind a DA-, mind a D-Eritrocita csoportokban szignifikánsan magasabb ARG1 expressziót tapasztaltunk a KA- és K-Eritrocitákhoz viszonyítva. Emellett a magas ARG1-et expresszáló sejtpopuláción belül szinte kizárólag csak alapszintű NOS3 expressziót mértünk. Valószínűsíthető, hogy az anyai dohányzás következtében a köldökzsinór ereiben tapasztalt endotéliális diszfunkció (Zahorán és mtsai. közlésre benyújtva) nem kompenzálható a magzati eritrociták NOS3 aktivitása

által, sőt, az ARG1 expresszióval fokozhatják az endotél sejtek károsodását (Pernow and Jung, 2013; Zhou et al., 2018).

Az ARG1-gyel kapcsolatos eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a dohányzás következményeként a NOS3 aktiválódás csökkenése nem a Ser<sup>1177</sup> foszforilációs útvonal sérülésének, hanem a dimerizáció hiányának lehet a következménye, ami a foszforiláció előfeltétele is.

Irodalomból ismert, hogy a NO szerepet játszik az eritrociták deformálhatóságának fenntartásában (Cortese-Krott and Kelm, 2014; Mehta et al., 2017). Az eritrociták deformálhatósága kritikus paramétere annak, hogy folyamatosan alkalmazkodjanak az érrendszeri változásokhoz. Az eritrociták nanomechanikai tulajdonságai számos patológiás állapotban jelentős változást mutatnak (Ciasca et al., 2015). Az atomerő mikroszkópos eredményeink alapján az a következtetés vonható le, hogy a dohányzás hatásaként az elasztikus munka nem, míg a plasztikus munka jelentősen csökken. Ennek következtében a bikonkáv forma visszanyerése hosszabb időt vesz igénybe, ami egyértelműen arra utal, hogy csökken az oxigénszállító kapacitás. Az irodalomban ilyen jellegű összehasonlítások jelenleg nincsenek, inkább a deformálhatóság és az elasztikus munka közötti összefüggéseket vizsgálják, illetve a Young modulus számolásával adnak információt a sejtek reológiai állapotáról. Az, hogy a munkánk során ilyen típusú kettősséget tapasztaltunk, további vizsgálatokat igényel, amik részben már folyamatban vannak.

Az eritrociták deformációs és relaxációs tulajdonságait a membrán összetétele és a membrán-citoszkeleton komplex tulajdonságai határozzák meg (Li et al., 2007). A lipidomikai vizsgálatok eredményét többváltozós statisztikai analízisnek vetettük alá és megállapítottuk, hogy az anyai dohányzás hatásaként a lipid összetétel jelentősen változik. Három fő különbséget azonosítottunk ezen eredmények alapján. Elsőként, a dohányos eredetű minták eritrocitáinak membránjában a zsírsavak telítettségének csökkenését tapasztaltuk, mely arra utal, hogy a D-Eritrocita populáció merevebb membránnal rendelkezik, ami fokozza a hemodinamikai áramlással szembeni ellenállást. Felnőttkori eritrocitákra vonatkozóan azt dokumentálták, hogy a Chol/PL arány növekedése párhuzamos volt a fluiditás csökkenésével (Kuhn et al., 2017). Feltételezhetően ez igaz lehet a magzati eritrocitákra is. Másodszor, a membránlipid aszimmetria különbözik a K- és D-Eritrocita csoport között, ami elsősorban a PS szint csökkenéséből származik. Valószínűsíthető, hogy a membránlipid aszimmetria változása önmagában károsan befolyásolja a membránfehérjék asszociációját (Chico et

al., 2000). Másrészt, a PS csökkenése utalhat a citoszkéletális hálózat és a kettős foszfolipid réteg közötti kölcsönhatás gyengülésére is, ezáltal kevésbé rugalmas membránstruktúrát okozva (Manno et al., 2002). Végül, a D-Eritrocitákban a többszörösen telítetlen zsírsavak szintjének szignifikáns csökkenését figyeltük meg. Figyelembe véve azt a tényt, hogy ezek a zsírsavak a lipidperoxidáció leggyakoribb célpontjai, összekapcsolható azzal az általunk kapott eredménnyel, miszerint fokozott ONOO<sup>-</sup> szintet mutattunk ki a D-Eritrocita populációban, mely megnövekedett 4-HNE szinttel társult.

Eredményeinkből végső következtetésként levonható, hogy a terhesség alatti dohányzás mind a felnőtt, mind a magzati eritrociták morfológiájára, reológiai paramétereire, és NOS3 funkciójára nézve károsító hatással van. Kutatócsoportunk elsőként bizonyította, hogy a magzati eritrociták funkcionális NOS3-at hordoznak, és a káros stimulusoknak való hosszú távú kitettség során a NOS3 expressziójuk és az aktiválási útvonaluk morfológiájuktól függően sérül. Ebből következően ezen eritrocita populációkban a NOS3-NO kompenzációs/menekítő útvonal nem elérhető a magzat véráramlásának javítása érdekében, ráadásul a megváltozott fehérje expressziós profil még az érrendszeri diszfunkciót is fokozhatja. Mindebből az is következik, hogy az eritrociták morfológiai vizsgálata önmagában nem elégséges az esetlegesen fennálló vaszkuláris diszfunkció megállapítására. Azonban, a morfológiai és molekuláris paraméterek együttes vizsgálata alapján, a NOS3 és az ARG1 szint változásai az anyai és köldökszínór vérben, indikátorként szolgálhatnak az endotéliális sejtek állapotának korai változásáról.

## 8. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném kifejezni hálás köszönetemet témavezetőmnek, **Dr. Hermes Edit**nek, hogy biztosított számomra minden feltételt a dolgozat alapjául szolgáló munka elvégzéséhez. Köszönöm a rengeteg segítséget, a szakmai támogatást és a tudást, amit szakdolgozó- és Ph.D éveim alatt szerezhettem.

Köszönetet szeretnék mondani társtémavezetőmnek, **Prof. Dr. Orvos Hajnalkának**, hogy az orvosi szakkifejezések közötti eligazodásban segítségünkre volt, valamint a klinikai mintagyűjtés során minden segítséget megadott.

Köszönettel tartozom a labor minden korábbi- és jelenlegi munkatársának, **Dr. Jancsó Zsanettnek**, **Lázár Renátának**, **Dr. Ferencz Ágnesnek**, **Zahorán Szabolcsnak**, **Payal Chakrabortynak**, akik a laboratóriumi munka során elláttak jótanácsaikkal és mindig bizalommal fordulhattam hozzájuk segítségért.

Szeretném megköszönni **Prof. Dr. Boros Imre Miklósnak**, hogy a tanszéken végezhettem a kutatómunkámat. Köszönöm a tanszék minden dolgozójának, akik hozzájárultak munkám sikerességéhez.

Köszönettel tartozom kooperációs partnereinknek, **Dr. Végh Attila Gergelynek** az atomerőmikroszkópos vizsgálatokért, **Dr. Péter Máriának**, **Dr. Balogh Gábornak**, **Prof. Dr. Vigh Lászlónak** a lipidomikai vizsgálatokért, a morfológiai analízisért **Dr. Horváth Péternek** és **Hollandi Rékának** a keneteken történt fenotípusok számolásáért, valamint a *Candida parapsilosis* fertőzéért **Prof. Dr. Gácsér Attilának** és **Dr. Papp Csaba Gergőnek**.

Végezetül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani Családomnak, Férjemnek és Barátaimnak a Ph.D éveim során nyújtott kitartó szellemi- és lelki támogatásért.

A kutatás a **GINOP-2.3.2.-15-2016-00035** pályázat keretein belül valósult meg.



GINOP-2.3.2-15-2016-000035

## 9. Felhasznált irodalom

- Aarts**, P.A., Banga, J.D., van Houwelingen, H.C., Heethaar, R.M., Sixma, J.J., 1986. Increased red blood cell deformability due to isoxsuprine administration decreases platelet adherence in a perfusion chamber: a double-blind cross-over study in patients with intermittent claudication. *Blood* 67, 1471-1481.
- Al-Gubory**, K.H., Fowler, P.A., Garrel, C., 2010. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1634-1650. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.06.001>
- Albrecht**, E.W.J., Stegeman, C., Heeringa, P., Henning, R.H., van Goor, H., 2003. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J. Pathol.* 199, 8-17. <https://doi.org/10.1002/path.1250>
- Ayala**, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., 2014. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 1-32. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Bauer**, P.M., Fulton, D., Boo, Y.C., Sorescu, G.P., Kemp, B.E., Jo, H., Sessa, W.C., 2003. Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 278, 14841-14849. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211926200>
- Berkowitz**, D.E., White R, Li D, Minhas KM, Cernetich A, Kim S, Burke S, Shoukas AA, Nyhan D, Champion HC, Hare JM., 2003. Arginase Reciprocally Regulates Nitric Oxide Synthase Activity and Contributes to Endothelial Dysfunction in Aging Blood Vessels. *Circulation.* 108, 2000-2006. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000092948.04444.C7>
- Berlett**, B.S., Stadtman, E.R., 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313-20316. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20313>
- Bernhard**, D., Pfister, G., Huck, C.W., Kind, M., Salvenmoser, W., Bonn, G.K., Wick, G., 2003. Disruption of vascular endothelial homeostasis by tobacco smoke—impact on atherosclerosis. *FASEB J.* 17, 2302-2304. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0312fje>
- Bernhard**, D., Rossmann, A., Wick, G., 2005. Metals in cigarette smoke. *IUBMB Life.* 57, 805-809. <https://doi.org/10.1080/15216540500459667>
- Beutler**, E., Lichtman, M.A., Coller, B.S., et al. General hematology. *Williams Hematology-part 11*, USA: McGraw Hill; 2011. 40 p.
- Binnig**, G., Quate, C.F., 1986. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56, 930-933. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>
- Bisht**, S., Dada, R., 2017. Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies. *Front. Biosci. (Schol. Ed).* Jun 1, 420-447. <https://doi.org/10.1039/c2md00289b>
- Boey**, S.K., Boal, D.H., Discher, D.E., 1998. Simulations of the erythrocyte cytoskeleton at large deformation. I. Microscopic models. *Biophys. J.* 75, 1573-1583. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)74075-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)74075-5)
- Boo**, Y.C., Hwang, J., Sykes, M., Michell, B.J., Kemp, B.E., Lum, H., Jo, H., 2002. Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H1819-H1828. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00214.2002>



- Bredt**, D.S., 1999. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic. Res.* 31, 577-596. <https://doi.org/10.1080/10715769900301161>
- Buettner**, G.R., 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 535-543. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1074>
- Buonocore**, G., Perrone, S., Longini, M., Vezzosi, P., Marzocchi, B., Paffetti, P., Bracci, R., 2002. Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life. *Pediatr. Res.* 52, 46-49. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000016664.46604.01>
- Burton**, G.J., Jauniaux, E., 2015. What is the placenta? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 213, S6.e1-S6.e4. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.07.050>
- Butt**, E., Bernhardt, M., Smolenski, A., Kotsonis, P., Fröhlich, L.G., Sickmann, A., Meyer, H.E., Lohmann, S.M., Schmidt, H.H.H.W., 2000. Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* 275, 5179-5787. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.5179>
- Caldwell**, R.B., Haroldo A. Toqued, S.P.N. and R.W.C., 2015. Arginase: an old enzyme with new tricks. *Trends Pharmacol Sci* 36, 395-405. doi:10.1016/j.tips.2015.03.006.
- Carpenter**, A.E. Jones, Thouis R. Lamprecht, M.R., Clarke, Colin Kang, I.H., Friman, Ola Guertin, D.A., Chang, Joo Han Lindquist, Robert A. Moffat, Jason Golland, Polina Sabatini, D.M., 2006. CellProfiler: Image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol.* 7, 296-303. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r100>
- Casanueva**, E., Viteri, F.E., 2003. Iron and oxidative stress in pregnancy. *J. Nutr.* 133, 1700S-1708S. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1518>
- Chen**, P.F., Tsai, A.L., Wu, K.K., 1995. Cysteine 99 of Endothelial Nitric Oxide Synthase (NOS-III) Is Critical for Tetrahydrobiopterin-Dependent NOS-III Stability and Activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 1119-1129. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2579>
- Chen**, P.F., Tsai, A.L., Wu, K.K., 1994. Cysteine 184 of endothelial nitric oxide synthase is involved in heme coordination and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 269, 25062-25066.
- Chen**, Z.P., Mitchelhill, K.I., Michell, B.J., Stapleton, D., Rodriguez-Crespo, I., Witters, L.A., Power, D.A., Ortiz de Montellano, P.R., Kemp, B.E., 1999. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* 443, 285-289. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01705-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01705-0)
- Chico**, Y., Lafita, M., Ramírez-Duque, P., Merino, F., Ochoa, B., 2000. Alterations in erythrocyte membrane lipid and fatty acid composition in Chediak-Higashi syndrome. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1502, 380-390. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(00\)00062-4](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(00)00062-4)
- Chow**, B.D.W., Linden, J.R., Bliss, J.M., 2012. *Candida parapsilosis* and the neonate: Epidemiology, virulence and host defense in a unique patient setting. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 10, 935-946. <https://doi.org/10.1586/eri.12.74>
- Chrousos**, G.P., 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nat. Rev. Endocrinol.* 5, 374-381. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>
- Chrousos**, G.P., Gold, P.W., 2003. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis published erratum appears in JAMA 276, 1244-1252.

- Church**, D.F., Pryor, W.A., 1985. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. Health Perspect.* 64, 111-126 <https://doi.org/10.1289/ehp.8564111>
- Ciasca**, G., Papi, M., Di Claudio, S., Chiarpotto, M., Palmieri, V., Maulucci, G., Nocca, G., Rossi, C., De Spirito, M., 2015. Mapping viscoelastic properties of healthy and pathological red blood cells at the nanoscale level. *Nanoscale* 7, 17030-17037. <https://doi.org/10.1039/c5nr03145a>
- Cooke**, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J., 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17, 1195-1214 <https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>
- Cooper**, R.A., Diloy Puray, M., Lando, P., Greenverg, M.S., 1972. An analysis of lipoproteins, bile acids, and red cell membranes associated with target cells and spur cells in patients with liver disease. *J. Clin. Invest.* 51, 3182-3192 <https://doi.org/10.1172/JCI107145>
- Corrocher**, R., Ferrari, S., Bassi, A., Guarini, P., Bertinato, L., Olivieri, O., Licia, G.M., Ruzzenente, O., Brugnara, C., De Sandre, G., 1987. Membrane polyunsaturated fatty acids and lithium-sodium countertransport in human erythrocytes. *Life Sci.* 41, 1171-1178 [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(87\)90637-0](https://doi.org/10.1016/0024-3205(87)90637-0)
- Cortese-Krott**, M.M. Rodriguez-Mateos A, Sansone R, Kuhnle GG, Thasian-Sivarajah S, Krenz T, Horn P, Krisp C, Wolters D, Heiß C, Kröncke KD, Hogg N, Feelisch M, Kelm M., 2012. Human red blood cells at work: Identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease. *Blood* 120, 4229-4237. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-442277>
- Cortese-Krott**, M.M. and Kelm, M., 2014. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function? *Redox Biol* 2, 251-258. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.027>
- Crane**, B.R., Arvai, A.S., Ghosh, D.K., Wu, C., Getzoff, E.D., Stuehr, D.J., Tainer, J.A., 1998. Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science* 279, 2121-2126. <https://doi.org/10.1126/science.279.5359.2121>
- Csonka**, K., Vadovics, M., Marton, A., Vágvolgyi, C., Zajta, E., Tóth, A., Tóth, R., Vizler, C., Tiszlavicz, L., Mora-Montes, H.M., Gácsér, A., 2017. Investigation of OCH1 in the virulence of *Candida parapsilosis* using a new neonatal mouse model. *Front. Microbiol.* Jun 30, 1197. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01197>
- Davidson**, S.M., Andreadou, I., Barile, L., Birnbaum, Y., Cabrera-Fuentes, H.A., Cohen, M. V, Downey, J.M., Girao, H., Pagliaro, P., Penna, C., Pernow, J., Preissner, K.T., Ferdinandy, P., 2019. Circulating blood cells and extracellular vesicles in acute cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 115, 1156-1166. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy314>
- De Genna**, N.M., Goldschmidt, L., Day, N.L., Cornelius, M.D., 2017. Prenatal tobacco exposure, maternal postnatal nicotine dependence and adolescent risk for nicotine dependence: Birth cohort study. *Neurotoxicol. Teratol.* 61, 128-132. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2017.02.004>
- Department of Health and Human Services**, 2006. The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke A Report of the Surgeon General, Public Health.
- Diederich**, L., Suvorava, T., Sansone, R., Keller, T.C.S., Barbarino, F., Sutton, T.R., Kramer, C.M., Lückstädt, W., Isakson, B.E., Gohlke, H., Feelisch, M., Kelm, M., Cortese-Krott, M.M., 2018. On the effects of reactive oxygen species and nitric oxide on red blood cell deformability. *Front. Physiol.* 9, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00332>

- Dimmeler**, S., Fleming I., Fisslthaler B., Hermann C., Busse R., Zeiher A.M. 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-605. <https://doi.org/10.1038/21224>
- Discher**, D.E., Mohandas, N., Evans, E. a, 1994. Molecular maps of red cell deformation: hidden elasticity and in situ connectivity. *Science* 66, 1032-1035. <https://doi.org/10.1126/science.7973655>
- Du**, V.X., Huskens, D., Maas, C., Al Dieri, R., De Groot, P.G., De Laat, B., 2014. New insights into the role of erythrocytes in thrombus formation. *Semin. Thromb. Hemost.* 40, 72-80 <https://doi.org/10.1055/s-0033-1363470>
- Dugmonits**, K.N., Ferencz, Á., Zahorán, S., Lázár, R., Talapka, P., Orvos, H., Hermes, E., 2016. Elevated levels of macromolecular damage are correlated with increased nitric oxide synthase expression in erythrocytes isolated from twin neonates. *Br. J. Haematol.* 174, 932-941. <https://doi.org/10.1111/bjh.14156>
- Durante**, W., 2013. Role of arginase in vessel wall remodeling. *Front. Immunol.* May 13, 111 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00111>
- Durante**, W., Liao, L., Reyna, S. V, Peyton, K.J., Schafer, A.I., 2000. Physiological cyclic stretch directs L-arginine transport and metabolism to collagen synthesis in vascular smooth muscle. *FASEB J* 14, 1775-1783. <https://doi.org/10.1096/fj.99-0960com>
- Engel**, A., Müller, D.J., 2000. Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nat. Struct. Biol.* 7, 715-718. <https://doi.org/10.1038/78929>
- Ente**, G., Penzer, P.H., 1991. The umbilical cord: normal parameters. *J. R. Soc. Health* 111, 138-140. <https://doi.org/10.1177/146642409111100406>
- Esterbauer**, H., Schaur, R.J., Zollner, H., 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 81-128. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6)
- Faux**, S.P., Tai, T., Thorne, D., Xu, Y., Breheny, D., Gaca, M., 2009. The role of oxidative stress in the biological responses of lung epithelial cells to cigarette smoke. *Biomarkers.* Jul;14 Suppl 1:90-6 <https://doi.org/10.1080/13547500902965047>
- Feltes**, B.C., Poloni, J. de F., Notari, D.L., Bonatto, D., 2013. Toxicological Effects of the Different Substances in Tobacco Smoke on Human Embryonic Development by a Systems Chemo-Biology Approach. *PLoS One* 8, e61743 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061743>
- Fischmann**, T.O., Hruza, A., Niu, X. Da, Fossetta, J.D., Lunn, C.A., Dolphin, E., Prongay, A.J., Reichert, P., Lundell, D.J., Narula, S.K., Weber, P.C., 1999. Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat. Struct. Biol.* 6, 233-242. <https://doi.org/10.1038/6675>
- Fleming**, I., 2010. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 459, 793-806. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0767-7>
- Fleming**, I., Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Kemp, B.E., Busse, R., 2001. Phosphorylation of Thr 495 Regulates Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity. *Circ. Res.* 88, E68-75. <https://doi.org/10.1161/hh1101.092677>
- Ford**, J., 2013. Red blood cell morphology. *Int. J. Lab. Hematol.* 35, 351-357. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12082>
- Forestier**, F., Daffos, F., Catherine, N., Renard, M., Andreux, J.P., 1991. Developmental hematopoiesis in normal human fetal blood. *Blood* 77, 2360-3.

- Förstermann, U., Sessa, W.C., 2012.** Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur. Heart J.* 33, 829-837. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
- Fox, S.B., Khong, T.Y., 1990.** Lack of innervation of human umbilical cord. An immunohistological and histochemical study. *Placenta* 11, 59-62. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(05\)80443-6](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(05)80443-6)
- Frei, B., Forte, T.M., Ames, B.N., Cross, C.E., 1991.** Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma: Protective effects of ascorbic acid. *Biochem. J.* 277, 133-138. <https://doi.org/10.1042/bj2770133>
- Fruhworth, G.O., Loidl, A., Hermetter, A., 2007.** Oxidized phospholipids: From molecular properties to disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1772, 718-736. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.04.009>
- Fulton, D., Gratton, J.P., Sessa, W.C., 2001.** Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299, 818-824.
- Fulton, D., Gratton J.P., McCabe T.J., Fontana J., Fujio Y., Walsh K., Franke T.F., Papapetropoulos A., Sessa W.C., 1999.** Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 399, 597-601.
- Gault, C.R., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., 2010.** An overview of sphingolipid metabolism: From synthesis to breakdown. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1-23. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1_1)
- Giocondi, M.C., Boichot, S., Plénat, T., Le Grimmeléc, C., 2004.** Structural diversity of sphingomyelin microdomains, in: *Ultramicroscopy.* 100, 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2003.11.002>
- Girasole, M., Dinarelli, S., Boumis, G., 2012.** Structure and function in native and pathological erythrocytes: A quantitative view from the nanoscale. *Micron* 43, 1273-1286. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.03.019>
- Girotti, A.W., 1998.** Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* 39, 1529-42.
- Gladwin, M.T., Crawford, J.H., Patel, R.P., 2004.** The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: Role in blood flow regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 707-17. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.032>
- Gorter, B.Y.E., 1925.** On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J. Exp. Med.* 41, 439-443. <https://doi.org/10.1084/jem.41.4.439>
- Greenberg, M.S., 1976.** Heinz body hemolytic anemia. "Bite cells" -a clue to diagnosis. *Arch. Intern. Med.* 136, 153-155. <https://doi.org/10.1001/archinte.1976.03630090089025>
- Gross, R.T., Bracci, R., Rudolph, N., Schroeder, E., Kochen, J. a, 1967.** Hydrogen peroxide toxicity and detoxification in the erythrocytes of newborn infants. *Blood* 29, 481-493.
- Gundacker, C., Hengstschläger, M., 2012.** The role of the placenta in fetal exposure to heavy metals. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 162, 201-206. <https://doi.org/10.1007/s10354-012-0074-3>
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., 1990.** The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* 15, 129-135. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90206-Q](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90206-Q)
- Hagve, T.A., 1988.** Effects of unsaturated fatty acids on cell membrane functions. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 48, 381-388. <https://doi.org/10.1080/00365518809085746>
- Hamasaki, N., Yamamoto, M., 2000.** Red blood cell function and blood storage. *Vox Sang.* 79, 191-197. <https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.2000.7940191.x>

- Harrison**, D.G., 1997. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J. Clin. Invest.* 100, 2153-2157. <https://doi.org/10.1172/JCI119751>
- Hattangadi**, S.M., Wong, P., Zhang, L., Flygare, J., Lodish, H.F., 2015. From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins , RNAs , and chromatin modifications. *Blood* 118, 6258-6269. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-356006>.
- Hein**, T.W., Zhang C., Wang W., Chang C.I., Thengchaisri N., Kuo L., 2003. Ischemia-reperfusion selectively impairs nitric oxide-mediated dilation in coronary arterioles: counteracting role of arginase. *FASEB J.* 17, 2328-2330. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0115fje>
- Hellermann**, G.R., Solomonson, L.P., 1997. Calmodulin promotes dimerization of the oxygenase domain of human endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 272, 12030-12034. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.18.12030>
- Helms**, C., Kim-Shapiro, D.B., 2013. Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 61, 464-472. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.028>
- Henszen**, M.M.M., Weske, M., Schwarz, S., Haest, C.W.M., Deuticke, B., 1997. Electric field pulses induce reversible shape transformation of human erythrocytes. *Mol. Membr. Biol.* 14, 195-204. <https://doi.org/10.3109/09687689709048182>
- Herzog**, R., Schwudke D.S., Kai Sampaio J.L., Bornstein S.R., Schroeder M.S.A., 2011. A novel informatics concept for high-throughput shotgun lipidomics based on the molecular fragmentation query language. *Genome Biol.* 12, R8. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-1-r8>
- Horvath**, P., Wild, T., Kutay, U., Csucs, G., 2011. Machine learning improves the precision and robustness of high-content screens: Using nonlinear multiparametric methods to analyze screening results. *J. Biomol. Screen.* 16, 1059-1067. <https://doi.org/10.1177/1087057111414878>
- Huang**, P.L., 2009. eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 295-302. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.03.005>
- Huie**, R.E., Padmaja, S., 1993. The reaction of no with superoxide. *Free Radic. Res.* 18, 195-199. <https://doi.org/10.3109/10715769309145868>
- Hutchinson**, R.J., 2000. Hematologic Problems of the Neonate, *New England Journal of Medicine.* <https://doi.org/10.1056/NEJM200011163432018>
- Hutter**, J.L., Bechhoefer, J., 1993. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev. Sci. Instrum.* 64, 1868-1873. <https://doi.org/10.1063/1.1143970>
- Ignarro**, L.J., Buga, G.M., Wei, L.H., Bauer, P.M., Wu, G., del Soldato, P., 2001. Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 4202-4208. <https://doi.org/10.1073/pnas.071054698>
- Jenkinson**, C.P., Grody, W.W., Cederbaum, S.D., 1996. Comparative properties of arginases. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 114, 107-132. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)02138-8](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)02138-8)
- Kanner**, J., German, J.B., Kinsella, J.E., 1987. Initiation of Lipid Peroxidation in Biological Systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 25.317-364. <https://doi.org/10.1080/10408398709527457>
- Kim**, Y., Kim, K., Park, Y., 2012. Measurement Techniques for Red Blood Cell Deformability: Recent Advances. *Intech.* <https://doi.org/10.5772/50698>

- Kim, O.Y., Lee, S.M., An, W.S., 2018.** Impact of blood or erythrocyte membrane fatty acids for disease risk prediction: Focusing on cardiovascular disease and chronic kidney disease. *Nutrients* 10, pii: E1454. <https://doi.org/10.3390/nu10101454>
- Kinnunen, P.K.J., Kaarniranta, K., Mahalka, A.K., 2012.** Protein-oxidized phospholipid interactions in cellular signaling for cell death: From biophysics to clinical correlations. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1818, 2446-2455. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.04.008>
- Kleinbongard, P., Schulz R., Rassaf T., Lauer T., Dejam A., Jax T., Kumara I., Gharini P., Kabanova S., Ozüyan B., Schnürch H.G., Gödecke A., Weber A.A., Robenek M., Robenek H., Bloch W., Rösen P., Kelm M., 2006.** Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 107, 2943-2951. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-3992.Supported>
- Kono, Y., Fridovich, I., 1982.** Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257, 5751-4.
- Kuhn, V., Diederich, L., Keller, T.C.S., Kramer, C.M., Lückstädt, W., Panknin, C., Suvorava, T., Isakson, B.E., Kelm, M., Cortese-Krott, M.M., 2017.** Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antioxid. Redox Signal.* 26, 718-742. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6954>
- Lagace, T.A., Ridgway, N.D., 2013.** The role of phospholipids in the biological activity and structure of the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 11, 2499-2510. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.05.018>
- Li, J., Lykotrafitis, G., Dao, M., Suresh, S., 2007.** Cytoskeletal dynamics of human erythrocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007, 700257104. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700257104>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4)
- Maltepe, E., Fisher, S.J., 2015.** Placenta: The Forgotten Organ. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 31, 523-552. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125620>
- Manno, S., Takakuwa, Y., Mohandas, N., 2002.** Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 1943-1948. <https://doi.org/10.1073/pnas.042688399>
- Martin, E., Berka, V., Tsai, A.-L., Murad, F., 2005.** Soluble guanylyl cyclase: the nitric oxide receptor. *Methods Enzymol.* 396, 478-492. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)96040-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)96040-0)
- Mathers, C.D., Loncar, D., 2006.** Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 3, 2011-2030. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442>
- Mauro, A., Buscemi, M., Provenzano, S., Gerbino, A., 2011.** Human umbilical cord expresses several vasoactive peptides involved in the local regulation of vascular tone: Protein and gene expression of Orphanin, Oxytocin, ANP, eNOS and iNOS. *Folia Histochem. Cytobiol.* 49, 211-218. <https://doi.org/10.5603/FHC.2011.0029>
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969.** Superoxide dismutase -an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol. Chem.* 244, 6049-55.

- Mehta**, S., Jagger, J.E., Sharpe, M.D., Ellsworth, M.L., Ellis, C.G., Bateman, R.M., 2017. Erythrocyte deformability is a nitric oxide-mediated factor in decreased capillary density during sepsis. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 280, H2848-H2856. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.6.h2848>
- Michell**, B.J., Brennan Harris, M., Chen, Z.P., Ju, H., Venema, V.J., Blackstone, M.A., Huang, W., Venema, R.C., Kemp, B.E., 2002. 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205144200>
- Michell**, B.J., Chen Zp, Tiganis, T., Stapleton, D., Katsis, F., Power, D.A., Sim, A.T., Kemp, B.E., 2001. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 17625-17628. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100122200>
- Michell**, B.J., Griffiths, J.E., Mitchelhill, K.I., Rodriguez-Crespo, I., Tiganis, T., Bozinovski, S., Ortiz de Montellano, P.R., Kemp, B.E., Pearson, R.B., 1999. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr. Biol.* 9, 845-848. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80371-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80371-6)
- Moali**, C., Boucher, J.L., Sari, M.A., Stuehr, D.J., Mansuy, D., 1998. Substrate specificity of NO synthases: Detailed comparison of L- arginine, homo-L-arginine, their N( $\omega$ )-hydroxy derivatives, and N( $\omega$ )- hydroxynor-L- arginine. *Biochemistry* 37, 10453-10460. <https://doi.org/10.1021/bi980742t>
- Mohandas**, N., Gallagher, P.G., 2009. Red cell membrane :past, present, and future. *Blood* 112, 3939-3948. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>.
- Mori**, M., 2007. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J. Nutr.* 137, 1616S-1620S. <https://doi.org/10.1093/ajph.100.11.1616> [pii]
- Mount**, P.F., Kemp, B.E., Power, D.A., 2007. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 42, 271-279. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.05.023>
- Myatt**, L., Cui, X., 2004. Oxidative stress in the placenta. *Histochem. Cell Biol.* 122, 369-382. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0677-x>
- Narla**, J., Mohandas, N., 2017. Red cell membrane disorders. *Int. J. Lab. Hematol.* 39, 47-52. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12657>
- Neu**, N., Malik, M., Lunding, A., Whittier, S., Alba, L., Kubin, C., Saiman, L., 2009. Epidemiology of candidemia at a children's hospital, 2002 to 2006. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28, 806-809. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181a0d78d>
- Neuman**, Å., Hohmann, C., Orsini, N., Pershagen, G., Eller, E., Kjaer, H.F., Gehring, U., Granell, R., Henderson, J., Heinrich, J., Lau, S., Nieuwenhuijsen, M., Sunyer, J., Tischer, C., Torrent, M., Wahn, U., Wijga, A.H., Wickman, M., Keil, T., Bergström, A., 2012. Maternal smoking in pregnancy and asthma in preschool children: A pooled analysis of eight birth cohorts. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186, 1037-1043. <https://doi.org/10.1164/rccm.201203-0501OC>
- Oken**, E., Levitan, E.B., Gillman, M.W., 2008. Maternal smoking during pregnancy and child overweight: systematic review and meta-analysis. *Int. J. Obes. (Lond).* 32, 201-210. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803760>
- Oliveira-Paula**, G.H., Lacchini, R., Tanus-Santos, J.E., 2016. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene* (2 Pt 3), 584-599. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.061>

- Owen, J.S., Bruckdorfer, K.R., Day, R.C., McIntyre, N., 1982.** Decreased erythrocyte membrane fluidity and altered lipid composition in human liver disease. *J. Lipid Res.* 23, 124-132.
- Owen, J.S., McIntyre, N., 1978.** Erythrocyte lipid composition and sodium transport in human liver disease. *BBA - Biomembr.* 510, 168-176. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(78\)90138-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(78)90138-4)
- Özüyaman, B., Grau, M., Kelm, M., Merx, M.W., Kleinbongard, P., 2008.** RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects. *Trends Mol. Med.* 14, 314-322. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.05.002>
- Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., Keller, G., 1999.** Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development.* 126, 5073-84.
- Pammi, M., Holland, L., Butler, G., Gacser, A., 2014.** *Candida parapsilosis* is a Significant Neonatal Pathogen: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 32, 1-23. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3182863a1c.Candida>
- Payliss, B.J., Hassanin, M., Prenner, E.J., 2015.** The structural and functional effects of Hg(II) and Cd(II) on lipid model systems and human erythrocytes: A review. *Chem. Phys. Lipids* 193, 36-51. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.09.009>
- Pearson, H.A., 1967.** Life-span of the fetal red blood cell. *J. Pediatr.* 70, 166-171. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(67\)80410-4](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(67)80410-4)
- Peksel, B., Gombos I., Péter M., Vigh L. Jr., Tiszlavicz Á., Brameshuber M., Balogh G., Schütz G.J., Horváth I., Vigh L., Török Z., 2017.** Mild heat induces a distinct “eustress” response in Chinese Hamster Ovary cells but does not induce heat shock protein synthesis. *Sci. Rep.* 7, 15643. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15821-8>
- Pernow, J., Jung, C., 2013.** Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: Reversal of arginine steal?. *Cardiovasc. Res.* 98, 334-343. doi:10.1093/cvr/cvt036.
- Péter, M., Glatz A., Gudmann P., Gombos I., Török Z., Horváth I., Vigh L., Balogh G., 2017.** Metabolic crosstalk between membrane and storage lipids facilitates heat stress management in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* 12, 1-22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173739>
- Petruzzelli, S., Puntoni, R., Mimotti, P., Pulerà, N., Baliva, F., Fornai, E., Giuntini, C., 1997.** Plasma 3-nitrotyrosine in cigarette smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156, 1902-1907. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.156.6.9702075>
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., 2007.** Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 133-163. <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-06>
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Gibbs, D.L., Newell, V.A., Ellis, D., Tullio, V., Rodloff, A., Fu, W., Ling, T.A., 2010.** Results from the artemis disk global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: A 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1366-1377. <https://doi.org/10.1128/JCM.02117-09>
- Piazza, M., Taiakina, V., Guillemette, S.R., Guillemette, J.G., Dieckmann, T., 2014.** Solution structure of calmodulin bound to the target peptide of endothelial nitric oxide synthase phosphorylated at Thr495. *Biochemistry* 53, 1241-1249. <https://doi.org/10.1021/bi401466s>
- Pignatelli, B., Li, C.Q., Boffetta, P., Chen, Q., Ahrens, W., Nyberg, F., Mukeria, A., Bruske-Hohlfeld, I., Fortes, C., Constantinescu, V., Ischiropoulos, H., Ohshima, H., 2001.** Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. *Cancer Res.* 61, 778-784.



- Pinheiro**, P., Lockner, P., 1963. Standardized heat fixation for blood smears. *Biotech. Histochem.* 38,227-229. <https://doi.org/10.3109/10520296309061183>
- Prabhakar**, P., Cheng, V., Michel, T., 2000. A chimeric transmembrane domain directs endothelial nitric-oxide synthase palmitoylation and targeting to plasmalemmal caveolae. *J. Biol. Chem.* 275, 19416-19421. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001952200>
- Pretorius**, E., Du Plooy, J.N., Soma, P., Keyser, I., Buys, A. V., 2013. Smoking and fluidity of erythrocyte membranes: A high resolution scanning electron and atomic force microscopy investigation. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 35, 42-46. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2013.08.003>
- Pryor**, W.A., 1992. Biological effects of cigarette smoke, wood smoke, and the smoke from plastics: the use of electron spin resonance. *Free Radic. Biol. {&} Med.* 13, 659-676. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90040-N](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90040-N)
- Pryor**, W.A., Prier, D.G., Church, D.F., 1983. Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: Nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. *Environ. Health Perspect.* 47, 345-355. <https://doi.org/10.2307/3429523>
- Pryor**, W.A., Stone, K., 1993. Oxidants in Cigarette Smoke Radicals, Hydrogen Peroxide, Peroxynitrate, and Peroxynitrite. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 686, 12-27. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb39148.x>
- Rangarajan**, V., Juul, S.E., 2014. Erythropoietin: Emerging role of erythropoietin in neonatal neuroprotection. *Pediatr. Neurol.* 51, 481-488. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2014.06.008>
- Reinhart**, W.H., Chien, S., 1986. Red Cell Rheology in Stomatocyte-Echinocyte Transformation: Roles of Cell Geometry and Cell Shape. *Blood.* 4, 1110-8. <https://doi.org/10.1182/blood.v67.4.1110.1110>
- Roman**, L.J., Martásek, P., Masters, B.S.S., 2002. Intrinsic and extrinsic modulation of nitric oxide synthase activity. *Chem. Rev.* 102, 1179-1189. <https://doi.org/10.1021/cr000661e>
- Rua Ede A.**, Porto M.L., Ramos J.P., Nogueira B.V., Meyrelles S.S., Vasquez E.C., Pereira T.C., 2014. Effects of tobacco smoking during pregnancy on oxidative stress in the umbilical cord and mononuclear blood cells of neonates. *J. Biomed. Sci.* 21, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12929-014-0105-z>
- Sader**, J.E., Sanelli, J.A., Adamson, B.D., Monty, J.P., Wei, X., Crawford, S.A., Friend, J.R., Marusic, I., Mulvaney, P., Bieske, E.J., 2012. Spring constant calibration of atomic force microscope cantilevers of arbitrary shape, in: *Review of Scientific Instruments.* 83, 103705. <https://doi.org/10.1063/1.4757398>
- Saikumar**, P., Jaya, B., Devi, M.R.R., 2013. Oxidative Stress in Pregnancy. *J. Dent. Med. Sci.* 3, 12-13.
- Schaur**, R.J., 2003. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal, in: *Molecular Aspects of Medicine.* 24. 149-159. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00009-8](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00009-8)
- Schaur**, R.J., Siems, W., Bresgen, N., Eckl, P.M., 2015. 4-Hydroxy-Nonenal—a Bioactive Lipid Peroxidation Product, *Biomolecules.* 5, 2247-2337. <https://doi.org/10.3390/biom5042247>
- Şentürk**, Ü.K., Gündüz, F., Kuru, O., Koçer, G., Özkaya, Y.G., Yeşilkaya, A., Bor-Küçükataý, M., Üyükü, M., Yalçın, Ö., Başkurt, O.K., 2005. Exercise-induced oxidative stress leads hemolysis in sedentary but not trained humans. *J. Appl. Physiol.* 99, 1434-1441. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01392.2004>
- Shu**, X., Keller, T.C.S., Begandt, D., Butcher, J.T., Biwer, L., Keller, A.S., Columbus, L., Isakson, B.E., 2015. Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 4561-4575. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2021-0>

- Simmonds**, M.J., Detterich, J.A., Connes, P., 2014. Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell. *Biorheology* 51, 121-134. <https://doi.org/10.3233/BIR-140653>
- Sinha**, A., Chu, T.T.T., Dao, M., Chandramohanadas, R., 2015. Single-cell evaluation of red blood cell bio-mechanical and nano-structural alterations upon chemically induced oxidative stress. *Sci. Rep.* 5, 1-8. <https://doi.org/10.1038/srep09768>
- Siragusa**, M., Fleming, I., 2016. The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 468, 1125-1137. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1839-0>
- Smith**, K., Li, Y., Piccinini, F., Csucs, G., Balazs, C., Bevilacqua, A., Horvath, P., 2015. CIDRE: An illumination-correction method for optical microscopy. *Nat. Methods* 12, 404-406. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3323>
- Spector**, A., 2000. Review: Oxidative stress and disease. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 16, 193-201. <https://doi.org/10.1089/jop.2000.16.193>
- Spector**, E.B., Rice, S.C., Kern, R.M., Hendrickson, R., Cederbaum, S.D., 1985. Comparison of Arginase Activity in Red Blood Cells of Lower Mammals, Primates, and Man: Evolution to High Activity in Primates. *Am. J. Hum. Genet.* 37, 1138-1145.
- Starzyk**, D., Korbut, R., Gryglewski, R.J., 1997. The role of nitric oxide in regulation of deformability of red blood cells in acute phase of endotoxaemia in rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 48, 731-735.
- Steck**, T.L., Kant, J.A., 1974. Preparation of Impermeable Ghosts and Inside-out Vesicles from Human Erythrocyte Membranes. *Methods Enzymol.* 31, 172-180. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(74\)31019-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(74)31019-1)
- Stubbs**, C.D., Smith, A.D., 1984. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *BBA - Rev. Biomembr.* 779, 89-137. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(84\)90005-4](https://doi.org/10.1016/0304-4157(84)90005-4)
- Takajo**, Y., Ikeda, H., Haramaki, N., Murohara, T., Imaizumi, T., 2001. Augmented oxidative stress of platelets in chronic smokers: Mechanisms of impaired platelet-derived nitric oxide bioactivity and augmented platelet aggregability. *J. Am. Coll. Cardiol.* 38, 1320-1327. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(01\)01583-2](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(01)01583-2)
- Tobacco atlas**, 2016. [ta6.org/country/hungary](http://ta6.org/country/hungary).
- Tran**, B.T., Halperin, A., Chien, J.W., 2011. Cigarette smoking and outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 17, 1004-1011. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.10.032>
- Tsai**, A.L., Berka, V., Sharina, I., Martin, E., 2011. Dynamic ligand exchange in soluble guanylyl cyclase (sGC): Implications for sGC regulation and desensitization. *J. Biol. Chem.* 286, 43182-43192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.290304>
- Tse**, W.T., Lux, S.E., 1999. Red Blood Cell Membrane Disorders. *Br. J. Haematol.* 104, 2-13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1999.01130.x>
- U.S. Department of Health and Human Services**, 2010. How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease, How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. <https://doi.org/10.1037/e590462011-001>
- Vargas**, H.O., Nunes, S.O.V., de Castro, M.R.P., Vargas, M.M., Barbosa, D.S., Bortolasci, C.C., Venugopal, K., Dodd, S., Berk, M., 2013. Oxidative stress and inflammatory markers are associated with depression and nicotine dependence. *Neurosci. Lett.* 544, 136-140. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.03.059>

- Végh**, A.G., Fazakas, C., Nagy, K., Wilhelm, I., Krizbai, I.A., Nagyörszi, P., Szegletes, Z., Váró, G., 2011. Spatial and temporal dependence of the cerebral endothelial cells elasticity. *J. Mol. Recognit.* 24, 422-428. <https://doi.org/10.1002/jmr.1107>
- Volinsky**, R., Kinnunen, P.K.J., 2013. Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: From biophysics to physiology and molecular pathology. *FEBS J.* 280, 2806-16. <https://doi.org/10.1111/febs.12247>
- Volkman**, N., Martásek, P., Roman, L.J., Xu, X.P., Page, C., Swift, M., Hanein, D., Masters, B.S., 2014. Holoenzyme structures of endothelial nitric oxide synthase - An allosteric role for calmodulin in pivoting the FMN domain for electron transfer. *J. Struct. Biol.* 188, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.08.006>
- Wick**, P., Malek, A., Manser, P., Meili, D., Maeder-Althaus, X., Diener, L., Diener, P.A., Zisch, A., Krug, H.F., Von Mandach, U., 2010. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environ. Health Perspect.* 118, 432-436. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901200>
- Winterbourn**, C.C., 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* 4, 278-286. <https://doi.org/10.1038/nchembio.85>
- Wisplinghoff**, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P., Edmond, M.B., 2004. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *Clin. Infect. Dis.* 39, 309-317. <https://doi.org/10.1086/421946>
- Witeska**, M., Kondera, E., Szczygielska, K., 2011. The effects of cadmium on common carp erythrocyte morphology. *Polish J. Environ. Stud.* 3, 783-788.
- Wong**, P., A Basis of Echinocytosis and Stomatocytosis in the Discsphere Transformations of the Erythrocyte. 1999. *J Theor Biol.* 196, 343-61. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1998.0845>
- Wood**, P.M., 1988. The potential diagram for oxygen at pH 7. *Biochem. J.* 253, 287-289. <https://doi.org/10.1042/bj2530287>
- Xia**, J., Wishart, D.S., 2016. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 2016, 14.10.1-14.10.91. <https://doi.org/10.1002/cpbi.11>
- Yang**, J., Gonon, A.T., Sjoquist, P.-O., Lundberg, J.O., Pernow, J., 2013. Arginase regulates red blood cell nitric oxide synthase and export of cardioprotective nitric oxide bioactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 15049-15054. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307058110>
- Yang**, R., Xi, N., Fung, C.K.M., Seiffert-Sinha, K., Lai, K.W.C., Sinha, A.A., 2011. The emergence of AFM applications to cell biology: how new technologies are facilitating investigation of human cells in health and disease at the nanoscale. *J. Nanosci. Lett.* 1, 87-101. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071910-124729.Multiscale>
- Yawata**, Y., 2003. Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model, Book. <https://doi.org/10.1002/3527601538>
- Yeow**, N., Tabor, R.F., Garnier, G., 2017. Atomic force microscopy: From red blood cells to immunohaematology. *Adv. Colloid Interface Sci.* 249, 149-162. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.011>
- Yin**, H., Xu, L., Porter, N.A., 2011. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chem. Rev.* 111, 5944-5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>
- Zachowski**, A., 1993. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem. J.* 294, 1-14. <https://doi.org/10.1042/bj2940001>

- Zahorán, Sz.**, Szántó, P., Bódi, N., Bagyánszki, M., Maléth, J., Hegyi, P., Sári, T., Hermes, E., 2020 Endothelial dysfunction in the human umbilical cord vessels may predict cardiovascular impairments in later life Antioxidants, under review.
- Zhang, R.**, Zhang, C.Y., Zhao, Q., Li, D.H., 2013. Spectrin: Structure, function and disease. *Sci. China Life Sci.* 56, 1076-1085. <https://doi.org/10.1007/s11427-013-4575-0>
- Zhou, Z.**, Mahdi, A., Tratsiakovich, Y., Zahorán, S., Kövamees, O., Nordin, F., Uribe Gonzalez, A.E., Alvarsson, M., Östenson, C.G., Andersson, D.C., Hedin, U., Hermes, E., Lundberg, J.O., Yang, J., Pernow, J., 2018. Erythrocytes From Patients With Type 2 Diabetes Induce Endothelial Dysfunction Via Arginase I. *J. Am. Coll. Cardiol.* 72, 769-780. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.05.052>
- Zipursky, A.**, Brown, E., Palko, J., Brown, E.J., 1983. The erythrocyte differential count in newborn infants. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 5, 45-51.

## 10. Összefoglalás

Egyre több bizonyíték van arra, hogy a környezeti tényezők jelentős hatást gyakorolhatnak az *in-utero* fejlődésre, tartós egészségügyi következményt okozva a születést követő időszakban. A cigarettafüstben lévő vegyületek közül sok olyan toxikus anyag van, melyek a fehérjék, lipidek és nukleinsavak oxidatív károsodásához vezethetnek, ezáltal döntő szerepet játszhatnak bizonyos betegségek patogenezisében. Az ilyen mértékű károsodások a cigarettafüstben lévő oxidáló szerek közvetlen hatásaira vagy a reaktív oxigén fajták endogén forrásainak aktiválására vezethetők vissza.

Terhesség alatt a nők 20-30% -a továbbra is folytatja a dohányzást. A füst- és kátrány-fázisban lévő káros szennyező anyagok diffundálódhatnak a placentába, és a köldökzsinóron keresztül átjuthatnak a magzat keringési rendszerébe. A magzatok sokkal érzékenyebbek számos anyag toxicitására, pusztán azért, mert alacsonyabb méregtelenítési és antioxidáns kapacitással rendelkeznek. Emellett sejteiknek alacsonyabb immunológiai kompetenciájuk és magasabb proliferációs képességük van. Ezen ismeretek mellett azonban a dohányfüst fiziológiai és mögöttes molekuláris hatásai, különösen az embrionális/magzati fejlődésre, napjainkban még feltérképezetlenek.

A magzatot az édesanyával összekötő szervnek, a köldökzsinórnak nincs beidegzése, ezáltal a vaszkuláris tónus és a véráramlás fő szabályozója a NOS3 által termelt NO. A NOS3 NO termelése a szubcelluláris lokalizációtól és az aktív dimer konformációs állapottól függ. A NOS3-at dinamikusan szabályozzák olyan kofaktorok, mint a BH<sub>4</sub>, mely modulálja az elektronok kapcsolását a dimer formához; az L-arginin szubsztrát elérhetősége; a különböző kölcsönhatásban lévő fehérjék; és a Ser<sup>1177</sup> oldallánc foszforilációja, mely a PI3-kináz/Akt kináz útvonalon keresztül valósulhat meg. A krónikus dohányzás veszélyeztetheti a megfelelő endotéliális működést azáltal, hogy csökkenti a NO képződését és növeli a szabadgyökök vagy erős oxidálószerkeket, például a ONOO<sup>-</sup> képződését.

Az eritrociták rendkívül szoros kölcsönhatásban állnak a vaszkuláris endotéliummal, és tovább fokozhatják az érrendszeri károsodás folyamatát. Az eritrociták fontos szerepet játszanak a szövetek oxigenizációjában és a vérnyomás szabályozásában azáltal, hogy képesek nagy mennyiségű NO-t metabolizálni. Az eritrociták biológiai funkciójáról való ismereteink új, úttörő adatokkal bővültek a

közel múltban közzétett kísérleti eredmények alapján. Feltételezhető, hogy a felnőtt eritrociták nemcsak az endotél eredetű NO-szint passzív szabályozói, hanem aktívan szabályozzák a szisztémás NO biológiai hozzáférhetőségét azáltal, hogy szintetizálják, szállítják és felszabadítják azt. Ez az új eritrokrin funkció segít fenntartani az érrendszer és a véráramlás normál működését, hogy biológiailag hozzáférhető NO-t szabadít fel, amelyet a poszttranszlációsan módosított NOS3 szintetizál.

A humán eritrociták egyediségét nagyrészt a plazmamembránban található összetevők jelentik, amelyek elősegítik az összes különböző antigén, transzport fehérje kötődését és biztosítják az eritrociták megfelelő mechanikai jellemzőit. Az egyedülálló eritrocita membrán a koleszterint és a foszfolipidek összetett szerkezetét foglalja magában, mely a transzmembrán fehérjék révén rugalmas hálózatot alkot. Normál fiziológiai körülmények között a koleszterin egyenletesen oszlik el a foszfolipid kettősréteg két oldalán, ugyanakkor a 4 fő foszfolipid - a külső membránlemezben található foszfatidil-kolin és a szfingomielin; és a belső membránlemezben előforduló foszfatidil-etanolamin és foszfatidil-serin, valamint a kisebb foszfoinozítid-összetevők aszimmetrikusan helyezkednek el. Az eritrociták lipid kettősrétegű membránja szabályozza továbbá az eritrociták membrán-fluiditását/deformálhatósági indexét, amelyet belső nanomechanikai tulajdonsága tesz lehetővé. Az eritrociták rendkívül nagy nanomechanikai plaszticitásuknak vagy deformálhatóságuknak köszönhetően képesek arra, hogy dinamikusan alkalmazkodjanak a folyamatosan változó áramlási viszonyokhoz az érrendszerben. Az eritrociták nanomechanikai tulajdonságait nagymértékben veszélyezteti a redox-homeosztázis egyensúlyának felborulása.

Munkánk során a nem megfelelő anyai életmód következményeit vizsgáltuk a születéskor gyűjtött köldökzsinór artériákból származó eritrocita mintákban. Előzetes kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a terhesség alatt dohányzó édesanyák újszülöttjeitől származó köldökzsinór minták esetében nagymértékű endotéliális károsodás figyelhető meg, ezért az újonnan leírt eritrokrin funkciót alapul véve kerestük, hogy a magzati és felnőtt eritrociták képesek-e potenciális menekítési vagy kompenzációs szerepet betölteni ebben a rendszerben. Feltételeztük, hogy az artériás vérből származó magzati eritrociták a méhben történt változások lenyomataiként szolgálnak. Ezért arra törekedtünk, hogy a születés után közvetlenül vizsgáljuk és térképezzük fel a dohányzás okozta expozíció folyamatos hatását az izolált köldökzsinór artériából és felnőtt vénából származó eritrociták biokémiai és biofizikai jellemzőire.

Eredményeink azt mutatták, hogy a terhesség alatt a D-Eritrociták morfológiai és molekuláris változásokat/aberrációt szenvedtek. Bemutattuk, hogy a magzati eritrociták funkcionális NOS3-at képesek expresszálni, és hosszútávú *in vivo* káros anyagokkal történő expozíció után a NOS3 szintjét és aktiválási útvonalát morfológia-függő módon módosítják. A NOS3 csökkent aktivitása egyértelműen párhuzamba hozható az emelkedett ARG1 szinttel. Továbbá az ARG1 fehérje szintje mellett a génexpresszióban is emelkedést tapasztaltunk D-Eritrocita csoportban K-Eritrocitákhoz viszonyítva. Emellett a FACS analízis során kapott eredményeink azt mutatták, hogy a magas ARG1-et expresszáló sejtpopuláció alapszintű NOS3 expressziót mutat. Kimutattuk továbbá, hogy a D-Eritrocita csoport eritrocitái  $O_2^{\bullet-}$  forrássá válnak, ezáltal indukálja az ARG1 expresszióját, mely során tovább gátlódhat a NOS3 expressziós útvonal. Ennek az eredménynek a fontosságát hangsúlyozza az a közelmúltbeli megállapítás, hogy az eritrociták intenzíven hozzájárulnak az érrendszer működéséhez és integritásához. Az eritrocitákban szintetizálódó NOS3 által termelt NO export egy fennálló vaszkuláris diszfunkció esetén menekítési mechanizmus lehet, de az ARG1 szigorúan szabályozza ezt az útvonalat. A már korábban említett ARG1 megemelkedett szintje gátolja a NO-szintézist, ezáltal csökkenti a NO-biológiai hozzáférhetőséget, vagy növeli az oxidatív stresszállapotot a megnövekedett szabadgyök termelés által, ami súlyos endotéliális diszfunkciót okoz. Ezt az indukált diszfunkciót meg lehet akadályozni az ARG1-aktivitás gátlásával.

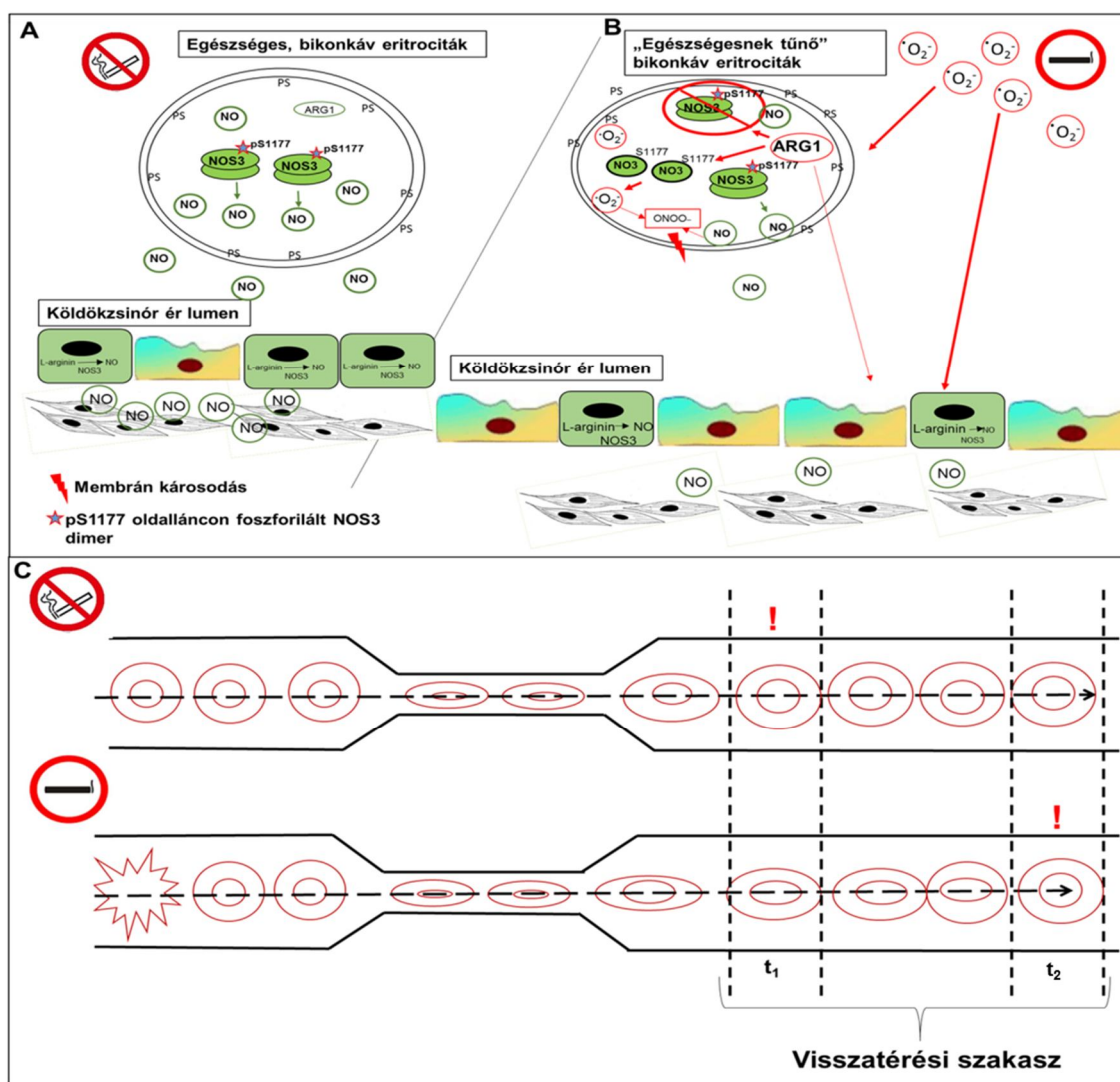
Mindezek mellett azt is tapasztaltuk, hogy az anyai dohányzás következményeképpen a magzati eritrociták fiziko-kémiai tulajdonságai jelentős változásokon mentek keresztül, ami a plasztikus munka növekedésében és a plazmamembrán megváltozott lipidösszetételében nyilvánult meg. Ezenkívül jellemezni tudtuk az eritrociták viszkoelasztikus válaszát a mechanikai ingerre, ahol figyelemreméltó csökkenést tapasztaltunk az eritrociták bikonkáv alakjának visszanyerési képességében azok adott erővel történő összenyomása után D- és DA-Eritrocita csoportok esetében.

D-Eritrociták esetében jelentős ONOO<sup>-</sup> szint emelkedés is kimutatható volt, amely szabadgyökök által közvetített folyamatokat indít el, melyek makromolekuláris károsodásokhoz vezethetnek. A megnövekedett ROS termeléssel összhangban a lipidperoxidáció jelentős növekedését is tapasztaltuk a 4-HNE mennyiségének vizsgálatával. A lipidperoxidáció megnövekedett mértéke közvetetten a membrán

integritásának és funkciójának károsodását, valamint a már korábban említett reológiai paraméterek romlását jelenti.

Mindezek alapján összefoglalásként elmondható, hogy a terhesség alatti dohányzás hatására - mind a DA-, mind a D-Eritrocita csoportok esetében - a redox homeosztázis egyensúlya felborul, mely növeli a makromolekuláris károsodások mértékét. Valószínűsíthető, hogy hatással van az eritrociták membránjának merevségére, mely a belső citoskeletális fehérjék funkcióbeli és rugalmasságbeli csökkenésének következménye lehet. Ennek következtében endotéliális diszfunkció esetén az eritrociták NOS3 fehérjéje által termelt NO kompenzációs mechanizmusként nem elérhető. Ezen túlmenően, a terhesség alatt a megemelkedett ARG1 szint még tovább fokozhatja és szinergizálhatja az érrendszeri diszfunkciót, ezáltal pedig társbetegségek kialakulásához vezethet. Végül pedig úgy véljük, hogy a NOS3 aktivációs útvonal és az ARG1 expressziójának változásai valós idejű szenzorként szolgálhatnak, és korai prognosztikai markerként használhatók nemcsak az eritrocitákhoz kapcsolódó anomáliák, hanem az endotéliális diszfunkció és számos vaszkuláris társbetegség számára is. Munkánk során elért főbb eredményeinket a 28. ábrán grafikusán is összefoglaltuk.





**28. ábra: Főbb eredményeink összefoglalása**

Az **A** panelen a nem dohányzó életmódot folytató édesanyjától született újszülöttek eritrocitáinak állapotát tüntettük fel. Ezek az eritrociták normál fenotípust mutatnak, a NOS3 foszforilált állapotban van, és NO-ot termel. A **B** panelen a D-Eritrociták láthatók. Többségük normál, bikonkáv fenotípust mutat, ám ezek csak egészségesnek tűnnek, hiszen a molekuláris vizsgálataink során a NOS3 foszforilációjának elmaradását, szabadgyökök felhalmozódást, és ARG1 szint emelkedést tapasztaltunk. A **C** panelen az eritrociták reológiai vizsgálatainak eredményeit foglaltuk össze. A felső részen a nem dohányzókra jellemző paramétereket mutatjuk be, a piros felkiáltójel jelzi azt az időt, mikor újra képes visszanyerni a normál, bikonkáv alakját a sejt ( $t_1$ ). Ezzel szemben a dohányzás következtében a  $t_1$  időpontban még nem, csak későbbi ( $t_2$ ) időpontban képes visszatérni a kiindulási sejtalakhoz, mely a plasztikus munka csökkenésével magyarázható.

## 11. Summary

There is an increasing evidence that environmental agents can exert marked impact on the outcome of *in-utero* development and even mediate long-lasting health consequences. Many of the compounds present in cigarette smoke are regarded as harmful toxicants playing crucial roles in the pathogenesis of certain severe illnesses. It has been hypothesized that many of the adverse effects may result from oxidative damage to proteins, lipids and nucleic acids. Such damages could be traced back to direct attack of oxidants present in cigarette smoke and subsequent activation of the endogenous sources of reactive oxygen species (ROS). Around 20-30% of women continue to smoke during full-term pregnancy. The harmful pollutants in vapor and tar phases diffuse into the placenta and pass down to the fetal circulatory system through the umbilical cord. Fetuses are more sensitive to the toxicity of many substances, simply because of their lower detoxification and antioxidant capacities, low immunologic competence and high proliferation rate. However, the physiological and the underlying molecular effects of tobacco smoke in particular on embryonic/fetal development still remains poorly understood.

With the exception of its most proximal segment, the human umbilical cord lacks innervation and thereby the main regulator of their vascular tone and blood flow is the nitric oxide (NO), a signaling molecule produced by the endothelial nitric oxide synthase (NOS3) from L-arginine. The crucial function of NOS3 is the bioactive NO production, which depends on its subcellular localization and on the active dimeric conformational state. NOS3 is dynamically regulated by cofactors like BH<sub>4</sub>, modulating the coupling of electron to the dimeric form, the availability of the substrate L-arginine, diverse interacting proteins, and the phosphorylation at Ser<sup>1177</sup> residue via PI3-kinase/Akt kinase pathway. Chronic smoking jeopardizes proper endothelial functioning by decreasing the formation and increasing the degradation of NO, via generation of ROS or other strong oxidants like peroxynitrite anion (ONOO<sup>-</sup>).

RBCs demonstrated an intimate crosstalk with the vascular endothelium and further synergizes the process of vascular impairment. Red blood cells (RBCs) play an important role in tissue oxygenation and regulating blood pressure by metabolizing large quantities of NO. Our understanding on RBCs' biological function has expanded by the new ground-breaking data. Recently published experimental evidences make it highly supposable that adult RBCs are not only passive regulators of the endothelium-

derived NO level, but actively control systemic NO bioavailability by synthesizing, transporting and releasing it. This new “erythrocrine function” helps to maintain the vascular tone and blood flow by releasing bioavailable NO synthesized by the posttranslationally modified RBC-NOS3.

Human RBCs’ uniqueness is majorly characterized by its plasma membrane that promotes all of its diverse antigenic, transport and mechanical characteristics. The unique RBC membrane envelops a composite structure of cholesterol and phospholipids clustered together with an elastic network of skeletal proteins via transmembrane proteins. Under normal physiological condition, the cholesterol is equally distributed between the two leaflets, whereas the 4 major phospholipids - outer monolayer phosphatidylcholine and sphingomyelin and inner monolayer - phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine together with the minor phosphoinositide constituents are asymmetrically disposed. The RBC lipid bilayer membrane eventually regulates membrane fluidity/deformability index of RBCs, intrinsic nanomechanical property which allows it to traverse across various shear stress and continuous flow changing conditions along the vasculature. The RBCs’ high nanomechanical plasticity or deformability allows them to be dynamically adapted to the continuous flow changing conditions along the vascular system. The nanomechanical properties of RBCs are highly compromised due to redox homeostasis imbalance and thus continuous formation of the oxidants are important indicators of various pathological processes.

We studied the consequences of an inappropriate maternal lifestyle, viz. smoking during pregnancy, on RBCs collected from the peripheral vein of the mother and umbilical cord arteries of the fetus at the time of birth. In our preliminary experiment, we observed endothelial damage in umbilical cords of smoker origin, hence, we looked for a potential rescue mechanism/compensatory role of fetal and adult RBCs, based on the newly described “erythrocrine function”. We assumed that the parameters of fetal RBCs derived from arterial cord blood are blueprints of conditions experienced in-utero. Thus, we aimed to directly investigate and map the continuous effect of tobacco exposure on the underlying biochemical and biophysical characteristics of the isolated and screened adult and fetal RBCs.

Our results indicated that RBCs of the developing fetus born to smoking mother (RBC-S) undergo morphological and molecular alterations/aberration. We demonstrated that the fetal RBCs carry functional NOS3 and during long term in vivo exposure to

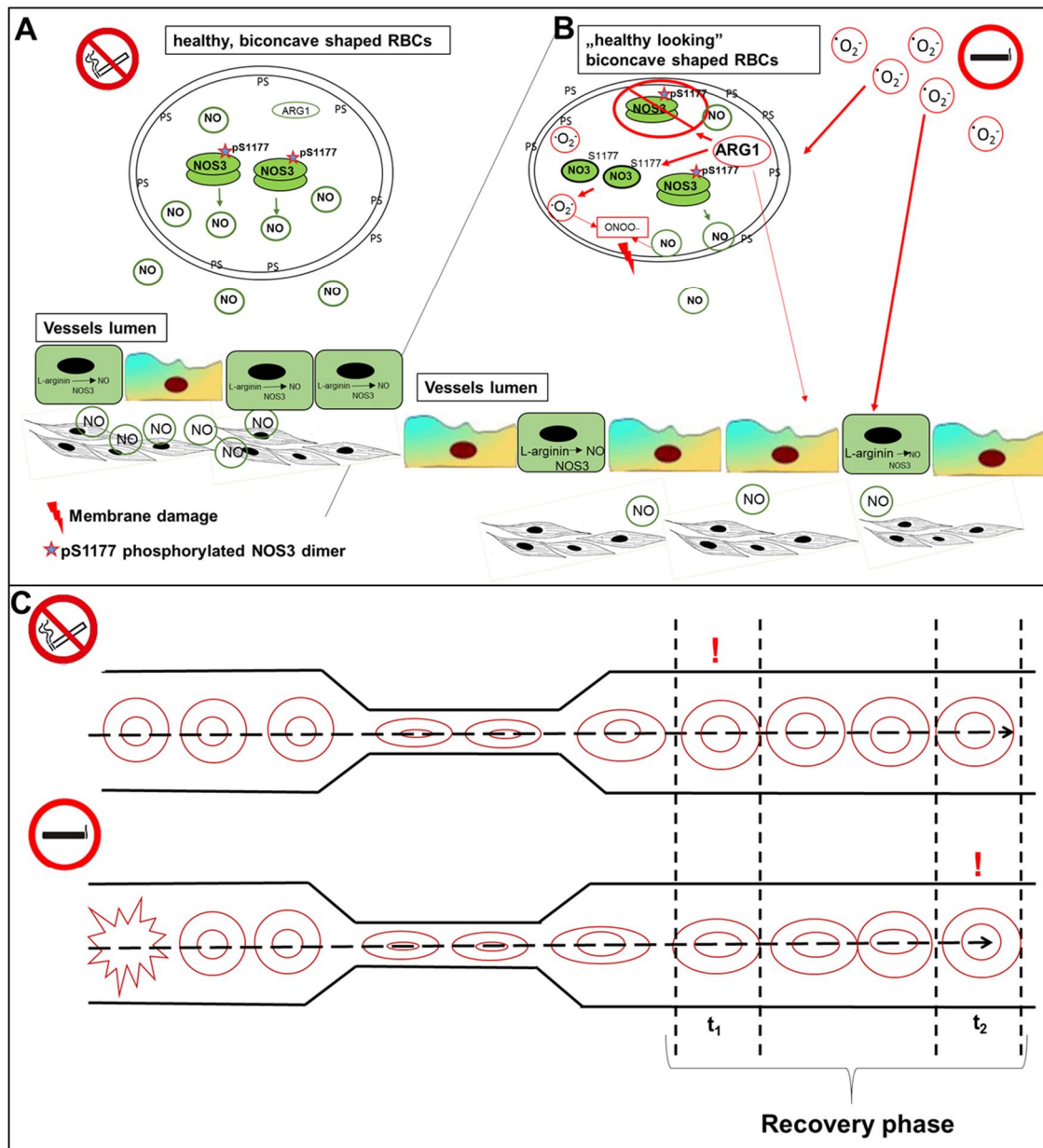
harmful stimuli, the NOS3 level and its activation pathways are altered in a morphology-dependent manner. The impaired activity of NOS3 is well paralleled with an increased ARG1 level. Moreover, both ARG1 protein and *arg1* expression level is elevated in the fetal RBCs from the smoking origin and high ARG1 expressing cells show basal NOS3 level. We also exhibited that cells in RBC-S population become a source for oxidizing agents, with the possibility to further inactivate the NOS3 pathway by the ARG1 induction. The importance of this result was underlined by recent findings of RBCs that can intensively contribute to vascular functioning and integrity. NOS3-derived NO export from RBCs mediate a rescue mechanism in case of a vascular dysfunction, but the pathway gets stringently regulated by ARG1. Elevated level of ARG1 inhibits NO export thus reducing NO bioavailability or increasing oxidative stress conditions by the ROS generation, causing serious endothelial dysfunction. This induced dysfunctionality can be prevented by inhibition of ARG1 activity.

In addition, we experienced that due to maternal smoking, the physico-chemical properties of fetal RBCs underwent significant alterations, with an elevated plasticity and altered lipid composition of the plasma membrane. Additionally, we were able to characterize the viscoelastic response of RBCs to the mechanical stimulus and found a remarkable decrease in the recovering ability of the cells after indentation.

We demonstrated a significant high level of ONOO<sup>-</sup> in RBCs with smoking origin, which initiates free radical mediated processes that mark an array of macromolecular damages. In agreement with the elevated ROS production, we could also detect a significant increase in the lipid oxidation based on the formation of 4-HNE, a known product of lipid peroxidation. The increased frequency of lipid peroxidation indirectly signifies a loss of membrane integrity and function and impaired rheological parameters in the RBC-S population.

Based on all these, it can be summed up, that under the influence of cigarette smoke, an increase in the redox homeostasis imbalance in RBCs enhances the rate of macromolecular damage with membrane stiffness and loss in their intrinsic functional and elastic activities. As a consequence, in case of endothelial dysfunction with low bioavailable level of NO, the RBC NOS3-NO production is unavailable as a compensatory mechanism. Moreover, because of the wide increase in the RBC mass during pregnancy, the elevated ARG1 level might even augment and synergizes the development of vascular dysfunction/comorbidities. And lastly, we believe that the alterations in NOS3 activation pathway and ARG1 expression could serve as a real-time

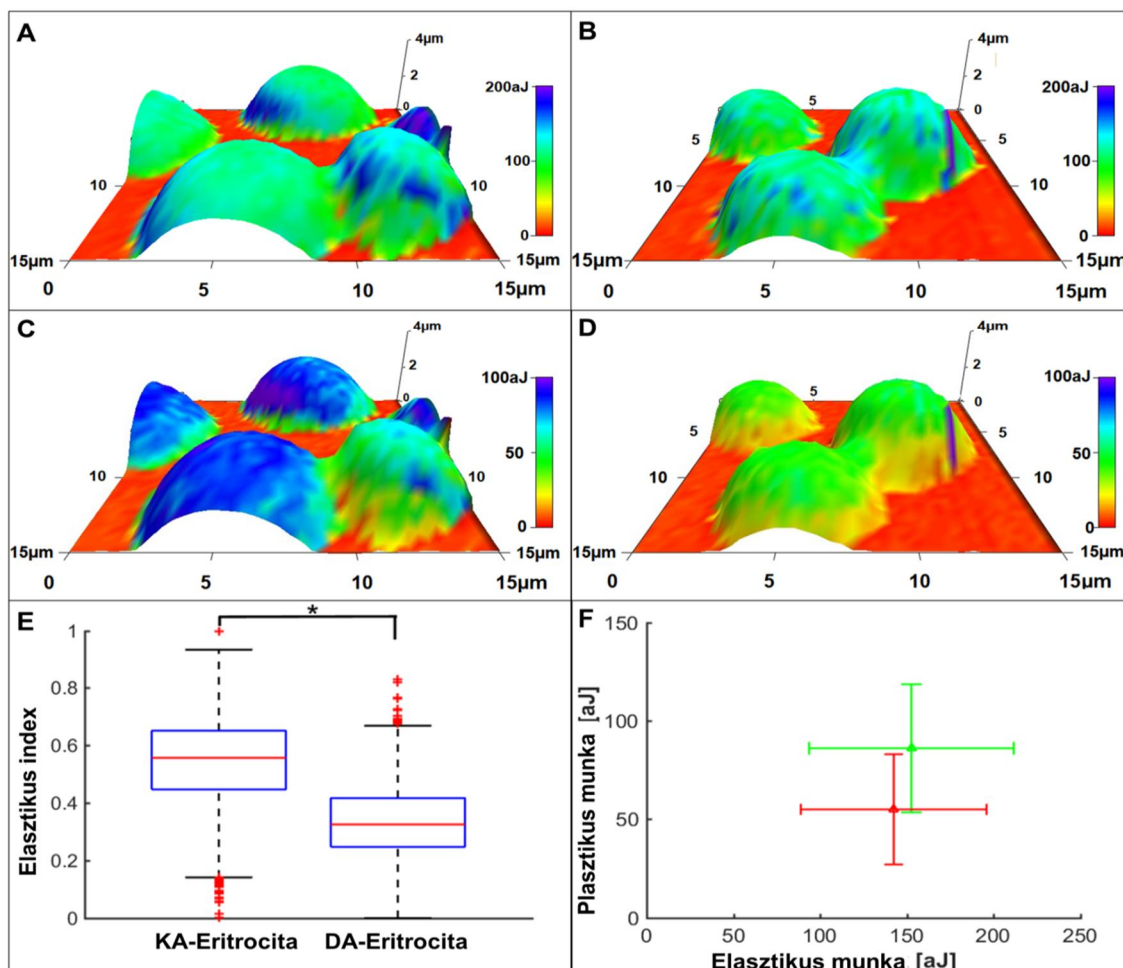
sensor and could be used as an early prognostic marker for not only RBC-linked anomalies but also for endothelial dysfunction and several vascular comorbidities.



**Figure 29: Summary of our main results**

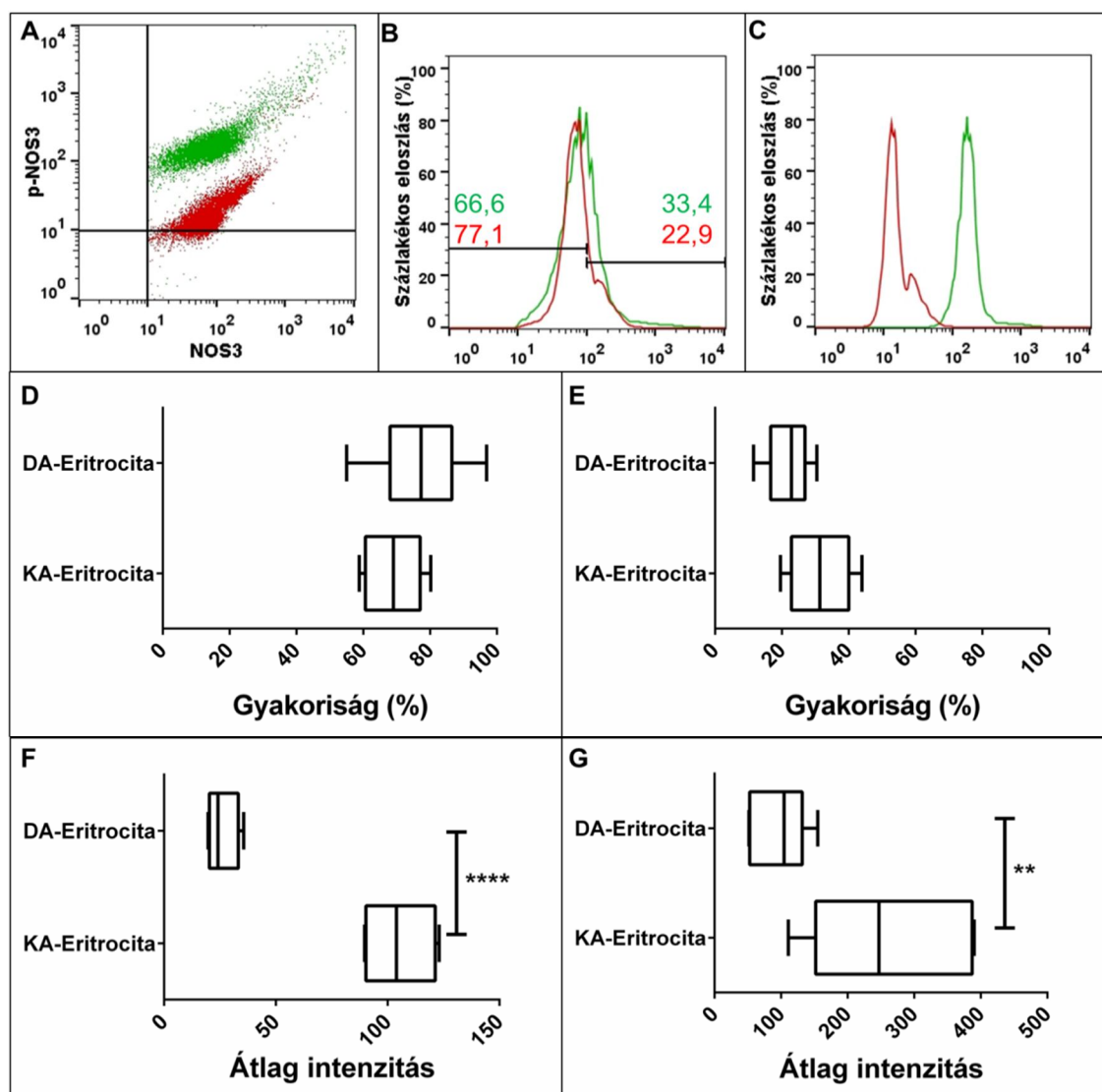
Panel **A** shows the status of fetal erythrocytes with "non-smoking background". These erythrocytes show a normal phenotype, their NOS3 are phosphorylated and probably functionally active. Panel **B** indicates the fetal erythrocytes with "smoking background". Most of them feature normal biconcave phenotype, with impaired functionality. NOS3 phosphorylation is reduced, the free radical accumulation and the ARG1 level increased. Panel **C** summarizes the result on rheological parameters. Red marks indicate the time frame ( $t_1$ ) and ( $t_2$ ) necessary for phenotypical recovery. The difference can be explained by a reduction in plastic work.

## 12. Függelék



Függelék 1.ábra: Deformabilitás vizsgálat atomerő mikroszkóppal

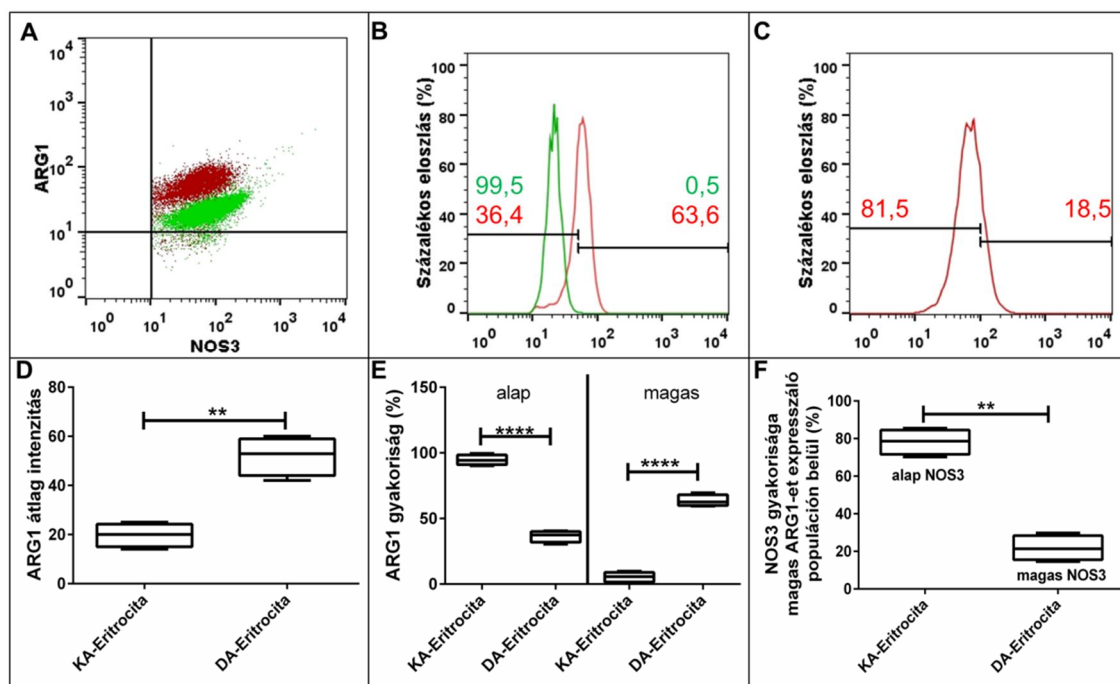
Az A-D ábrákon egy-egy reprezentatív atomerő mikroszkópos felvétel látható. A felső sor az elasztikus munkát szemlélteti a KA-Eritrocita (A) és DA-Eritrocita (B) csoportok esetén. A második sorban a plasztikus munka alakulása látható a KA-Eritrocita (C) és DA-Eritrocita (D) populációban. A reprezentatív ábrákon a színskála munka értékeket határoz meg, melyet aJ-ban adtunk meg. Az E ábrán az elasztikus indexet mutatjuk az összes általunk vizsgált mintán (100-100 sejt). Az F ábrán az összes sejt adatai láthatóak plasztikus és elasztikus munkát tekintve. A KA-Eritrocita zöld, a DA-Eritrocita piros színnel látható. A szignifikancia szintjét  $*p < 0,05$  valószínűségi értékben határoztuk meg.



**Függelék 2. ábra: KA- és DA-Eritrocita immuncitokémiai jelölés elemzése flow citometriás (FACS) módszerrel**

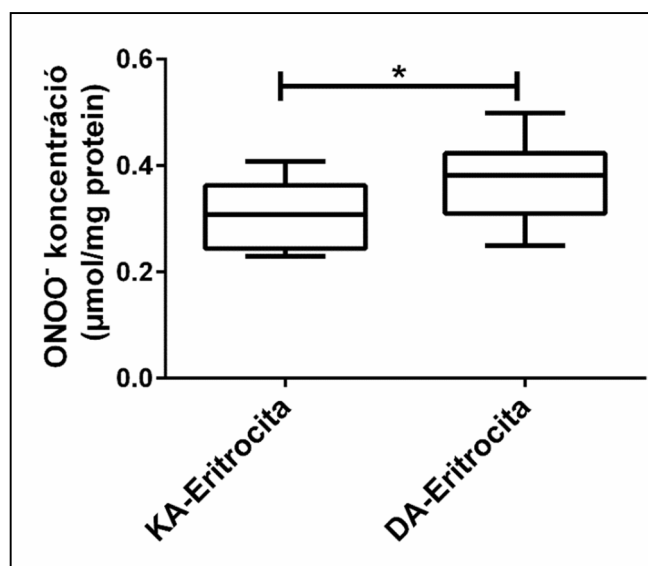
A piros szín jelöli a DA-Eritrocita, a zöld a KA-Eritrocita mintákat az A-C panelen. **A:** egy reprezentatív *dot plot*, melyen az immuncitokémiai vizsgálat eredményét mutatjuk be, melynek során anti-NOS3 és a foszforilált formájának (anti-p-NOS3) intenzitását követtük nyomon. **B:** reprezentatív hisztogram az anti-NOS3 intenzitását szemlélteti. **C:** reprezentatív hisztogram a NOS3 foszforilált formájára specifikus anti-p-NOS3 ellenanyag intenzitását mutatja. Az alap (D) és magas (E) NOS3 expressziót mutató eritrocita populációk gyakoriságát mutatjuk be. Az alap NOS3 expresszáló sejteken belül a foszforiláció mértékét a F panel, míg a magas NOS3 expresszáló sejteken belüli foszforiláció mértékét a G panel mutatja. Az ábrák GraphPad szoftverrel, Neuman-Keuls teszttel készültek. A szignifikancia szintjét \*\* $p < 0,01$ , illetve \*\*\*\* $p < 0,0001$  valószínűségi értékben határoztuk meg. A KA-Eritrociták esetében  $n=42$ , DA-Eritrocita csoport esetén  $n= 50$  mintát vontunk be a kísérletbe.





**Függelék 3. ábra: ARG1 kifejeződése KA- és DA-Eritrocita csoportokban**

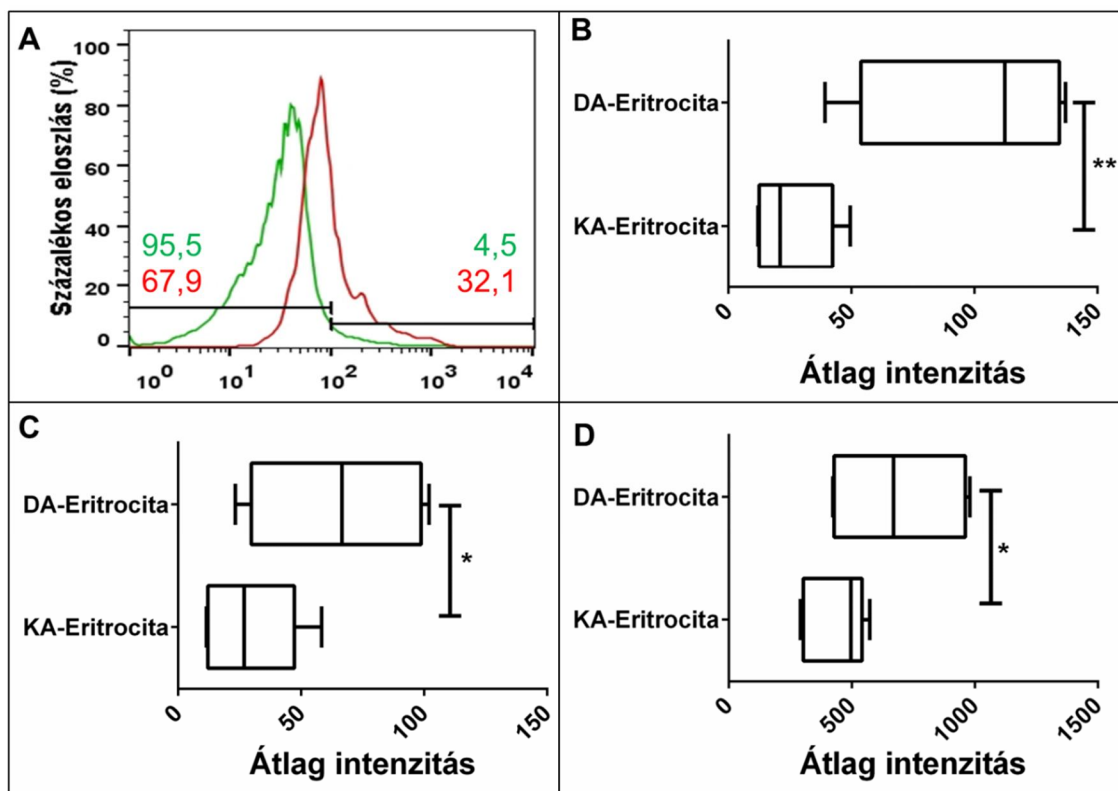
Az ábrákon zölddel a KA-Eritrocita, a pirossal pedig a DA-Eritrocita mintákat jelöltük. **A:** reprezentatív dot plot, melyen a NOS3/ ARG1 immuncitokémiai jelölés látható FACS analízis során. **B:** az ARG1 pozitív sejtek hisztogramját szemlélteti a KA- és DA-Eritrocita csoportban. **C:** a NOS3 kifejeződését mutatja a magas ARG1-et expresszáló eritrocita populáción belül a DA-Eritrocita csoportban, **A D** panelen az ARG1-re vonatkozó intenzitás, az **E** panelen az ARG1 gyakorisága látható az alacsony és a magas intenzitás tartományon belül, míg az **F** panelen a magas ARG1-et expresszáló eritrocita populáció NOS3 eloszlása látható. A szignifikancia mértékét \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ -ben határoztuk meg. Az ábrák GraphPad szoftverrel, a statisztikák egy-utas ANOVA Neuman-Keuls *post-hoc* teszttel készültek. A kísérletbe bevont mintaszám KA-Eritrocita  $n=15$ , DA-Eritrocita  $n=10$  volt.



**Függelék 4. ábra: Szabadgyök mennyiség alakulása KA- és DA-Eritrocita mintákon**

KA- és DA-Eritrocita sejtek ONOO<sup>-</sup> szintjét mutatja az ábra. A doboz ábra GraphPad szoftverrel, Neuman-Keuls teszttel készült. A szignifikancia szintjét \* $p < 0,05$  valószínűségi értékben határoztuk meg. Kísérletbe bevont mintaszám KA-Eritrocita esetén  $n=10$ , DA-Eritrocita esetén  $n=15$  volt.





**Függelék 5. ábra: KA- és DA-Eritrociták 4-HNE mennyiségének mértéke NOS3 populációkra vonatkoztatva**  
**A:** A hisztogrammon zöld jelöli a KA-Eritrocitákat, piros pedig a DA-Eritrocitákat. A számok a sejtpopuláció eloszlását mutatják az alacsony és a magas 4- HNE intenzitás között. **B-D:** az általunk vizsgált minták eredményeinek összefoglalásából készült statisztikai analízis eredményét mutatja. **B:** a NOS3 pozitív populáción belüli 4-HNE intenzitást, **C:** alapszintű NOS3-at expresszáló populáción belül és **D:** a magas NOS3-at expresszáló populáción belül. Az ábrák GraphPad szoftverrel, Neuman-Keuls teszttel készültek. A szignifikancia szintjét \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  valószínűségi értékben határoztuk meg. Kísérletbe bevont minták száma KA-Eritrocita  $n = 50$ , DA-Eritrocita  $n = 42$  volt.