

Doktori (Ph.D) értekezés tézisei

**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

Társ témavezető:

Prof. Dr. habil. Orvos Hajnalka

egyetemi tanár



Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Környezettudományi Doktori Iskola

**Szeged
2021**

Bevezetés

Napjainkban a fejlett országok halálozási statisztikájában a szív és érrendszeri betegségek vezető helyet töltenek be. Kialakulásuk háttere felnőtt korban jól ismert. Klasszikus rizikófaktorai közé tartozik a dohányzás, mely fokozott szabadgyök képződést, oxidatív stresszt indukál és ennek eredményeként endotéliális diszfunkciót okozhat.

Terhesség során a fizikai kapcsolatot az anya és a magzat között a placenta és a köldökzsinór biztosítja. 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 terhesség alatti dohányzás következményeként a dohányfüstben lévő káros összetevők, mint például nehézfémek, pro-oxidánsok, átjuthatnak a placentán, ezzel befolyásolva a köldökzsinór erek és a magzati eritrociták állapotát. A köldökzsinór erek állapota és a keringő eritrocita populáció koordináltan hat a magzat fejlődésére.

Az eritrociták egyik jellemző funkciója az oxigénszállítás és a vérplazmában lévő szabad nitrogén-monoxid (NO) megkötése. Cortese-Krott és munkatársai leírták, hogy a felnőtt eritrociták rendelkeznek saját, aktív nitrogén monoxid szintáz (NOS3) enzimmel és ezáltal a NO-nak nemcsak a tárolására, de aktív szintézisére is képesek (1,2).

Az érrendszerben a NOS3 és az Argináz-1 (ARG1) közös szubsztrátért verseng, az L-argininért. Feltételezhető, hogy az érrendszeri argináz-aktivitás modulálja az L-arginin intracelluláris szintjét, ami korlátozza a NOS által szintetizált NO képződését (3). A NO koncentrációja a szervezetben az ARG1 és a NOS expressziójának és/vagy aktivitásának egyensúlyától függ. Az emelkedett ARG1 aktivitás csökkenti a NOS szubsztráthoz való hozzáférését, ezáltal csökkentheti a NO termelődését.

Normál élettani körülmények között az endotél sejtek által termelt NO képezi a legfontosabb útvonalat a NO biológiai aktivitásának szabályozásában. Endotéliális diszfunkció esetén az endotél sejtek által termelt NOS3 expressziója illetve aktivációja sérülhet. Ebben az esetben az eritrociták kompenzáló szerepet tölthetnek be a saját NOS3 aktivációjuk révén (1,2).

Célkitűzések

Munkánk során feltételeztük, hogy a magzati fejlődést befolyásoló tényezők, úgy, mint az eritrociták morfológiai, funkcionális és reológiai jellemzőinek változásai, mintegy lenyomatai a magzatot ért káros hatásoknak. Munkánk során kerestük azokat a paramétereket, melyek

egy esetleges korai jelzőrendszerként szolgálhatnak, nem csupán az eritrocitákat ért károsodásra, hanem az újszülöttek vaszkuláris rendszerének állapotára is.

Munkánk 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 összetételének és integritásának változása és a deformálódási képesség között.

Anyagok és módszerek

1. Mintagyűjtés és eritrocita frakció preparálása
Munkánk során nem dohányzó és a terhesség alatt, bevallottan napi legalább 10 szál cigarettát elszívó édesanyáktól illetve újszülöttjeiktől gyűjtöttünk mintát.
2. RNS preparálás fagyasztott mintákból
3. Reverz transzkripció
4. Kvantitatív polimeráz láncreakció
5. Morfológiai vizsgálatok és adatelemzés Advanced CellClassifier programmal eozin festett vérkeneteken
6. Eritrociták reológiai tulajdonságainak vizsgálata atomerő mikroszkópos technikával
7. Lipidomikai vizsgálatok eritrocitákon
8. Fluoreszcencia aktivált sejtválogatás és analízis
9. eritrocitákon
10. Spektrofotometriás mérések
 - a. Fehérje koncentráció meghatározása
 - b. Peroxinitrit mérés
11. *Ex vivo* kezelések
 - a. Nehézfém kezelés
 - b. *Candida parapsilosis* fertőzés

Eredmények és eredmények megbeszélése

Eredményeink alapján elmondható, hogy a terhesség alatti dohányzás következtében a magzati eritrociták morfológiai és molekuláris változásokon/aberráción mennek keresztül. Kutatócsoportunk elsőként bizonyította, hogy a magzati eritrociták funkcionális NOS3-at hordoznak, melynek expressziója és aktiválódása a káros stimulusoknak való hosszú távú kitétség során sérül. A NOS3 enzim aktivitásának csökkenése összefüggésbe hozható az ARG1 szint emelkedésével. A közelmúltban megjelent felnőttkori eritrocitákról szóló kutatások szerint az eritrociták intenzíven hozzájárulhatnak az érrendszer működéséhez és integritásának megtartásához. Az eritrociták által termelt NOS3-eredetű NO-export mintegy menekítő szerepet közvetíthet endotéliális diszfunkció esetén. Ennek szabályozásában az ARG1 enzim jelentős szerepet tölt be; ARG1 megemelkedett szintje gátolja a NO-exportot, ezáltal csökkentve a NO biológiai hasznosulását, illetve növelve az oxidatív stressz állapotot szabadgyök termelés révén.

Az anyai dohányzás következtében a magzati eritrociták fizikai-kémiai tulajdonságaiban is jelentős változást figyeltünk meg; megnövekedett plaszticitással, csökkent elaszticitási paraméterekkel és a plazmamembrán megváltozott lipid összetételével jellemezhetők. Kimutattuk, hogy dohányzás hatására eritrocitákban jelentősen megemelkedett a peroxinitrit szint, ami szabad gyökök által közvetített folyamatokat indít el, melyek makromolekula károsodást jelez. A megnövekedett szabadgyök jelenlét mellett a lipidperoxidáció jelentős növekedését is észleltük, melyet a lipidperoxidáció ismert végtermékének, a 4-hidroxi-2-nonenalnak a képződésén keresztül vizsgáltunk.

Összeségében tehát elmondható, hogy dohányzás hatására az eritrocitákban a redox homeosztázis egyensúlya felbomlik, mely növeli a makromolekula károsodások mértékét, mely az eritrociták membránmerevségét vonja maga után, így funkcionalitásuk és rugalmasságuk is sérül. Ennek következtében endotéliális diszfunkció esetén az eritrociták által termelt NO kompenzációs mechanizmusként nem érhető el. Ezenkívül a terhesség alatt az eritrociták mennyiségének növekedése miatt az emelkedett ARG1 szint tovább fokozhatja és szinergizálhatja az endotéliális diszfunkció illetve társbetegségek kialakulását. Végül úgy gondoljuk, hogy a NOS3 aktivációs útvonalának és az ARG1 expressziójának változásai korai prognosztikai markerként szolgálhatnak nemcsak az eritrocitákhoz kapcsolódó anomáliákra, hanem az endotéliális diszfunkcióra és számos vaszkuláris társbetegségre is.

Felhasznált irodalom

1. **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 redbloodcellsatwork: Identification and visualization of erythrocyticNOSactivity in health and disease. *Blood* 120, 4229–4237. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-442277>
2. **Cortese-Krott**, M.M. and Kelm, M., 2014. Endothelialnitricoxidesynthase in redbloodcells: keyto a newerythrocrinefunction? *RedoxBiol* 2, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.027>
3. **Mori**, M., 2007. Regulation of nitricoxidesynthesis and apoptosisbyarginase and argininerecycling. *J. Nutr.* 137, 1616S-1620S. <https://doi.org/10.1093/ajph/137/6/1616S> [pii]

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

Publikációs lista

MTMT azonosító: 10040727

Referált folyóiratban megjelent közlemények

1. **Krisztina Dugmonits**, Ágnes Ferencz, Zsanett Jancsó, Renáta Juhász, and Edit Hermes. 2013. “Major Distinctions in the Antioxidant Responses in Liver and Kidney of Cd²⁺-Treated Common Carp (*Cyprinus Carpio*).” *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 158 (4): 225–30. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.07.005>. **IF: 2,892**
2. **Krisztina N. Dugmonits**, Ágnes Ferencz, Szabolcs Zahorán, Renáta Lázár, Petra Talapka, Hajnalka Orvos, and Edit Hermes. 2016. “Elevated Levels of Macromolecular Damage Are Correlated with Increased Nitric Oxide Synthase Expression in Erythrocytes Isolated from Twin Neonates.” *British Journal of Haematology* 174 (6): 932–41. <https://doi.org/10.1111/bjh.14156>. **IF:5,518**
3. **Krisztina N. Dugmonits**, Payal Chakraborty, Réka Hollandi, Szabolcs Zahorán, Gabriella Pankotai-Bodó, Péter Horváth, Hajnalka Orvos, and Edit Hermes. 2019. “Maternal Smoking Highly Affects the Function, Membrane Integrity, and Rheological Properties in Fetal Red Blood Cells.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2019/1509798>. **IF: 5,076**
4. Payal Chakraborty*, **Krisztina N. Dugmonits***, Attila G. Végh, Réka Hollandi, Péter Horváth, József Maléth, Péter Hegyi, Gábor Németh, and Edit Hermes. 2019. “Failure in the Compensatory Mechanism in Red Blood Cells Due to Sustained Smoking during Pregnancy.” *Chemico-Biological Interactions*. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108821>. **IF:3,723**
5. Gábor Balogh*, Payal Chakraborty*, **Krisztina N. Dugmonits***, Mária Péter*, Attila G. Végh, László Vígh, and Edit Hermes. 2020. “Sustained Maternal Smoking-Associated Changes in the Physico-Chemical Properties of Fetal RBC Membranes Might Serve as Early Markers for Vascular Comorbidities.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1865(4):158615. doi: 10.1016/j.bbalip.2020.158615. **IF: 4,519**
6. Payal Chakraborty, **Krisztina N Dugmonits**, Hajnalka Orvos, Edit Hermes. 2020. “Mature Twin Neonates Exhibit Oxidative Stress via Nitric Oxide Synthase Dysfunctionality: A Prognostic Stress Marker in the Red Blood Cells and Umbilical Cord Vessels.” *Antioxidants (Basel)*. 10;9(9):E845. doi: 10.3390/antiox9090845. **IF:4,610**

*megosztott első szerző

Összesített impakt faktor:26,338

Tudományos konferencián bemutatott poszterek

1. Zsanett Jancsó, **Krisztina Dugmonits**, Edit Hermes: Metal-induced alteration in the expression of two heme-oxygenase genes. FEBS3+ meeting From molecules to life and back Opatija, Croatia 13-16th June 2012. Poster number: PIII-140
2. Renáta Juhász, Ágnes Ferencz, Zsanett Jancsó, **Krisztina Dugmonits** and Edit Hermes: Comparative study on the expression of glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione synthetase and metallothionein genes in common carp during cadmium exposure. Society for Free Radical Research International 16th Biennial Meeting, London, 2012. Sept. 6-9, Poster number: P1.114
3. Edit Hermes, **Krisztina Dugmonits**, Renáta Juhász, Ágnes Ferencz: Heavy metal induced alternative splicing of glutathione synthetase mRNA in the brain of common carp (*Cyprinus carpio*). 22nd IUBMB, 37th FEBS Congress, Spain, 04-09th September 2012, Poster number: P08-78
4. **Krisztina Nikoletta Dugmonits**, Renáta Lázár, Ágnes Ferencz, Szabolcs Zahorán, Hajnalka Orvos, Edit Hermes: Smoking And Pregnancy: Molecular Study Of Oxidative Stress Response In The Human Umbilical Cord. 14Th FEBS-Young Scientist's Forum, 50th FEBS-EMBO Congress, Paris, 30th August-04 September 2014. Poster number of 14Th FEBS-Young Scientist's Forum: P19, Poster number of 50th FEBS-EMBO Congress: SUN-115
5. Ágnes Ferencz, **Krisztina N. Dugmonits**, Szabolcs Zahorán, Edit Hermes: Antioxidant response in the umbilical cord of neonates with intrauterine growth restriction. FEBS3+ Meeting, Molecules of Life, Portorož, Slovenia 2015. Book of Abstracts. p. 252.,
6. **Krisztina N Dugmonits**, Szabolcs Zahorán, Edit Hermes. Novel Insights of Nitric Oxide Signaling: The Importance of Red Blood Cells Activity in Twin Neonates. In: 16th International Conference of Biochemistry and Molecular Biology: Signaling pathways in development, disease and aging. 130 p. Konferencia helye, ideje: Vancouver, Kanada, 2016.07.17-2016.07.21. Vancouver: p. 73.
7. Payal Chakraborty, **Krisztina N Dugmonits**, Ágnes Ferencz, Szabolcs Zahorán, Edit Hermes. P 097 - Is Twin Pregnancy being a Medical Boon? – Comparative Evaluation on Oxidative Stress in Multiple Pregnancy. (2017)
8. Szabolcs Zahorán, **Krisztina Nikoletta Dugmonits**, Nikolett Bódi, Edit Hermes: Cordendothelialdys function can be sensed by circulating red blood cells? (The FEBS Journal 284 (Suppl. 1) (2017) 102–103 DOI: 10.1111/febs.14174), 17th FEBS Young Scientists' Forum (YSF), and at the 42nd FEBS conference, Jerusalem, Israel
9. Payal Chakraborty, **Krisztina N. Dugmonits**, Szabolcs Zahorán, Edit Hermes: Mapping the Morphological and Functional Alterations of the Red Blood Cells in Active Maternal Smoking during Pregnancy. FEBS OPEN BIO 8 : S1 Paper: P.13-004 (2018)
10. Payal Chakraborty, **Krisztina, N. Dugmonits**; Edit, Hermes: In vivo investigation on the morphological and functional alterations of RBCs due to active tobacco smoke during pregnancy. In: Free Radical Biology&Medicine : Abstract Book. (2018) Paper: P-323.

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott Dr. habil. Hermeszt Edit hozzájárulok, hogy Hidjapusztayné Dugmonits Krisztina Nikolettával felhasználja a

Krisztina N. Dugmonits, Payal Chakraborty, Réka Hollandi, Szabolcs Zahorán, Gabriella Pankotai-Bodó, Péter Horváth, Hajnalka Orvos, and Edit Hermeszt. 2019. "Maternal Smoking Highly Affects the Function, Membrane Integrity, and Rheological Properties in Fetal Red Blood Cells." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2019/1509798>. **IF: 5,076**

Payal Chakraborty*, **Krisztina N. Dugmonits***, Attila G. Végh, Réka Hollandi, Péter Horváth, József Maléth, Péter Hegyi, Gábor Németh, and Edit Hermeszt. 2019. "Failure in the Compensatory Mechanism in Red Blood Cells Due to Sustained Smoking during Pregnancy." *Chemico-Biological Interactions*. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108821>. **IF:3,723**

Gábor Balogh*, Payal Chakraborty*, **Krisztina N. Dugmonits***, Mária Péter*, Attila G. Végh, László Vigh, and Edit Hermeszt. 2020. "Sustained Maternal Smoking-Associated Changes in the Physico-Chemical Properties of Fetal RBC Membranes Might Serve as Early Markers for Vascular Comorbidities." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. doi: 10.1016/j.bbalip.2020.158615. **IF:4,519**

*megosztott első szerző

közleményeinkben foglalt eredményeinket a Szegedi Tudományegyetem Környezettudományi Doktori Iskola keretében a PhD fokozat eléréséért benyújtott dolgozatában, és egyúttal kijelentem, hogy ezeket az eredményeket nem használtam fel tudományos fokozat megszerzésekor, s ezt a jövőben sem teszem. A szóban forgó közleményben a jelölt szerepe meghatározó volt.

Szeged, 2021. március 9.

.....
Dr. habil Hermeszt Edit

.....
Hidjapusztayné Dugmonits
Krisztina Nikolettával