

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

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**ZAHORÁN SZABOLCS**

**TÉMAVEZETŐ**

**DR. HERMESZ EDIT**

**HABILITÁLT EGYETEMI DOCENS**

**BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM**

**TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR  
BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI TANSZÉK**

**SZEGED**

**2020.**

## BEVEZETÉS

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

Annak ellenére, hogy keveset tudunk a toxikus anyagok magzati kitétségre gyakorolt molekuláris következményeiről/háttéréről, egyre több bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy ezen környezeti tényezők hátrányosan befolyásolhatják a méhen belüli fejlődést, és akár hosszabb távú egészségügyi következményeket is vonhatnak maguk után. A terhesség során olyan átmeneti szervek biztosítják a magzati fejlődést, mint a méhlepény és a köldökzsinór. Ezért a méhen belüli állapotok megváltozása közvetlenül vagy közvetett módon kapcsolódnak

a placenta vagy a köldökzsinór olyan rendellenességeihez, mint az intrauterin hipoxia és az elégtelen magzati vérellátás. Emellett egy nemrégiben publikált kemo-biológiai interaktóm analízis megerősítette, és bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a dohányfüst komponensei intenzíven befolyásolják a génextpressziót mind embrionális, mind pedig a magzati fejlődési időszakban. Konvencionális kardiovaszkuláris rizikófaktorok, mint például a cukorbetegség, dohányzás, vagy diszlipidémia hatása a felnőttek kardiovaszkuláris rendszerére már behatóan ismeretes, és összefüggésbe hozható az endotéliális diszfunkció (ED) kialakulásával. Az ED egyik fő kiindulópontja a NO csökkent termelődése és/vagy biológiai hozzáférhetősége. Ennek következtében az endotéliumban fokozódik az oxidatív stressz, amely további súlyos következményekhez vezet. Amennyiben csökken a NOS3-függő NO termelés / hozzáférhetőség, alternatív kompenzációs mechanizmusok aktiválódhatnak. Az erek endotélje emellett folyamatos kapcsolatban áll a keringő vörösvértestekkel (VVT), és a közelmúltban számos kórkép esetén számoltak be kettejük szoros kapcsolatáról. Amennyiben feltételezzük, hogy a keringő VVT-k érzékelik az ED-t, akkor a NO biohasznosulását esetlegesen növelhetné az VVT-k NOS3 aktivációs útvonala. Az anyai és a magzati VVT-ken végzett korábbi vizsgálataink alapján jelentős változásokat tapasztaltunk a VVT-k morfológiai paramétereiben, rugalmassági és plasztikus tulajdonságaikban és ezzel összefüggésben a membránt alkotó lipidjeik összetételében. Ezek együttesen hozzájárultak a károsodott VVT-NOS3 aktivációhoz, mely egyértelmű összefüggésbe hozható az anyai dohányzással. Az eredmények így azt valószínűsítik, hogy ez az útvonal nem érvényesülhet kompenzációs mechanizmusként. A menekítés másik kézenfekvő megoldása az indukálható nitrogén-oxid-szintáz (NOS2) expressziójának növekedése az endotéliumban, mivel katalitikus aktivitása (100-1000-szerese a NOS3-nak). Emellett potenciális jelölt a xantin-oxidoreduktáz (XOR) aktiválása is. Bár ez utóbbi meglehetősen tűnhet, ismerve az XOR alapvető tulajdonságait, ám az utóbbi években megjelent tanulmányok egyértelműen bizonyították, hogy a XOR útvonal aktiválása jótékonyan járul hozzá a NO termeléshez az inorganikus nitrát/nitrit redukcióján keresztül.

## CÉLKITŰZÉSEK

Kiinduló hipotézisként feltételeztük, hogy a helytelen anyai életmód, mint pl. a dohányzás, indukálhatja a köldökzsínér erek morfológiai és funkcionális jellemzőinek változását, mintegy lenyomatként jelezve a fejlődő magzatot ért káros hatásokat. Ennek megfelelően kerestük azokat a paramétereket, melyek korai nyomjelzőként szolgálhatnak, nem csupán a köldökzsínér ereket ért közvetlen károsodásra, hanem az újszülöttek vaszkuláris rendszerének általános állapotára is. Munkánk során a dohányos és nem-dohányos édesanyák újszülöttjeitől származó köldökzsínér artériák és vénák összehasonlító vizsgálatát tűztük ki célul. A projekt céljait az alábbi pontok szerint foglaltuk össze:

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

## ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

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

## ELÉRT EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Munkánk jelentőségét abban látjuk, hogy a szakirodalomban fellelhető főként méhlepényen, véren vagy *in vitro* sejt kultúrákon végzett kutatásokat kiegészíthetjük egy olyan megközelítéssel, ami teljes egészében az erek *in vivo* állapotát tükrözi, részletezve a molekuláris mechanizmusokat is. Eredményeinkkel hozzájárulhatunk a méhen belüli toxikus expozíció során bekövetkező molekuláris változások jobb megértéséhez. Az ebben érintett útvonalak mélyreható ismerete pedig újabb terápiás célpontokat határozhat meg a klinikum és az alkalmazott kutatások számára a jövőben.

Eredményeink alapján a következő kijelentéseket tehetjük:

- 1) A NO termelődés leginkább a toxikus terhelés által közvetlenül érintett vénákban sérült, amely a NOS3 SER1177-es pozíció foszforilációjának elmaradására vezethető vissza. Az artériákban eltekintve a NOS3 szint csökkenésétől, a NO ellátottságot többé-kevésbé kielégítőnek gondoljuk. Ennek bizonyítékát a megtartott foszforilációs állapotra vezethetjük vissza, amelynek tekintetében a meglévő NOS3 populáció aktívnak tekinthető. A kompetitív ARG1 enzim jelentősen magasabb expressziót mutatott a dohányos artériákban, mint a vénákban. Ezen eredmény részletes hatását a NOS3-NO útvonalra nem ismerjük, hiszen az artériák esetében a NOS3 dimer formája a foszforilációs állapot alapján megtartottnak tűnik. Ezzel párhuzamosan a vénák esetében feltételezhető, hogy a NOS3 elveszíti a dimer struktúráját, ami az aktiváló foszforiláció visszaesésében nyilvánul meg.
- 2) A NOS2 és XOR expresszió jelentős indukciót mutatott a vénákban. A NOS2 esetében feltételezett szélsőséges kettősség alapján a NOS2-NO legfeljebb limitált mértékben segítheti a vazodilatációt. Ezzel párhuzamosan inkább a passzív, nem közvetlenül hasznosítható tNOx „pool” gyarapításához járul hozzá. A tNOx szint emelkedése hipoxiás környezetben elősegítheti a tNOx-XOR-NO útvonal aktív szerepének előtérbe kerülését. A NOS2 mellett a XOR expresszió is drasztikusan

emelkedett a vénákban. Ezzel szemben az artériákban menekítő útvonalak aktiválódása elmarad.

- 3) Az elsődleges kitettséggű vénákban megfigyelt makromolekula károsodásokhoz nagyban hozzájárulhat a megnövekedett NOS2 által rövid idő alatt, nagy mennyiségben szintetizált NO. Ez az útvonal egy erősen oxidatív környezetben a nitrozatív stressz irányába tolja el a NO szerepét, nem pedig a biológiailag aktív és hasznos irányba. Ezt megalapozza a vénák esetében megfigyelt magas  $O_2^{\cdot-}$  koncentráció, ami mellett nagy valószínűséggel ONOO<sup>-</sup> képződik egy spontán reakcióban. A potenciálisan ONOO<sup>-</sup>-hez köthető makromolekula nitráció és/vagy oxidáció nyomai a vénákban jelentős mértékben detektálhatóak voltak. A membránkárosodás markereként szolgáló 4-HNE adduktok jelenléte és a fehérjék 3-NT típusú módosítása is jelentős emelkedést mutatott. artériákban makromolekula károsodásra utaló jelek elhanyagolhatóak, feltételezhetően a másodlagos, közvetett expozíciójuk miatt. Ebben az esetben a 4-HNE növekedés a vénákhoz képest igen kismértékű a dohányos mintáinkban. Ezzel párhuzamosan a 3-NT szint a kontroll artériák értékét sem éri el. Ez utóbbi marker mindkét értípusban összefüggésbe hozható a NOS2 expresszióval. A DNS kettős törés és a hibajavítást értékelő eredményeink azt mutatták, hogy a dohányos vénákban detektált fókuszok átlagos becsült mérete elmaradt a kontrollhoz viszonyítva, amely arra enged következtetni, hogy a hibajavító apparátus megfelelő összeszerelődése ez esetben gátolt.
- 4) A transzmissziós elektronmikroszkópia során megfigyelt ultrastrukturális változások szintén az ér típusok különböző fokú kitettségre utalnak, mely alátámasztja a molekuláris adatainkat. Az erek endotél rétegében megfigyelt elváltozások jelzik a vénák fokozott mértékű károsodását, amely a toxikus anyagokkal szembeni közvetlen kitettségenek tudható be. A vénák esetében számos olyan előrehaladott leépülést figyeltünk meg, amely CASP3 mediált nagy mértékű sejtpusztuláshoz vezet. Az MMP-9 – TIMP-1 arányok vizsgálata során a véna esetében bizonyítást

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

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



## **TÁMOGATÁS**

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

## KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

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

Dugmonits, Krisztina N., Ágnes Ferencz, Szabolcs Zahorán, Renáta Lázár, Petra Talapka, Hajnalka Orvos, és Edit Hermes. „Elevated Levels of Macromolecular Damage Are Correlated with Increased Nitric Oxide Synthase Expression in Erythrocytes Isolated from Twin Neonates”. *British Journal of Haematology* 174, sz. 6 (2016): 932–41. <https://doi.org/10.1111/bjh.14156>.

Zhou, Zhichao, Ali Mahdi, Yahor Tratsiakovich, Szabolcs Zahorán, Oskar Kövamees, Filip Nordin, Arturo Eduardo Uribe Gonzalez, és mtsai. „Erythrocytes From Patients With Type 2 Diabetes Induce Endothelial Dysfunction Via Arginase I”. *Journal of the American College of Cardiology* 72, sz. 7 (2018. 14): 769–80. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.05.052>.

Szabolcs Zahorán, Péter R. Szántó, Nikolett Bódi, Mária Bagyánszki, József Maléth<sup>3</sup>, Péter Hegyi, Tamás Sári, Edit Hermes. Endothelial dysfunction in the human umbilical cord vessels could serve as a fingerprint for fetal involvement in toxic exposure. Kézirat benyújtva a *Free Radical Biology and Medicine* folyóirathoz (2020/09/25)