

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Angiotenzin-konvertáló enzim endogén szabályozása
szabad zsírsavakkal**

Enyedi Enikő Edit

Témavezető: Dr. Fagyas Miklós



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2026

ANGIOTENZIN-KONVERTÁLÓ ENZIM ENDOGÉN SZABÁLYOZÁSA
SZABAD ZSÍRSÁVAKKAL

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Enyedi Enikő Edit
okleveles táplálkozástudományi szakember,
orvosdiagnosztikai laboratóriumi analitikus,
orvos- és egészségtudományi angol-magyar szakfordító

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája
(Kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

Témavezető: Dr. Fagyas Miklós, PhD

Az értekezés bírálói: Dr. Oláh Attila, PhD
Dr. Oláh Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora
tagok: Dr. Bereczky Zsuzsanna, az MTA doktora
Prof. Dr. Sepp Róbert, az MTA doktora
Dr. Oláh Attila, PhD
Dr. Oláh Tamás, PhD

Az értekezés védésének helye, időpontja:
Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme
2026. október 8. 13:30

BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer és az angiotenzin-konvertáló enzim szerepe a kardiovaszkuláris szabályozásban

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) a kardiovaszkuláris homeosztázis egyik központi szabályozó mechanizmusa, amely meghatározó szerepet játszik a vérnyomás, a folyadék- és elektrolit-egyensúly, valamint a vaszkuláris tónus fenntartásában. A rendszer aktivációja csökkent effektív keringési volumen, hypotensio vagy fokozott szimpatikus aktivitás hatására indul meg, amikor a juxtaglomeruláris apparátus renint szabadít fel. A renin az angiotenzinogént angiotenzin I-gyé alakítja, amely önmagában biológiailag inaktív decapeptid. Az angiotenzin I angiotenzin II-vé történő átalakítását az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) katalizálja.

Az angiotenzin II hatásai döntően az AT1 receptoron keresztül érvényesülnek. Az AT1 receptor Gq-fehérjéhez kapcsolt receptor, amelynek aktivációja a foszfolipáz C aktiválásához vezet. Ennek következtében az inozitol-1,4,5-trifoszfát (IP₃) és a diacilglicerol képződése fokozódik, ami intracelluláris Ca²⁺-felszabadulást, valamint protein-kináz C aktivációt eredményez. Ezek a jelátviteli folyamatok közvetlenül hozzájárulnak a simaizom-kontrakció kialakulásához, és ezáltal fokozzák a perifériás ellenállást és emelik az artériás vérnyomást.

Az AT1-mediált jelátvitel eredményeként perifériás vazokonstrikció alakul ki, fokozódik az aldoszteron-szekréció, nő a nátrium- és vízretenció, valamint aktiválódnak proliferatív és profibrotikus folyamatok. Tartós vagy túlzott RAAS-aktiváció esetén ezek a mechanizmusok hozzájárulnak a hipertónia, a bal kamrai hipertrófia, a vaszkuláris remodelling és a szívelégtelenség kialakulásához és progressziójához. A rendszer jelentősége ezért nem csupán élettani, hanem patofiziológiai szempontból is kiemelkedő.

Az ACE a RAAS kulcsenzimeként központi helyet foglal el ebben a szabályozási hálózatban. Az enzim nemcsak az angiotenzin II képződéséért felelős, hanem más vasoaktív peptidek (például a bradikinin) lebontásában is szerepet játszik, így hatása kettős: fokozza a vazokonstriktor jelátvitelt és csökkenti a vazodilatátor hatású peptidek rendelkezésre állását. Ennek következtében az ACE aktivitása közvetlenül befolyásolja a vaszkuláris tónust és a kardiovaszkuláris terhelést.

Az ACE klinikai jelentőségét jól tükrözi, hogy gátlása a modern kardiovaszkuláris terápia egyik alapkövét képezi. ACE-gátló gyógyszereket széles körben alkalmaznak artériás hipertóniában, szívelégtelenségben, miokardiális infarktus után, valamint diabéteszes és nem diabéteszes eredetű nefropátiák esetén. E készítmények mortalitáscsökkentő hatása és a

szervkárosodás progresszióját mérséklő tulajdonsága alátámasztja az ACE meghatározó szerepét a kardiovaszkuláris szabályozásban.

Mindezek alapján az ACE működése nem tekinthető izolált biokémiai lépésnek a RAAS kaszkádjában, hanem olyan központi szabályozási pontnak, amelynek aktivitása érdemben befolyásolja a keringési rendszer állapotát. Az ACE farmakológiai gátlása jól ismert és klinikailag széles körben alkalmazott stratégia; ugyanakkor az enzim endogén, fiziológiás körülmények között érvényesülő szabályozásának mechanizmusai jóval kevésbé tisztázottak. Ez a felismerés indokoltá teszi annak vizsgálatát, hogy a keringésben jelen lévő endogén tényezők milyen mértékben és milyen mechanizmuson keresztül képesek befolyásolni az ACE működését.

Az angiotenzin-konvertáló enzim endogén szabályozása és a humán szérumalbumin szerepe

Az ACE aktivitásának klinikai jelentőségét elsősorban farmakológiai gátlásán keresztül ismerjük, ugyanakkor az enzim működését fiziológiás körülmények között is befolyásolhatják a keringésben jelen lévő endogén tényezők. A szérumban mérhető ACE aktivitás nem kizárólag az enzim koncentrációjától függ, hanem a biológiai környezet összetétele is meghatározó lehet. Ebből következően az ACE funkcionális állapota a keringésben dinamikus egyensúly eredménye, amelyben a fehérje-fehérje kölcsönhatások és az oldott komponensek egyaránt szerepet játszhatnak.

Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a humán szérumalbumin (HSA) jelentős mértékben képes gátolni az ACE működését. A HSA a plazma legnagyobb koncentrációban jelen lévő fehérjéje, amely fiziológiás körülmények között nagy moláris feleslegben van jelen az ACE-hez képest. Kísérletes adatok alapján a HSA jelenléte csökkenti az ACE által katalizált szubsztrát hasítás mértékét, és ez a hatás reverzibilis módon érvényesül. A megfigyelések arra utalnak, hogy az albumin nem passzív hordozó fehérje, hanem képes közvetlenül befolyásolni az ACE enzimátikus aktivitását.

Az endogén ACE-gátlás jelensége arra hívja fel a figyelmet, hogy a RAAS működése nem kizárólag hormonális és farmakológiai mechanizmusok által szabályozott, hanem a keringő fehérjekörnyezet is moduláló szerepet tölthet be. A szérumban mért ACE-aktivitás és az enzim maximális katalitikus kapacitása közötti eltérés részben az albumin jelenlétével magyarázható, ami arra utal, hogy a keringésben az ACE funkcionálisan szabályozott állapotban van jelen.

Ugyanakkor a HSA-mediált ACE-gátlás mértéke nem minden esetben azonos, ami felveti annak lehetőségét, hogy az albumin szerkezeti és funkcionális állapota befolyásolhatja gátlókéességét. Mivel a HSA számos endogén ligandumot köt, és konformációja a kötött molekuláktól függően módosulhat, indokolt annak vizsgálata, hogy az albumin miként járul hozzá az ACE működésének finomhangolásához különböző biológiai környezetben.

Az endogén ACE-szabályozás mechanizmusának feltárása nem csupán biokémiai jelentőségű, hanem rendszer szintű következményekkel is járhat. Amennyiben a keringésben jelen lévő fehérje ligandum kölcsönhatások érdemben módosítják az ACE aktivitását, úgy a RAAS működése a metabolikus és fehérjeösszetételbeli változásokra is érzékenyen reagálhat. Ez a felismerés megalapozza annak vizsgálatát, hogy az albumin által hordozott molekulák milyen szerepet tölthetnek be az ACE endogén szabályozásában.

A HSA ligandumkötő tulajdonságai és az albuminhoz kötött zsírsavak funkcionális jelentősége

A HSA szerkezetileg rugalmas, több kötőhellyel rendelkező fehérje, amely a keringésben számos endogén és exogén molekula transzportját végzi. A molekula három doménből épül fel, amelyek több, részben átfedő ligandumkötő zsebet tartalmaznak. Klasszikusan leírt kötőhelyei közé tartozik a Sudlow I és a Sudlow II hely, amelyek különböző gyógyszer-molekulák és aromás vegyületek nagy affinitású kötéseért felelősek. A ligandumkötés a teljes fehérjeszerkezetet érintő konformációs átrendeződéssel járhat, amely más kötőhelyek affinitását is módosíthatja.

A HSA legjelentősebb endogén ligandumai közé a szabad zsírsavak (FFA-k) tartoznak. A keringésben jelen lévő FFA-k döntő többsége albuminhoz kötötten található, és egy HSA-molekula több zsírsav egyidejű megkötésére képes. Krisztallográfiás vizsgálatok alapján legalább hét fő zsírsavkötő hely azonosítható a fehérjén. Ezek közül a FA1 kötőhely különös jelentőséggel bír, mivel a Tyr-138 aminosav oldallánca egyszerre vesz részt a zsírsavkötés stabilizálásában és olyan felszíni régió kialakításában, amely fehérje-fehérje kölcsönhatások szempontjából is releváns lehet.

A zsírsavkötés a HSA konformációját is módosítja. Különböző lánchosszúságú és telítettségű zsírsavak eltérő mértékű doménelmozdulást és lokális szerkezeti átrendeződést idézhetnek elő. A ligandumkötés következtében a domének relatív orientációja változhat, ami a fehérje felszíni tulajdonságait és interakciós potenciálját is befolyásolhatja. Ennek jelentősége túlmutat a transzportfunkción, mivel a HSA így funkcionálisan modulálható fehérjeként viselkedik.

Mindezek alapján a HSA nem tekinthető passzív hordozófehérjének. A ligandumkötés révén szerkezete és felszíni jellemzői módosulhatnak, ami más fehérjékkel kialakított kölcsönhatásait is befolyásolhatja. Ez a megközelítés megalapozza annak vizsgálatát, hogy az albuminhoz kötött zsírsavak miként módosíthatják a HSA-mediált ACE-gátlás mértékét, és ezáltal milyen szerepet tölthetnek be az ACE endogén szabályozásában.

Zsírsavak a keringésben: mennyiségi és minőségi sajátosságok

A keringésben jelen lévő szabad zsírsavak döntő többsége albuminhoz kötötten található. A teljes szabadzsírsav-koncentráció azonban nem tükrözi a zsírsavösszetétel minőségi különbségeit, amelyek élettani és patofiziológiai szempontból is relevánsak lehetnek. A zsírsavprofil változása metabolikus állapottól, táplálkozástól, hormonális hatásoktól és gyulladásos folyamatoktól egyaránt függhet.

A telített zsírsavak (SFA-k), például a palmitinsav (C16:0) és a sztearinsav (C18:0), egyenes láncú szerkezetükből adódóan eltérő membránhatásokat fejthetnek ki, és bizonyos jelátviteli útvonalak aktiválásával gyulladásos és metabolikus válaszokat indukálhatnak. Kísérletes modellekben a palmitinsav képes a Toll-like receptor 4 jelátviteli útvonal aktiválására, ami NF- κ B-mediált gyulladásos génexpresszióhoz vezethet. Emellett a hosszú láncú SFA-k fokozhatják a ceramidképződést, amely az IRS–PI3K–Akt tengely gátlásán keresztül inzulinrezisztencia kialakulásához járulhat hozzá.

Az egyszeresen telítetlen zsírsavak (MUFA-k), például az olajsav (C18:1 n-9), eltérő biológiai hatásprofilot mutatnak. Egyes vizsgálatok szerint az olajsav kevésbé aktivál gyulladásos jelátviteli útvonalakat, és bizonyos körülmények között mérsékelheti a telített zsírsavak által kiváltott NF- κ B-aktivációt. Ez arra utal, hogy a telítettség mértéke funkcionális szempontból is jelentős különbségeket eredményezhet.

A többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA-k), például az α -linolénsav (ALA, C18:3 n-3), a γ -linolénsav (GLA, C18:3 n-6) vagy az arachidonsav (C20:4 n-6), több kettőskötést tartalmaznak, ami fokozott konformációs flexibilitást eredményez. Az arachidonsav a ciklooxygenáz és lipoxigenáz útvonalakon keresztül prosztaglandinok, tromboxánok és leukotriének prekursora, így közvetlenül részt vesz gyulladásos és vaszkuláris folyamatok szabályozásában. Az n-3 és n-6 PUFA-k arányának változása ezért a gyulladásos válasz és a kardiovaszkuláris homeosztázis szempontjából is jelentős lehet.

Metabolikus szindrómában és 2-es típusú diabetes mellitusban a fokozott zsírszöveti lipolízis és az inzulinrezisztencia következtében a hosszú láncú SFA-k, különösen a palmitinsav aránya emelkedhet, miközben a PUFA-arány csökkenhet. Ez a minőségi eltolódás nemcsak

sejtszintű jelátviteli folyamatokat, hanem a keringés fehérje-ligandum kölcsönhatásait is befolyásolhatja.

A zsírsavminőség tehát önálló biológiai információt hordoz. Mivel a keringő zsírsavak albuminhoz kötöttek, a zsírsavösszetétel változása a HSA szerkezeti állapotát is módosíthatja. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a zsírsavprofil nem csupán metabolikus marker, hanem az ACE endogén szabályozásában is szerepet játszó tényező lehet.

Az ACE szerkezeti és funkcionális sajátosságai

Az ACE egy cinkfüggő dipeptidil-karboxipeptidáz, amely egyetlen polipeptidláncból áll, és két homológ katalitikus domént tartalmaz: az N-domént és a C-domént. Mindkét domén önálló aktív centrummal rendelkezik, amelyben a HEMGH-motívumhoz kötődő cinkion vesz részt a katalízisben. A két domén szerkezeti hasonlósága ellenére funkcionálisan nem teljesen azonos. A C-domén elsődlegesen felelős az angiotenzin I angiotenzin II-vé történő átalakításáért, míg az N-domén bizonyos egyéb peptidszubsztrátok, például az N-acetil-seril-aszpartil-lizil-prolin lebontásában játszik meghatározó szerepet.

Az ACE fiziológiásan membránkötött formában expresszálódik, azonban a sejtfelszíni molekula extracelluláris része proteolitikus hasítással leválik, és szolubilis formában megjelenik a szérumban. A különböző szövetekben expresszálódó ACE-formák szerkezeti sajátosságai eltérhetnek, ami funkcionális variabilitást eredményezhet.

Az ACE erősen N-glikozilált fehérje, amely több potenciális glikozilációs hellyel rendelkezik. A glikánstruktúrák jelenléte és összetétele befolyásolhatja az enzim stabilitását, felszíni tulajdonságait és konformációját. A glikoziláció mintázata sejttípus- és szövetspecifikus lehet, ami hozzájárulhat a különböző biológiai forrásból származó ACE-molekulák közötti szerkezeti különbségekhez. Az enzim szerkezeti variabilitásához oxidatív módosulások és egyéb poszttranszlációs változások is hozzájárulhatnak.

Krisztallográfiás vizsgálatok alapján az ACE-domének aktív centruma dinamikus szerkezetű, amelyben az aktív centrum zsebének nyitott és zárt konformációi váltakozhatnak. Ez a konformációs flexibilitás befolyásolja a szubsztrát-hozzáférést és a katalitikus hatékonyságot. A felszíni szerkezet és az epitópok hozzáférhetősége szintén konformációfüggő lehet, ami azt jelenti, hogy az ACE funkcionális állapota nem csupán az enzim mennyiségével, hanem annak térszerkezeti sajátosságaival is összefügg.

A különböző biológiai mintákból származó ACE-formák szerkezeti és konformációs eltérései ezért érdemben befolyásolhatják az enzim aktivitását és gátlhatóságát. Ez a megközelítés megalapozza annak vizsgálatát, hogy az ACE konformációs sajátosságai miként

módosíthatják a HSA-mediált ACE-gátlás mértékét, és indokolja a konformáció-alapú vizsgálati módszerek alkalmazását.

Epitóp-specifikus ACE-fenotipizálás

Az ACE szerkezeti és konformációs sajátosságainak vizsgálatára Sergei Danilov és munkatársai egy epitóp-specifikus monoklonális antitestpanelre épülő megközelítést dolgoztak ki. A módszer alapja, hogy különböző monoklonális antitestek az ACE felszínének meghatározott epitópjaihoz kötődnek. Az egyes antitestek kötődési intenzitásának relatív mintázata az adott mintában jelen lévő ACE felszíni szerkezetéről és konformációjáról ad információt.

A vizsgálatok során alkalmazott antitestek az ACE N-doménjéhez és C-doménjéhez kapcsolódó epitópot egyaránt lefedik. Az N-doménhez kötődő antitestek közé tartozik többek között a 6C8, a 6H6 és a 2D1, míg a C-doménhez kapcsolódó antitestek közül a 1E10 és a 2H9 különös jelentőséggel bír. Ezek az antitestek eltérő felszíni régiókat ismernek fel, amelyek hozzáférhetősége és mikrokörnyezete konformációfüggő lehet.

A módszer lényege nem az ACE mennyiségének vagy abszolút aktivitásának meghatározása, hanem az antitestkötési mintázat összehasonlítása. Amennyiben az egyes epitópok relatív kötődési aránya konzisztens mintázatot mutat, az az ACE felszíni szerkezetének stabil állapotára utal. Ezzel szemben atípusos vagy eltérő mintázat esetén feltételezhető, hogy az epitópok hozzáférhetősége vagy környezete módosult, például glikozilációs eltérések vagy konformációváltozás következtében.

Ez a konformációs ujjlenyomat lehetővé teszi olyan finom szerkezeti különbségek kimutatását is, amelyek a teljes ACE-aktivitás egyszerű mérésével nem detektálhatók. A módszer különösen informatív lehet akkor, ha az ACE különböző biológiai forrásokból származik, például szérumból vagy különböző szövetekből, ahol a poszttranszlációs módosítások és a felszíni sajátosságok eltérhetnek.

Az epitóp-specifikus fenotipizálás így olyan szerkezeti információt szolgáltat, amely összekapcsolható az enzim funkcionális állapotával. Ez a megközelítés lehetőséget ad annak vizsgálatára, hogy az ACE konformációs eltérései miként befolyásolják a HSA-mediált ACE-gátlás mértékét, és hogy az endogén szabályozás érzékeny-e az enzim felszíni szerkezeti sajátosságaira.

CÉLKITŰZÉS

Az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) aktivitását a klinikai gyakorlatban elsősorban farmakológiai úton, ACE-gátló gyógyszerekkel befolyásoljuk. Ezzel szemben az ACE endogén szabályozásáról, különösen a keringésben és a szövetekben érvényesülő fiziológiás gátló mechanizmusokról, a rendelkezésre álló ismeretek korlátozottak. Korábbi eredmények igazolták, hogy a HSA reverzibilis módon képes gátolni az ACE-t, azonban a HSA-mediált ACE-gátlás mértékét meghatározó tényezők, valamint ennek élettani és szerkezeti háttere nem ismert kellő részletességgel.

Munkám átfogó célja az ACE endogén szabályozásának vizsgálata volt humán mintákban, különös tekintettel a HSA és az albuminhoz kötött zsírsavak szerepére, valamint az ACE konformációs sajátosságaira.

A vizsgálatok során az alábbi konkrét célkitűzéseket fogalmaztam meg:

- Annak vizsgálata, hogy a humán vérmintákban mérhető endogén ACE-gátlás mértéke összefüggést mutat-e a keringő szabad zsírsavak koncentrációjával.
- Az albuminhoz kötött zsírsavak szerepének tisztázása a HSA-mediált ACE-gátlás szabályozásában, különös tekintettel arra, hogy a zsírsavösszetétel befolyásolja-e a gátlás mértékét.
- Annak meghatározása, hogy az egyes zsírsavak szerkezeti sajátosságai (különösen a telítettség és a kettős kötések száma) eltérő módon módosítják-e a HSA ACE-gátló hatását.
- A HSA-mediált ACE-gátlás vizsgálata különböző szövetek esetében.
- Annak elemzése, hogy az ACE konformációs és poszttranszlációs sajátosságai befolyásolják-e a HSA által közvetített endogén gátlás mértékét.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Humán minták, vizsgálati populációk

Vizsgálatainkhoz humán vér- és szövetmintákat használtunk. A szérumszérums ACE-aktivitás és az endogén ACE-gátlás elemzéséhez 161 felnőtt személy vérmintáját vizsgáltuk, akik a Debreceni Egyetem Kardiológiai Intézetének munkatársai, illetve ambulanciáján megjelenő betegek közül kerültek bevonásra. A bevont személyek egyike sem részesült ACE-gátló kezelésben, amit anamnézis és biokémiai mérések alapján ellenőriztünk.

Az endogén ACE-gátlás és a zsírsavprofil közötti összefüggések vizsgálatához további 101 beteg szérummintáit elemeztük, amelyek diagnosztikai célú ACE-aktivitás meghatározásra érkeztek.

A vérminták feldolgozása standard aszeptikus technikával történt. A natív mintákból centrifugálást követően szérumot készítettünk, amelyet a mérésekig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltunk. Az EDTA-val alvadásgátolt mintákat DNS-izolálásig fagyaszttva tároltuk.

A szöveti ACE vizsgálatához humán tüdő-, szív- és nyirokcsomómintákat használtunk, amelyek műtéti beavatkozások során kerültek eltávolításra. A szövetmintákat homogenizáltuk, majd centrifugálást követően a felülúszókat a további vizsgálatokig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Az ACE-fenotipizálási vizsgálatokat a fenti populációk kiválasztott mintáin végeztük.

Az ACE-aktivitás fluoreszcens kinetikus meghatározása

A szérumszérums ACE-aktivitását fluoreszcens kinetikus módszerrel határoztuk meg, korábban validált és optimalizált protokoll alapján. A mérés egy szintetikus fluoreszcens szubsztrát (Abz-FRK-(Dnp)-P-OH) ACE általi hasításán alapult. Az intakt szubsztrát esetében a donor és akceptor molekulák közötti energiaátadás miatt fluoreszcencia nem detektálható, míg a hasítást követően a donor fluoreszcenciája mérhetővé válik. A fluoreszcencia intenzitásának időbeli növekedése közvetlenül arányos az ACE-aktivitással.

A méréseket $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, mikroplate alapú rendszerben végeztük. Az aktivitás meghatározásához a fluoreszcencia-idő görbe lineáris szakaszának meredekségét használtuk fel, és az ACE-aktivitást U/L egységben fejeztük ki. Minden mintát ismétlésekben, megfelelő kontrollok mellett vizsgáltunk, az eredményeket az ismételt mérések átlagaként adtuk meg.

Az ACE-aktivitás meghatározása ZPHL- és HHL-szubsztrátokkal

Az ACE-fenotipizálás során az immunprecipitált ACE-aktivitását hippuril-L-hisztidil-L-leucin (HHL) és karbobenzoxi-L-fenilalanil-L-hisztidil-L-leucin (ZPHL) szubsztrátokkal határoztuk meg, a Danilov és munkatársai által leírt módszer alapján. Az ACE által katalizált hidrolízis során felszabaduló His-Leu dipeptidet o-ftáldialdehiddel fluoreszcens származékká alakítottuk, majd a keletkező jel intenzitása alapján számítottuk az enzimaktivitást.

A ZPHL/HHL arányt az azonos mintából a két különböző szubsztráttal mért aktivitásértékek hányadosaként határoztuk meg. A méréseket párhuzamos ismétlésekben, megfelelő kontrollok mellett végeztük.

Az endogén ACE-gátlás meghatározása

Az endogén ACE-gátlás mértékét hígítási módszerrel határoztuk meg, korábban publikált eljárás alapján. A módszer azon az elven alapul, hogy a szérum hígításával az albumin-mediált, reverzibilis ACE-gátlás fokozatosan csökken, így nagy hígítás mellett az ACE-aktivitás közel gátlásmentes állapotban mérhető.

Az ACE-aktivitást alacsony és magas hígításban mértük, majd a hígítási tényezőkkel korrigált értékek arányából számítottuk az endogén ACE-gátlás százalékos mértékét. A 80%-ot meghaladó gátlás ACE-gátló gyógyszer jelenlétére utalhatott a mintában.

Szérum HSA- és szabadzsírsav-koncentráció meghatározása

A szérum HSA-koncentrációját Cobas Integra 400 Plus klinikai kémiai analizátoron, brómkrezolzöld alapú kolorimetriás módszerrel határoztuk meg, a gyártói protokollnak megfelelően. Az eredményeket g/L egységben fejeztük ki.

A szérum teljes szabadzsírsav-koncentrációját ugyanazon analizátoron, enzimatisz kolorimetriás módszerrel mértük. Az eredményeket mmol/L egységben adtuk meg.

Zsírsavmentes HSA előállítása és zsírsavakkal történő kezelése

A HSA-ról a kötött zsírsavakat aktív szén alkalmazásával távolítottuk el. Az albuminoldatot aktív szénnel inkubáltuk, majd centrifugálással eltávolítottuk a szénét. A kapott zsírsavmentes HSA-oldatot koncentráltuk, szűréssel sterilizáltuk, és a további vizsgálatok előtt meghatároztuk az albuminkoncentrációt.

A zsírsavmentes HSA-t ezt követően meghatározott zsírsavak nátriumsóival kezeltük, albumin-zsírsav komplexek előállítása céljából. A kezelést előre meghatározott moláris arányban, folyamatos keverés mellett végeztük. Az inkubációt követően a nem kötődött zsírsavakat ultrafiltrációval távolítottuk el, majd a mintákat ismételtan mostuk és visszakoncentráltuk. A végső HSA-koncentrációt minden esetben ellenőriztük.

Rekombináns humán ACE előállítása és tisztítása

A rekombináns humán ACE-t N-terminális His-taggal ellátott, rovarsejtes expresszióra optimalizált konstrukció felhasználásával állítottuk elő. A membránkötő régiót eltávolítottuk, így a fehérje szolubilis formában termelődött. A plazmidot baculovírus alapú rendszerben, Sf9 rovarsejtekben expresszáltuk. A rekombináns fehérje termelődését a sejt kultúra felülszójának ACE-aktivitásmérésével követtük, és az optimális időpontban gyűjtöttük be a mintát.

A recACE tisztítását immobilizált fémion-affinitás kromatográfiával végeztük, majd a fehérjét koncentráltuk és megfelelő pufferben, glicerol jelenlétében tároltuk a további kísérletekig.

ACE immunprecipitálása és kezelése HSA-val

Az ACE immobilizálását nagy kötőképességű ELISA lemezekon végeztük. A lemezeket kecske anti-egér IgG-vel vontuk be, anti-ACE monoklonális antitestet kapcsoltunk rá, majd a vizsgált mintákból származó ACE-t immunprecipitáltuk. Az inkubációs és mosási lépéseket standard ELISA-alapú protokoll szerint hajtottuk végre.

Az immunprecipitált ACE albumin-mediált gátlásának vizsgálatához kontroll, illetve zsírsavmentes HSA-t alkalmaztunk felező hígítási sorozatban. Az ACE-aktivitást a korábban ismertetett fluoreszcens kinetikus módszerrel határoztuk meg.

ACE-fenotipizálás monoklonális antitestekkel

Az ELISA lemezeket kecske anti-egér IgG-vel vontuk be, erre kapcsoltuk az egyes epitóp-specifikus mAb-eket, majd a vizsgált mintákból származó ACE-val inkubáltuk.

Az antitestek által megkötött ACE-aktivitást fluoreszcens kinetikus módszerrel, illetve ZPHL-szubsztrát alkalmazásával határoztuk meg. Az egyes antitestekhez tartozó relatív aktivitási mintázatokat kontroll mérésekhez viszonyítva értékeltük. A kapott kötődési és

aktivitási profil az ACE konformációs állapotáról és felszíni sajátosságairól szolgáltatott információt, beleértve a poszttranszlációs módosítások hatását is.

DNS-izolálás és teljes exom szekvenálás

Az atípusos ACE-fenotípust mutató esetekben az ACE-gént érintő genetikai eltérések kizárására vagy igazolására teljes exom szekvenálást végeztünk. A genomi DNS-t perifériás vérmintákból izoláltuk, majd a teljes exom szekvenálását és bioinformatikai elemzését külső szolgáltató végezte.

Statisztikai analízis

A koncentráció-hatás kísérletek adatait négyparaméteres logisztikai modellel illesztettük, amelyből IC_{50} értékeket és 95%-os konfidencia intervallumokat számítottunk. A különböző zsírsavakkal kezelt és zsírsavmentes HSA-minták közötti eltéréseket illesztés-összehasonlító F-teszttel értékeltük, többszörös összehasonlítás esetén p-érték korrekció alkalmazásával.

Az endogén ACE-gátlás független meghatározóit többváltozós lineáris regresszióval vizsgáltuk. A modellek illeszkedését a reziduális eloszlás és a multikollinearitás ellenőrzésével értékeltük.

Nem normál eloszlás esetén az adatokat medián és interkvartilis tartomány formájában adtuk meg, és nem paraméteres próbákat alkalmaztunk. Kategóriás változók összehasonlítására khi-négyzet próbát használtunk. A statisztikai szignifikancia határát $p < 0,05$ értéknél határoztuk meg.

Etikai engedélyek

A humán vér- és szövetminták felhasználásával végzett vizsgálatokat a Debreceni Egyetem és az Egészségügyi Tudományos Tanács illetékes kutatásetikai bizottságai hagyták jóvá (ETT TUKEB: 33327-1/2015/EKU; Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottság: 5925-2021; 4375-2015; 20753-7/2018/EÜIG).

Valamennyi eljárás a hatályos intézményi irányelveknek és a Helsinki Nyilatkozat előírásainak megfelelően történt. A vizsgálatban részt vevő személyek írásos, tájékozott beleegyező nyilatkozatot adtak mintáik kutatási célú felhasználásához.

EREDMÉNYEK

Betegcsoportok jellemzése

Az endogén ACE-gátlás és a HSA-koncentráció összefüggéseinek vizsgálatába 161 főt vontunk be (71 nő, 90 férfi). Az életkor mediánja 52,0 év [39,0–60,0], a nemek között nem volt szignifikáns különbség ($p=0,2206$). A testtömegindex medián értéke $27,2 \text{ kg/m}^2$ [24,3–30,0], szintén nem különbözött szignifikánsan a nemek között ($p=0,1219$).

A szérum kreatinin-koncentráció férfiaknál magasabb volt ($76 [64–89] \mu\text{mol/L}$), mint nőknél ($58 [49–70] \mu\text{mol/L}$; $p<0,0001$). Az eGFR medián értéke mindkét nemben meghaladta a $90 \text{ mL/perc/1,73 m}^2$ -t. Az urea (medián $4,6 [3,8–5,7] \text{ mmol/L}$; $p=0,2361$), és a bilirubin (medián $7,7 [5,5–11,0] \mu\text{mol/L}$; $p=0,5512$) tekintetében nem volt nemi különbség.

A szérum ACE-aktivitás mediánja $9,71 \text{ U/L}$ [7,61–11,34], az endogén ACE-gátlás mértéke $66,38\%$ [56,48–71,84%] volt. Sem az ACE-aktivitás ($p=0,4376$), sem az endogén ACE-gátlás ($p=0,8953$) nem különbözött a nemek között. A HSA-koncentráció medián értéke $44,0 \text{ g/L}$ [41,0–46,5], nemi eltérés nélkül ($p=0,4134$).

Hipertónia 75 esetben, diabetes mellitus 20 esetben fordult elő. A bal kamrai ejekciós frakció mediánja 59% [56–63%] volt, szignifikáns nemi különbség nélkül ($p=0,1969$).

Összességében a vizsgált populáció demográfiai és laboratóriumi jellemzői kiegyensúlyozottak voltak; a nemek közötti különbség elsősorban a kreatinin-koncentrációra korlátozódott, míg az ACE-aktivitás, az endogén ACE-gátlás és a HSA-szint nem mutatott eltérést.

Az endogén ACE-gátlás és a teljes szabadzsírsav-koncentráció összefüggéseinek elemzésébe 101 főt vontunk be (55 nő, 46 férfi). Az életkor mediánja $49,6 \text{ év}$ [39,2–65,3] volt; a nők szignifikánsan idősebbek voltak ($55,6 [42,4–67,2] \text{ év}$), mint a férfiak ($46,7 [36,3–60,1] \text{ év}$; $p=0,0167$).

A szérum ACE-aktivitás medián értéke $10,79 \text{ U/L}$ [9,80–12,75], az endogén ACE-gátlás $61,27\%$ [55,32–68,79%] volt, nemi különbség nélkül (rendre $p=0,5008$; $p=0,6084$).

A teljes szabadzsírsav-koncentráció mediánja $0,505 \text{ mmol/L}$ [0,254–0,737], a HSA-koncentráció $44,87 \text{ g/L}$ [42,02–47,40] volt; az FFA:HSA arány medián értéke $0,75$ [0,38–1,15], szintén nem mutatva nemi eltérést (rendre $p=0,3742$; $p=0,7953$).

A hsCRP medián koncentrációja $4,84 \text{ mg/L}$ [1,71–14,79] volt. A kreatinin- és urea-értékek férfiaknál magasabbnak bizonyultak (rendre $p<0,0001$; $p=0,0351$), míg az eGFR mindkét nemben $>90 \text{ mL/perc/1,73 m}^2$ volt.

Összességében az ACE-hoz kapcsolódó paraméterek, valamint a HSA- és FFA-szintek nem mutattak nemi különbséget; eltérés elsősorban az életkor és egyes vesefunkciós paraméterek tekintetében volt megfigyelhető.

A HSA-koncentráció és az endogén ACE-gátlás kapcsolata

Az endogén ACE-gátlás mértékét és a HSA-koncentrációt 161 személy szérumában határoztuk meg. A két paraméter között szoros, pozitív összefüggés volt kimutatható (Spearman $\rho=0,422$; 95% CI: 0,281–0,544; $p<0,0001$). Az alacsony illesztés alacsony r^2 értéke ($r^2=0,164$) arra utal, hogy az albumin-koncentráción túl további tényezők is befolyásolják az endogén ACE-gátlás mértékét.

Többváltozós lineáris regresszióban, életkorra és nemre korrigálva ($n=161$), a HSA-koncentráció továbbra is független, pozitív kapcsolatot mutatott az endogén ACE-gátlással ($F(3,157)=11,60$; $p<0,0001$; $r^2=0,1815$).

A klinikai kovariánsokat is tartalmazó almintán ($n=87$) az összefüggés fennmaradt ($F(5,81)=3,782$; $p=0,0040$; $r^2=0,1893$). A bilirubint is tartalmazó, kisebb elemszámú modell ($n=64$) nem bizonyult szignifikánsnak ($p=0,1578$).

Az ACE-gátlás zsírsavak jelenlétében és hiányában

A klinikai gyakorlatban alkalmazott albuminkészítményeket jellemzően dialízissel tisztítják, amely során a vízzoldékony komponensek eltávolításra kerülnek, míg a vízben nem oldódó, albuminhoz kötött molekulák megmaradnak. Az ilyen módon dializált HSA a rekombináns ACE aktivitását koncentrációfüggő módon csökkentette ($IC_{50}=7,84$ [6,58–9,75] g/L), és fiziológiás albuminkoncentráción közel teljes gátlást eredményezett ($\approx 90\%$ gátlás 45 g/L mellett).

Ezzel szemben az aktív szénnel zsírsavmentesített HSA ACE-gátló hatása szignifikánsan gyengébb volt ($IC_{50}=23,24$ [19,40–29,78] g/L; $p<0,001$; Holm–Šidák-korrektúra után $p=0,001$), és 45 g/L koncentráción az ACE-aktivitás mintegy 41%-a megmaradt.

A szérum FFA-koncentráció és az endogén ACE-gátlás közötti kapcsolat vizsgálata

A szérum teljes szabadzsírsav-koncentrációját és az endogén ACE-gátlás mértékét 101 személy esetében elemeztük. A két paraméter között nem volt kimutatható szignifikáns

összefüggés (Spearman $p=0,088$; $p=0,380$; $r^2=0,008$), ami arra utal, hogy az endogén ACE-gátlás mértékét a teljes FFA-koncentráció önmagában nem határozza meg.

Az eredmény többváltozós lineáris regressziós modellekben is fennmaradt. Életkorra, nemre és HSA-koncentrációra korrigálva ($n=101$) a teljes FFA-koncentráció nem mutatott önálló kapcsolatot az endogén ACE-gátlással ($p=0,863$). További kovariánsok bevonásával végzett érzékenységi elemzésekben, beleértve a hsCRP-t, eGFR-t és a teljes bilirubinszintet, az összefüggés továbbra sem volt kimutatható.

A telített zsírsavak szénláncosságának szerepe a HSA-mediált ACE-gátlásban

Azt vizsgáltuk, hogy a zsírsavak minősége befolyásolja-e a HSA-mediált ACE-gátlás mértékét. Zsírsavmentes albumint különböző telített zsírsavakkal kezeltünk, majd az albumin-zsírsav komplexek ACE-gátló hatását elemeztük.

A dodekánsavval (C12:0) kezelt HSA gátló hatása nem különbözött szignifikánsan a zsírsavmentes albuminétól ($IC_{50}=18,69$ [15,36–24,97] g/L vs. 23,24 [19,40–29,78] g/L; $p=0,170$). Ezzel szemben a mirisztinsav (C14:0) csökkentette az IC_{50} értéket (13,26 [10,19–19,86] g/L; $p=0,006$), míg a sztearinsav (C18:0) további jelentős fokozódást eredményezett ($IC_{50}=7,98$ [7,04–9,23] g/L; $p<0,001$). Fiziológias, 45 g/L HSA-koncentráción az ACE-gátlás mértéke C18:0 esetén $87,4\pm0,6\%$ volt, szemben a zsírsavmentes HSA $59,4\pm1,4\%$ -os gátlásával.

A 6–22 szénatomszámú telített zsírsavak szisztematikus vizsgálata során az ACE-gátlás mértéke a szénláncosság növekedésével emelkedett, az IC_{50} értékek pedig csökkentek. A legerőteljesebb hatás C18:0 esetében volt megfigyelhető, míg rövidebb láncú zsírsavak, például a kaprinsav (C10:0), nem okoztak érdemi változást ($59,0\pm0,5\%$; $p=0,468$) a zsírsavmentes HSA-hoz képest. A C18:0-nál hosszabb láncú zsírsavak esetében az IC_{50} értékek enyhén emelkedtek.

Eredményeink alapján a telített zsírsavak szénláncossága meghatározó tényezője a HSA-mediált ACE-gátlás mértékének, és a hatás egy optimális láncosság körül érvényesül a legerősebben.

A telítetlen zsírsavak szerkezeti sajátosságai és a HSA-mediált ACE-gátlás kapcsolata

Azt vizsgáltuk, hogy azonos szénláncosság mellett a kettős kötés jelenléte és konfigurációja befolyásolja-e a HSA-mediált ACE-gátlást. C18 szénatomszámú, egyszeresen telítetlen zsírsavakat hasonlítottunk össze a sztearinsavval (C18:0).

Az n-7 pozícióban transz kettős kötést tartalmazó, de lineáris szerkezetű elaidinsav (C18:1 n-7t) esetén a gátló hatás csökkent ($IC_{50}=10,74$ [9,71–12,05] g/L; 45 g/L HSA-nál $80,7\pm0,7\%$), szemben a sztearinsavval ($IC_{50}=7,98$ [7,04–9,23] g/L; $87,4\pm0,6\%$; $p=0,001$).

Az azonos pozícióban cisz konfigurációjú, már hajlított szerkezetű vakcénsav (C18:1 n-7) nem okozott szignifikáns eltérést ($IC_{50}=8,70$ [7,85–9,79] g/L; $84,3\pm0,7\%$; $p=0,317$).

Ezzel szemben az n-9 pozícióban markánsabb térbeli törést okozó cisz kettős kötést tartalmazó olajsav (C18:1 n-9) jelentősen emelte a HSA ACE-gátló hatását ($IC_{50}=11,61$ [10,35–13,28] g/L; $80,1\pm1,7\%$; $p<0,001$).

Eredményeink alapján nem csupán a szénlánc hossz, hanem a kettős kötés jelenléte és térbeli elhelyezkedése is meghatározza a HSA-mediált ACE-gátlás mértékét.

A többszörösen telítetlen zsírsavak szerepe a HSA-mediált ACE-gátlásban

A többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA-k) hatását zsírsavmentes HSA különböző omega-3 és omega-6 zsírsavakkal történő kezelésével vizsgáltuk.

Az omega-3 zsírsavak közül az α -linolénsav (ALA, C18:3 n-3) fejtette ki a legerőteljesebb hatást ($IC_{50}=5,60$ [4,28–6,15] g/L; 45 g/L HSA-nál $89,0\pm0,3\%$; $p<0,001$). A dokozahexaénsav (DHA, C22:6 n-3) szintén szignifikánsan fokozta a gátlást ($IC_{50}=12,02$ [9,86–15,06] g/L; $82,6\pm0,9\%$; $p<0,001$), míg az eikozapentaénsav (EPA, C20:5 n-3) nem okozott szignifikáns eltérést ($IC_{50}=16,56$ [13,00–24,22] g/L; $78,9\pm0,9\%$; $p=0,059$).

Az omega-6 zsírsavak közül a γ -linolénsav (GLA, C18:3 n-6) mutatta a legerősebb hatást ($IC_{50}=5,09$ [4,28–6,15] g/L; $91,7\pm0,2\%$; $p<0,001$). Az eikozadiénsav (EDA, C20:2 n-6) és a linolsav (LA, C18:2 n-6) szintén fokozta a HSA-mediált ACE-gátlást, de kisebb mértékben (EDA: $IC_{50}=14,41$ [11,79–19,06] g/L; $76,1\pm1,7\%$; LA: $IC_{50}=15,04$ [13,55–17,00] g/L; $72,8\pm1,3\%$).

A zsírsavfüggő ACE-gátlás vizsgálata szöveti eredetű ACE esetében

Vizsgáltuk, hogy a HSA által közvetített, zsírsavfüggő ACE-gátlás kimutatható-e szöveti eredetű ACE esetében. Humán tüdő-, nyirokcsomó- és szívsvövet-homogenizátumokból származó ACE-t immobilizáltunk, majd a méréseket zsírsavakat hordozó, illetve zsírsavmentes HSA jelenlétében végeztük.

Tüdőeredetű ACE esetén a zsírsavakat tartalmazó HSA szignifikánsan erősebb gátlást eredményezett ($IC_{50}=5,52$ [4,07–7,90] g/L; 45 g/L-nél $88,6\pm2,1\%$), mint a zsírsavmentes HSA ($IC_{50}=19,55$ [14,55–32,86] g/L; $66,7\pm5,2\%$; $p<0,001$).

Nyirokcsomó-eredetű ACE esetében hasonló mintázat volt megfigyelhető (zsírsavas HSA: $IC_{50}=5,52$ [4,08–8,35] g/L; $86,0\pm1,6\%$; zsírsavmentes HSA: $IC_{50}=13,40$ [7,99–128,90] g/L; $71,7\pm1,2\%$; $p=0,019$).

Szívszövetből származó ACE esetében a különbség különösen kifejezett volt (zsírsavas HSA: $IC_{50}=1,69$ [1,36–2,03] g/L; $84,7\pm1,2\%$; zsírsavmentes HSA: $IC_{50}=7,59$ [5,01–17,38] g/L; $54,41\pm3,2\%$; $p<0,001$).

Eredményeink alapján a zsírsavfüggő, HSA-mediált ACE-gátlás nemcsak rekombináns, hanem különböző humán szövetekből származó ACE esetében is kimutatható.

A szérum és szöveti ACE fenotípusának összehasonlítása párosított mintákban

A szérum- és tüdőeredetű ACE-fenotípust 18 olyan beteg esetében hasonlítottuk össze, akiknél párosított minták álltak rendelkezésre, és nem részesültek ACE-gátló kezelésben.

Az ACE-fenotipizálást epitóp-specifikus monoklonális antitestekkel végeztük, és az egyes antitestek által rögzített ACE-aktivitás relatív mintázatát tekintettük az adott minta fenotípusának. A funkcionális jellemzés során meghatároztuk a ZPHL/HHL hidrolízisarányt is, amely a domének relatív aktivitásának érzékeny indikátora.

A legtöbb esetben a szérum- és tüdőminták fenotípusos mintázata hasonló volt. Izolált, egy-egy epitópot érintő eltérések előfordultak, de ezek nem jártak együtt a ZPHL/HHL arány változásával.

Ettől eltérő, konzisztens fenotípuseltérés egyetlen esetben (S13) volt megfigyelhető, ahol a tüdőmintában több epitóp kötődési aránya és a ZPHL/HHL aktivitásarány egyidejű eltérése volt kimutatható, míg a párosított szérumminta nem mutatott hasonló változást.

Az S13 beteg tüdőmintájából származó ACE részletesebb jellemzésére kiterjesztett konformációs fingerprinting vizsgálatot végeztünk. Az ACE-aktivitást 20 különböző epitópra irányuló monoklonális antitesttel precipitáltuk, majd a kötődési arányokat kontroll tüdőmintákhoz hasonlítottuk.

Az S13 tüdőmintájában több antitest esetén eltérő precipitációs profil volt megfigyelhető, és a változások az ACE N- és C-doménjének több, egymástól térben elkülönülő régióját érintették. Különösen a 2H9/2D1 epitóp-arány mutatott kifejezett emelkedést a kontrollokhoz képest.

A HSA-mediált ACE-gátlás eltérései atípusos ACE-fenotípus esetén

Az S13 beteg atípusos ACE-fenotípust mutató tüdőmintájában azt vizsgáltuk, hogy a felszíni konformációs eltérések befolyásolják-e a HSA-mediált ACE-gátlást. Az

immunprecipitált ACE aktivitását zsírsavakat hordozó, illetve zsírsavmentes HSA jelenlétében határoztuk meg, és az eredményeket típusos fenotípusú kontrollmintákhoz viszonyítottuk.

A kontrollmintákban a zsírsavakat tartalmazó HSA koncentrációfüggő módon kifejezettebb ACE-gátlást eredményezett, mint a zsírsavmentes HSA.

Ezzel szemben az S13 tüdőmintájában a zsírsavakat hordozó HSA gátló hatása mérsékeltebb volt, és a zsírsavas és zsírsavmentes HSA közötti különbség jelentősen csökkent, illetve részben eltűnt.

Az eredmények arra utalnak, hogy az atípusos ACE-fenotípus módosíthatja a HSA által közvetített, zsírsavfüggő ACE-gátlás mértékét.

Az atípusos ACE-fenotípus genetikai hátterének vizsgálata

Az S13 beteg esetében teljes exom szekvenálást végeztünk annak tisztázására, hogy az atípusos ACE-fenotípus és a módosult HSA-mediált ACE-gátlás genetikai eredetű-e.

Az ACE-gén kódoló régiójában nem azonosítottunk olyan variánst, amely aminosavcserével járna vagy az ACE elsődleges szerkezetét érdemben befolyásolná, így az atípusos fenotípus nem volt magyarázható az enzim strukturális mutációjával.

Az S13 beteg genomjában a referencia-szekvenciához képest több mint 10000 variánst detektáltunk, ezek közül 1381 potenciálisan káros misszensz mutáció a PolyPhen-2 HVAR pontszám alapján, valamint 641 exoni nonszensz mutáció vagy inzerció/delécio. A variánsokat 16, atípusos ACE-fenotípust nem mutató, teljes exom szekvenálással vizsgált egyén adataival összevetve mintegy 1700, valószínűleg véletlenszerűen előforduló potenciálisan káros variánst zártunk ki, és több mint 200 génváltozat maradt fenn, amelyek elméletileg hozzájárulhatnak a fenotípus kialakulásához.

A konformációs fingerprinting alapján az S13 tüdőmintájában több, egymástól független epitóp régió érintett volt, különösen az N-domén C-terminális részéhez kötődő 6H6, 2D1 és 6C8, valamint a C-domén N-terminális régiójához kapcsolódó 1E10 és 2H9 epitópok. Ez több régiót érintő, komplex felszíni átrendeződésre utal.

A genetikai adatok értelmezése során előtérbe kerültek olyan, kis méretű fehérjéket kódoló gének, amelyek termékei potenciálisan képesek lehetnek az ACE N- és C-doménje közötti hasadáknak kötődni és az epitóp-hozzáférhetőséget módosítani. A fennmaradó variánsok között gyulladásos válaszhoz, lizoszomális működéshez és extracelluláris fehérjefeldolgozáshoz kapcsolódó gének is szerepeltek.

A leginkább relevánsnak tekintett variánsok közé tartozott a SAA1 rs1136747 (V75A), az ADAMTSL4 rs199599791 (R87P), a NOD2 rs2066844 (R702W), valamint az SMPD1

rs550365194 variánsa, amely három aminosavat érintő in-frame delécióval járt. Ezek a variánsok heterozigóta formában, együttesen voltak jelen az S13 betegben, és ilyen kombináció más vizsgált egyénben nem fordult elő.

DISZKUSSZIÓ

A kardiovaszkuláris mortalitás globális terhe továbbra is kiemelkedő, és az ACE farmakológiai gátlása évtizedek óta bizonyítottan csökkenti a kardiovaszkuláris események kockázatát. Korábbi munkáinkban kimutattuk, hogy a keringő ACE aktivitása a humán szérumalbumin (HSA) által jelentős mértékű endogén gátlás alatt áll, és hogy ennek az endogén gátlásnak a hiánya vagy csökkenése hozzájárulhat a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásához. A jelen vizsgálat eredményei ezt az összefüggésrendszert tovább árnyalják azáltal, hogy igazolják: az endogén ACE-gátlás mértéke szoros kapcsolatban áll a HSA koncentrációjával, ugyanakkor az alacsony illeszkedési érték arra utal, hogy az albumin mennyisége önmagában nem magyarázza teljes mértékben az ACE-gátlás variabilitását. Ezt a megfigyelést erősíti az a tény, hogy a szérum teljes szabadzsírsav-koncentrációja (FFA) nem mutatott kapcsolatot az endogén ACE-gátlás mértékével, ami arra utal, hogy nem a zsírsavak mennyisége, hanem azok minősége lehet meghatározó az albumin-ACE kölcsönhatás szabályozásában.

Az in vitro kísérletek eredményei egyértelműen alátámasztják ezt az értelmezést, mivel a HSA zsírsavmentesítése jelentősen csökkentette az ACE-gátló hatást, míg egyes albuminhoz kötött zsírsavak ezt kifejezetten fokozták. A HSA jól ismert, sokkötőhelyes transzportfehérje, amely különböző affinitású zsírsavkötő helyein keresztül jelentős konformációs változásokon megy keresztül ligandumkötés hatására. Eredményeink szerint a hosszú szénláncú telített zsírsavak, különösen a palmitinsav (C16:0) és a sztearinsav (C18:0), valamint egyes többszörösen telítetlen zsírsavak, így az α -linolénsav (ALA, C18:3 n-3), és a γ -linolénsav (GLA, C18:3 n-6) jelentősen növelték a HSA-mediált ACE-gátlás mértékét. Ezek a megfigyelések illeszkednek azokhoz a szerkezeti adatokhoz, amelyek szerint a FA1 kötőhelyhez tartozó Tyr-138 aminosav egyszerre játszik szerepet a zsírsavkötésben és az ACE-hez való kapcsolódás kialakításában, továbbá, hogy az albumin egy másik, ACE-hez kötődő régiója átfedést mutat a Sudlow I kötőhellyel. Mindez mechanisztikus alapot szolgáltat arra, hogy az albuminhoz kötött zsírsavak típusa közvetlenül befolyásolja a HSA-ACE interakció hatékonyságát. A jelen eredmények alapján a HSA nem csupán passzív hordozófehérjeként értelmezhető, hanem olyan dinamikus szabályozó elemként, amelynek ACE-gátló kapacitását

az aktuális metabolikus és lipidkörnyezet finoman modulálja. Ez a megközelítés azt sugallja, hogy az endogén ACE-gátlás a szervezet anyagsere-állapotához adaptívan igazodó, rugalmas szabályozó mechanizmus lehet.

A telített zsírsavakkal végzett kísérletek egyik lényeges tanulsága, hogy a HSA-mediált ACE-gátlás mértéke nem bináris módon, hanem finoman hangolt szerkezeti paraméterek függvényében változik. A szénláncossz fokozatos növekedésével párhuzamosan megfigyelt, egyre erőteljesebb ACE-gátló hatás arra utal, hogy a HSA konformációs állapotának módosulása nem pusztán a zsírsavkötés jelenlétéhez, hanem annak geometriai és térkitöltési sajátosságaihoz is kötődik. A hosszabb szénláncú zsírsavak stabilabban és mélyebben foglalják el a nagy affinitású zsírsavkötő zsebeket, ami az albumin globális konformációjának átrendeződését indukálhat, és ezáltal befolyásolhatja az ACE-hoz való kölcsönhatásban részt vevő felszíni régiók hozzáférhetőségét vagy orientációját. Ez megfelel annak a szemléletnek, miszerint az albumin ligandkötés által módosuló konformációs állapotai funkcionális következményekkel járhatnak, és aktív szabályozó szerepet tölthetnek be fehérje-fehérje interakciókban.

Ezt a szerkezeti érzékenységet tovább árnyalják a telítetlen zsírsavak vizsgálatának eredményei, miszerint az ACE-gátlás mértékét nem kizárólag a telítetlenség ténye, hanem annak konfigurációja és a kettős kötés pozíciója határozza meg. Az elaidinsav (C18:1 n-7t) közel lineáris szerkezete ellenére gyengébb gátló hatást fejtett ki, mint a sztearinsav (C18:0), míg a cisz konfigurációjú vakcénsav (C18:1 n-7) esetében az ACE-gátlás megmaradt a telített zsírsavakra jellemző tartományban. Ezzel szemben az olajsav (C18:1 n-9) fokozottabb térbeli törést okozó szerkezete már egyértelműen csökkentette a HSA ACE-gátló képességét. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az albumin ACE-hoz való kapcsolódását nem kizárólag a ligandum jelenléte, hanem annak albuminkonformációt módosító hatása határozza meg. Ez megegyezik korábbi szerkezeti adatokkal, amelyek szerint a zsírsavkötés helye és módja eltérő allosztérikus hatásokat közvetít az albumin felszínén.

Különösen figyelemre méltó, hogy a többszörösen telítetlen zsírsavak csoportján belül is jelentős heterogenitás volt megfigyelhető. Az ALA (C18:3 n-3) és a GLA (C18:3 n-6) kifejezetten erőteljes ACE-gátló hatást eredményezett, amely meghaladta a telített zsírsavakét is, míg más PUFA-k, például az EPA (C20:5 n-3), lényegesen kisebb vagy elhanyagolható hatást mutattak. Ez a megfigyelés tovább erősíti azt a koncepciót, hogy a HSA nem passzív hordozóként, hanem aktív regulátorként vesz részt az ACE működésének finomhangolásában, mégpedig a hozzá kötődő zsírsavak minősége révén. Klinikai szempontból ez különösen érdekes annak fényében, hogy az α -linolénsavban gazdag étrendi módosítások

vérnyomáscsökkentő hatását humán vizsgálatok és metaanalízisek is alátámasztják, bár az ACE-gátláson keresztül megvalósuló mechanizmus eddig közvetlenül nem került igazolásra.

A humán szérummintákban mért teljes szabadzsírsav-koncentráció nem mutatott kapcsolatot az endogén ACE-gátlás mértékével, ami első látásra ellentmondhat az in vitro eredményeknek. Ez az eltérés azonban jól értelmezhető, ha figyelembe vesszük, hogy az albuminhoz kötött zsírsavak minőségi összetétele és kötődési mintázata sokkal meghatározóbb lehet, mint azok abszolút mennyisége. A keringésben jelen lévő zsírsavak összkoncentrációja elfedheti az egyes molekulák eltérő strukturális és funkcionális hatásait, különösen olyan rendszerben, ahol az ACE-gátlás albuminfüggő és konformációérzékeny módon valósul meg. Ez a felismerés kiegészíti a klasszikus RAAS-szabályozási modelleket, és egy olyan szabályozási szintet vet fel, amelyben az anyagcsere-állapot és a fehérje-ligandum kölcsönhatások közvetlenül befolyásolhatják az ACE aktivitását.

Érdemes kiemelni, hogy az ALA és (C18:3 n-3) és a GLA (C18:3 n-6) által kiváltott erőteljes HSA-mediált ACE-gátlás nem feltétlenül áll ellentmondásban azzal a klinikai tapasztalattal, miszerint az omega-3 zsírsavak rutinszerű pótlása nem jár egyértelmű kardiovaszkuláris előnnyel. Eredményeink alapján elképzelhető, hogy az albuminhoz kötött zsírsavak szerkezeti sajátosságai, valamint az általuk kiváltott albumin-konformációk finom különbségei meghatározóbbak, mint az omega-3 csoportba tartozás önmagában. Ez a szempont hozzájárulhat ahhoz, hogy miért mutatnak eltérő klinikai hatást az egyes, szerkezetileg rokon zsírsavak.

A szöveti ACE-n végzett kísérletek tovább erősítik azt a következtetést, hogy a HSA-mediált, zsírsavfüggő ACE-gátlás nem korlátozódik a keringő enzimre. A tüdő-, szív- és nyirokcsomószövetből származó ACE esetében megfigyelt hasonló mintázat arra utal, hogy az albumin képes az intersticiális térben és a szöveti mikrokörnyezetben is funkcionális szabályozó szerepet betölteni. Mivel a lokális angiotenzin II-képződés jelentős mértékben hozzájárul mind a hemodinamikai szabályozáshoz, mind a szöveti remodellinghez és gyulladásos folyamatokhoz, ezek az eredmények túlmutatnak a keringő RAAS klasszikus értelmezésén.

E ponton a zsírsavak által módosított HSA-ACE kölcsönhatás értelmezése természetes módon veti fel azt a kérdést, hogy az ACE felszíni szerkezeti állapotának egyéni vagy szövet-specifikus eltérései miként befolyásolhatják ezt a szabályozást. Mivel az ACE nagymértékben glikozilált fehérje, és poszttranszlációs módosításai adott esetekben befolyásolhatják mind a fehérje-fehérje interakciókat, mind az epitóp-hozzáférhetőséget, feltételezhető, hogy az albumin által közvetített gátlás hatékonysága nemcsak az albumin, hanem az ACE konformációs állapotától is függ.

A fenotipizálási vizsgálatok az endogén ACE-gátlás szerkezeti hátterét vizsgálják, és ezáltal értelmezési keretet adnak a zsírsavakkal végzett kísérletek eredményeihez. A párosított szérum- és tüdőminták elemzése alapján az esetek döntő többségében a keringő és a szöveti ACE fenotípusos mintázata összehangolt maradt, még akkor is, ha az ACE-aktivitás abszolút értékei eltértek a két kompartment között.

Az S13 beteg tüdőmintájában azonosított atípusos ACE-fenotípus nem a szöveti ACE-fenotípusok fiziológiás variabilitásának egyszerű szélső értékeként értelmezhető, hanem egy olyan, ritka eset, amelyben az ACE felszíni szerkezetét érintő módosulások már a fenotipizálás szintjén is egyértelműen elkülönülő mintázatot eredményeznek. Az S13 tüdőmintájában több, egymástól független epitópra irányuló mAb kötődése, valamint funkcionális paraméterek egyidejű, következetes eltérése volt megfigyelhető.

Az S13 beteg tüdőszövetén végzett konformációs fingerprinting során észlelt eltérések különösen az N-domén C-terminális régióját érintő epitópok (6H6, 2D1, 6C8), valamint a C-domén N-terminális részén elhelyezkedő epitópok (1E10, 2H9) esetében voltak kifejezettek, ami arra utal, hogy az N- és C-domén határterületének szerkezeti környezete módosult. Ez összhangban áll azokkal a korábbi megfigyelésekkel, amelyek szerint ez a régió különösen érzékeny a poszttranszlációs módosításokra és fehérje-fehérje kölcsönhatásokra, és kulcsszerepet játszik az ACE funkcionális szabályozásában.

Az S13 tüdőmintájában megfigyelt, emelkedett 2H9/2D1 kötődési arány arra utal, hogy az ACE szialilációs állapota ebben a szöveti környezetben eltér a keringő formától. Tekintettel arra, hogy a 2D1 antitest kötődése különösen érzékeny a szialiláció mértékére, ezek az adatok azt valószínűsítik, hogy az atípusos fenotípus kialakulásában az ACE felszíni mikrokörnyezetét érintő poszttranszlációs módosulások játszhatnak szerepet. Ezek a módosulások az epitóp-hozzáférhetőség arányain keresztül jelennek meg, és ezáltal módosítják a konformációs fingerprintet. Ez egyezik azzal a koncepcióval, hogy az ACE funkcionális heterogenitását a genetikai tényezők mellett a szövet-specifikus poszttranszlációs szabályozás is alakítja.

A konformációs eltérések funkcionális következményekkel jártak az ACE és a HSA közötti kölcsönhatás szempontjából is. Az S13 beteg tüdőmintájában a HSA által közvetített ACE-gátlás mintázata jelentősen eltért a típusos fenotípusú kontrollmintákban megfigyelttől, különösen a zsírsavakat hordozó albumin esetében. Ez közvetlen kapcsolatot teremt az ACE felszíni szerkezeti állapota és az albumin, illetve az albuminhoz kötött ligandumok szabályozó hatása között, és alátámasztja azt az elképzelést, hogy az endogén ACE-gátlás hatékonysága nemcsak az albumin, hanem az ACE konformációs állapotától is függ.

A megfigyelt különbség nem magyarázható az ACE mennyiségi eltéréseivel vagy az immunprecipitáció hatékonyságának változásával, mivel az aktivitásmérések normalizált

körülmények között történtek, és a kontroll- és atípusos minták összehasonlítása azonos módszertani feltételek mellett zajlott. Ennek alapján valószínűsíthető, hogy az atípusos ACE-fenotípus hátterében olyan szerkezeti vagy konformációs sajátosság áll, amely közvetlenül befolyásolja az ACE és a HSA közötti funkcionális kölcsönhatást, különösen a zsírsavakat hordozó HSA esetében.

Megállapítható, hogy a HSA-mediált ACE-gátlás mértéke nem kizárólag az albumin ligandumtartalmától függ, hanem érzékenyen reagál az ACE felszíni szerkezeti állapotára is. Az atípusos ACE-fenotípus esetében megfigyelt, csökkent zsírsavfüggő gátlás azt jelzi, hogy az ACE konformációs eltérései képesek módosítani az albuminhoz kötött zsírsavak szabályozó hatását, ami a szöveti környezetben megvalósuló endogén gátlás heterogenitásához is hozzájárulhat.

Az a tény, hogy az atípusos fenotípus konzekvensen a szöveti ACE felszíni szerkezetéhez köthető, szükségszerűen felvetette a genetikai háttér részletesebb vizsgálatának igényét. A teljes exom szekvenálás eredményei kizárták az ACE elsődleges szerkezetét érintő mutációk szerepét, valamint nem igazoltak loss-of-function eltérést ismert ACE-kötő fehérjék génjeiben sem. Ezek az adatok együttesen arra terelték a gondolatot, hogy az atípusos fenotípus hátterében nem közvetlen genetikai ACE-hiba, hanem az enzim felszíni mikrokörnyezetét módosító tényezők állhatnak. Ezek alapján ilyen tényező lehet egy kis méretű, körülbelül 10–30 kDa molekulatömegű ACE-kötő fehérje, amely az N- és C-domén közötti hasadékból megkötődve kompetitíven gátolhatja az albumin kötődését, és ezáltal egyszerre befolyásolhatja az epitóphozzáférhetőséget és az ACE katalitikus tulajdonságait.

Ezt a koncepciót erősíti a Gaucher-betegségben vizsgált lép-ACE fenotípusával mutatott párhuzam, ahol az albumin ACE-gátló hatása szintén megszűnt, és a konformációs fingerprint inverz mintázatot mutatott a doménhatárhoz közeli epitópok esetében. A két állapot közötti hasonlóság arra utal, hogy a domének közötti hasadék funkcionális szabályozó térként viselkedhet, amelyet, ha különböző, szövet- vagy kórállapot specifikus fehérjék elfoglalnak az az ACE működésének mélyreható módosulásához vezethet.

A genetikai háttér részletesebb elemzése tovább árnyalja az atípusos ACE-fenotípus lehetséges mechanizmusait. A teljes exom szekvenálás során azonosított variánsok közül több olyan gén is érintett volt, amelyek heterozigóta formában, együttesen fordultak elő az S13 betegben, és más vizsgált egyéneknél nem voltak jelen. Ezen variánsok közé tartozott az SMPD1 gén rs550365194 jelű, három aminosavat érintő in-frame deléciója, amely az enzimatisz aktivitás szempontjából potenciálisan káros hatású eltérésnek tekinthető.

Az SMPD1 által kódolt savi szfingomielináz központi szerepet játszik a szfingomielin-ceramid anyagcsere szabályozásában, és e gén funkciózavarai jól ismert lizoszomális tárolási

betegségekhez, köztük a Niemann–Pick szindrómához kapcsolódnak. Bár az S13 beteg esetében klinikailag manifeszt Niemann–Pick-betegség nem igazolódott, az SMPD1 génben azonosított strukturális eltérés olyan lizoszomális diszreguláció irányába mutat, amelyhez korábbi irodalmi adatok alapján a CCL18/PARC kemokin fokozott termelődése és felszaporodása társulhat.

Ez az összefüggés különösen releváns annak fényében, hogy a CCL18/PARC kis molekulatömegű (7,9–10 kDa), szekretált fehérje, amely térbeli és méretbeli sajátosságai alapján alkalmas lehet az ACE N- és C-doménjei közötti hasadék régiójában való kötődésre.

Kimutatták, hogy Gaucher-kórban is megemelkedik a CCL18 szint. Kísérletes vizsgálatainkban, amelyben tüdőmintákat normál lép és CCL18-at tartalmazó Gaucher lép mintákkal inkubáltunk azt láttuk, hogy a CCL18 képes volt befolyásolni az ACE funkcionális paramétereit, és így reális jelöltként merül fel egy új, eddig nem klasszikusan leírt ACE-kötő fehérjeként. Ennek megfelelően az S13 beteg ACE-fenotípusa olyan modellként értelmezhető, amelyben több, egymást erősítő genetikai eltérés következtében megváltozott fehérje-mikrokörnyezet alakul ki, és ez vezet az ACE felszíni konformációjának, albumin-kötésének és endogén gátlásának együttes módosulásához.

Eredményeink új értelmezési lehetőséget adnak az ACE endogén szabályozásához, ugyanakkor a következtetések levonásakor figyelembe kell venni a vizsgálat módszertani és beteganyaghoz kapcsolódó korlátait. A humán szérummintákban az endogén ACE-gátlást hígítási módszerrel határoztuk meg, amely alkalmas a minták közötti relatív különbségek vizsgálatára, de a hígítatlan szérumban fennálló gátlás mértékét közvetlenül nem méri. A klinikai mintákban a teljes szabadzsírsav-koncentrációt határoztuk meg, amely nem ad információt az albuminhoz kötött zsírsavak pontos minőségi összetételéről. Az in vitro HSA-kezelések értelmezésénél további szempont, hogy az aktív szén zsírsavmentesítés más hidrofób, albuminhoz kötött ligandok eltávolításával is járhat.

A klinikai minták heterogén beteganyagot képviseltek, ezért elsősorban a HSA-koncentráció, a teljes FFA-koncentráció és az endogén ACE-gátlás közötti kapcsolatok értékelésére voltak alkalmasak. A szöveti vizsgálatok sebészeti beavatkozásokból származó humán mintákon alapultak, így az egyes társbetegségek hatása teljes mértékben nem zárható ki. Mivel azonban az összehasonlítások azonos szöveti homogenizátumon belül történtek, az eredmények elsősorban a zsírsavakat hordozó és a zsírsavmentes HSA közötti relatív különbségeket jelzik. Az S13 beteg vizsgálata nem az atípusos ACE-fenotípus gyakoriságáról ad információt, hanem azt mutatja meg, hogy az ACE felszíni szerkezeti állapotának eltérése jelentősen módosíthatja a HSA-mediált endogén ACE-gátlást.

A további vizsgálatok egyik fontos iránya olyan célzott klinikai mintagyűjtés lehet, amelyben az endogén ACE-gátlás meghatározása mellett az albuminhoz kötött zsírsavak összetétele is részletesen mérhető. Ez segíthet tisztázni, hogy a teljes FFA-koncentráció helyett az egyes zsírsavak relatív aránya, albuminkötött frakciója vagy kötődési mintázata mutat-e szorosabb kapcsolatot az ACE-gátlás mértékével. Emellett az ACE-fenotipizálás nagyobb betegpopulációkban történő alkalmazása választ adhat arra, hogy az atípusos felszíni mintázatok előfordulnak-e más betegekben is, és összefüggnek-e az endogén ACE-gátlás vagy klinikai jellemzők változásával.

Összességében eredményeink azt mutatják, hogy az endogén ACE-gátlás többszintű, konformációérzékeny szabályozási folyamat, amelyet az albuminhoz kötött zsírsavak minőségi összetétele és az ACE felszíni szerkezeti állapota egyaránt befolyásol. A klinikai és kísérletes adatok együttesen alátámasztják, hogy a HSA nem csupán transzportfehérjeként értelmezhető, hanem az ACE működését szabályozó fehérjeként is, amelynek hatása az aktuális metabolikus és szöveti mikrokörnyezet függvényében változhat. Mindez új szempontot ad az ACE-aktivitás biokémiai és klinikai értelmezéséhez.

A doktori értekezésben bemutatott új eredmények:

- Igazoltuk, hogy a humán szérumalbumin által közvetített endogén ACE-gátlás mértékét nem kizárólag az albumin jelenléte, hanem az albuminhoz kötött ligandumok is meghatározzák.
- Igazoltuk, hogy a HSA-ACE kölcsönhatáson keresztül megvalósuló endogén ACE-gátlás zsírsavfüggő mechanizmus.
- Humán szérumminták elemzésével igazoltuk, hogy a HSA-hoz kötött zsírsavak minőségi összetétele populációs szinten is meghatározó tényezője az endogén ACE-gátlás mértékének. In vitro vizsgálatokkal kimutattuk, hogy ezt a szabályozást a zsírsavak szénláncossza, telítettsége és térbeli konformációja befolyásolja.
- Kimutattuk, hogy az albuminhoz kötött zsírsavak szénláncosságának növekedésével az ACE-gátlás mértéke egy meghatározott tartományig fokozódik, illetve a többszörösen telítetlen zsírsavak közül az α -linolénsav és a γ -linolénsav, valamint a telített zsírsavak közül a sztearinsav és a palmitinsav fejtették ki a legnagyobb gátlóhatást, míg az egyszeresen telítetlen vakcénsav mérsékeltebb hatást mutatott.
- Egyedi eset elemzésével demonstráltuk, hogy a HSA-mediált endogén ACE-gátlás kóros körülmények között az ACE felszíni szerkezeti állapotának módosulása következtében érdemben megváltozhat.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) központi eleme. Bár az ACE farmakológiai gátlása széles körben alkalmazott, az enzim endogén szabályozásának mechanizmusai nem teljesen tisztázottak. Korábbi megfigyelések alapján ismert volt, hogy a humán szérumalbumin (HSA) képes gátolni az ACE-t, azonban e gátlás molekuláris háttere nem volt ismert.

Munkánk során igazoltuk, hogy a HSA által közvetített endogén ACE-gátlás mértéke nem kizárólag az albumin jelenlététől függ, hanem alapvetően meghatározza az albuminhoz kötött zsírsavak szerkezeti sajátossága. Kimutattuk, hogy az albumin-ACE kölcsönhatáson keresztül megvalósuló endogén ACE-gátlás mechanizmusa zsírsavfüggő, és azt a zsírsav szénláncossága, telítettsége és térbeli konformációja egyaránt befolyásolja. In vitro vizsgálataink alapján az albuminhoz kötött hosszú szénláncú zsírsavak erőteljesebb ACE-gátlást eredményeztek, amelyen belül a többszörösen telítetlen zsírsavak közül az α -linolénsav és a γ -linolénsav, valamint a telített zsírsavak közül a sztearinsav és a palmitinsav fejtették ki a legnagyobb gátlóhatást, míg az egyszeresen telítetlen vakcénsav mérsékeltebb hatást mutatott. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az endogén ACE-gátlás ligandumspecifikus, finoman hangolt szabályozási mechanizmus.

Humán minták vizsgálata során igazoltuk, hogy az albuminhoz kötött zsírsavak minőségi összetétele meghatározó tényezője az endogén ACE-gátlás mértékének, míg a szérumban mért teljes szabad zsírsav-koncentráció önmagában nem mutatott összefüggést az ACE-gátlással. Ez alátámasztja, hogy az albumin aktív szabályozó szerepet tölt be az ACE működésének finomhangolásában.

Az ACE-fenotipizálási vizsgálatok tovább árnyalták ezt a koncepciót. Kimutattuk, hogy a HSA-mediált endogén ACE-gátlás kóros körülmények között érdemben módosulhat. Egy atípusos ACE-fenotípust mutató beteg esetében az ACE felszíni szerkezeti állapotának megváltozása a HSA-ACE-zsírsav kölcsönhatás felborulásával járt, ami az endogén gátlás jelentős csökkenését eredményezte. Ez az eset demonstrálja, hogy az albumin által közvetített ACE-gátlás hatékonysága az ACE konformációs állapotától is függ.

Összességében eredményeink feltárták a HSA-ACE-zsírsav tengely korábban nem ismert szerepét az ACE endogén szabályozásában, és rámutattak arra, hogy ez a mechanizmus fiziológias körülmények között jelentős, ugyanakkor kóros állapotokban sérülhet. Megfigyeléseink új szemléleti keretet adnak az ACE aktivitás endogén szabályozásának értelmezéséhez.



Nyilvántartási szám: DEENK/45/2026.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Enyedi Enikő Edit
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10073491

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Enyedi, E. E.**, Szabó, A. Á., Pintér, T. B., Mányiné Siket, I., Pluhár, A., Váradi, C., Bányai, E., Tóth, A., Papp, Z., Fagyas, M.: Albumin-Bound Fatty Acids Modulate Endogenous Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibition.
Biomedicines. 14 (1), 1-19, 2026.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines14010103>
IF: 3.9 (2024)
2. **Enyedi, E. E.**, Petukhov, P. A., Kozuch, A. J., Dudek, S., Tóth, A., Fagyas, M., Danilov, S. M.: ACE Phenotyping in Human Blood and Tissues: revelation of ACE Outliers and Sex Differences in ACE Sialylation.
Biomedicines. 12 (5), 1-17, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines12050940>
IF: 3.9

További közlemények

3. Szabó, A. Á., **Enyedi, E. E.**, Pintér, T. B., Mányiné Siket, I., Váradi, C., Bányai, E., Tóth, A., Papp, Z., Fagyas, M.: Interference-Free Measurement of Urinary Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Activity: Diagnostic and Therapeutic Monitoring Implications.
Biomedicines. 13 (10), 1-17, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines13102528>
IF: 3.9 (2024)
4. Szabó, A. Á., **Enyedi, E. E.**, Altörjay, I., Hajnal, P., Pintér, T. B., Mányiné Siket, I., Váradi, C., Bányai, E., Tóth, A., Papp, Z., Fagyas, M.: Get reliable laboratory findings: how to recognize the deceptive effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in the laboratory diagnostics of sarcoidosis?
Clin. Chem. Lab. Med. 62 (7), 1393-1401, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2023-1288>
IF: 3.7





5. Nagy, A. C., Majer, R., Boczán, J., Sipka, S. i., Szabó, A. Á., **Enyedi, E. E.**, Tatai, O., Fagyas, M., Papp, Z., Csiba, L., Tóth, A.: Enalapril Is Superior to Lisinopril in Improving Endothelial Function without a Difference in Blood-Pressure-Lowering Effects in Newly Diagnosed Hypertensives.
Biomedicines. 11 (12), 1-13, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines11123323>
IF: 3.9
6. Fagyas, M., Nagy, B. J., Ráduly, A. P., Mányiné Siket, I., Mártha, L., Erdősi, G., Sipka, S. i., **Enyedi, E. E.**, Szabó, A. Á., Pólik, Z., Kappelmayer, J., Papp, Z., Borbély, A., Szabó, T., Balla, J., Balla, G., Bai, P., Bácsi, A., Tóth, A.: The majority of severe COVID-19 patients develop anti-cardiac autoantibodies.
GeroScience. 44, 2347-2360, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-022-00649-6>
IF: 5.6
7. Csongrádi, A., Altörjay, I., Fülöp, G. Á., Enyedi, A., **Enyedi, E. E.**, Hajnal, P., Takács, I., Tóth, A., Papp, Z., Fagyas, M.: Chitotriosidase gene polymorphisms and mutations limit the determination of chitotriosidase expression in sarcoidosis.
Clin. Chim. Acta. 513, 50-56, 2021.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.11.025>
IF: 6.314
8. Enyedi, A., Csongrádi, A., Altörjay, I., Beke, G. L., Váradi, C., **Enyedi, E. E.**, Kiss, D. R., Bányai, E., Kalina, E., Kappelmayer, J., Tóth, A., Papp, Z., Takács, I., Fagyas, M.: Combined application of angiotensin converting enzyme and chitotriosidase analysis improves the laboratory diagnosis of sarcoidosis.
Clin. Chim. Acta. 500, 155-162, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2019.10.010>
IF: 3.786

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 35

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
7,8**

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományos ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2026.02.09.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt hálás köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, *Dr. Fagyas Miklósnak*, akivel már 9 éve dolgozunk együtt. Szakmai iránymutatása, következetes gondolkodásmódja és szemléletformáló munkája alapvetően meghatározta tudományos fejlődésemet. Vezetésével nemcsak a kutatómunkához szükséges módszertani és elméleti alapokat sajátíthattam el, hanem azt a szemléletet is, amely végigkísérte doktori munkámat, és amely nélkül ez az értekezés nem jöhetett volna létre.

Hálával tartozom *Prof. Dr. Tóth Attilának* a tanszéki munka során nyújtott szakmai támogatásáért, elméleti és kísérletes kérdésekben adott tanácsaiért.

Köszönetemet fejezem ki *Prof. Dr. Papp Zoltánnak*, a Klinikai Fiziológiai Tanszék tanszékvezetőjének, aki biztosította azt a szakmai és intézményi háttérrel, amely lehetővé tette a kutatómunkám zavartalan elvégzését.

Külön köszönet illeti *Dr. Szabó Attila Ádámot*, akivel egyidőben indultunk el ezen az úton, és a kezdetektől szoros szakmai együttműködésben dolgoztunk. Köszönöm a közös munkát és a folyamatos baráti támogatást.

Köszönet illeti *Sergei M. Danilovot* az együttműködésért, a vizsgálatokhoz használt monoklonális antitestek biztosításáért, valamint a módszer elsajátításában nyújtott segítségéért.

Ezúton szeretném megköszönni a *Klinikai Fiziológiai Tanszék valamennyi munkatársának* a támogató légkört és a mindennapi munkához nyújtott segítséget, külön köszönettel *Beának* a segítőkész közreműködéséért és biztatásáért.

Köszönet illeti mindazokat a *Debreceni Egyetem Kardiológiai Intézetének*, valamint a *Debreceni Egyetem Klinikai Központ Sebészeti Klinikájának munkatársai* közül, akik a vizsgálatokhoz szükséges humán minták rendelkezésre bocsátásában közreműködtek.

Végül köszönöm a szüleimnek és barátaimnak a folyamatos támogatást és biztatást. Külön köszönöm Tamásnak a türelmét, megértését és mindvégig nyújtott támogatását.