

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Szöveti- és keringő angiotenzin konvertáló enzimek szabályozása kardiovaszkuláris megbetegedésekben

Dr. Bánhegyi Viktor

Témavezető: Prof. Dr. Tóth Attila



DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

Szöveti- és keringő angiotenzin konvertáló enzimek szabályozása kardiovaszkuláris megbetegedésekben

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Bánhegyi Viktor, általános orvos, szívsebész rezidens

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

Témavezető: Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Halmosi Róbert, az MTA doktora
Dr. Nagy Béla, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Halmosi Róbert, az MTA doktora
Prof. Dr. Szokodi István, az MTA doktora
Dr. Nagy Béla, Ph.D.
Dr. Balla András, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme,
2023. március 29. 13:00-15:00.

1. Bevezetés

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) kiemelt jelentőséggel bír kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában. A RAAS kóros aktivációja, illetve a következményes neurohumorális diszreguláció számos, népegészségügyi szempontból is jelentős szív- és érrendszeri kórkép kiindulópontját képezi. A RAAS modulálására irányuló eddigi gyógyszeres-klinikai erőfeszítéseink egyértelműen előremutatóak, az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) gátló- és angiotenzin II 1-es típusú receptor I blokkoló (ARB) gyógyszerek által szív- és érrendszeri betegeink életkilátásait közép-és hosszútávon is növelni tudtuk. Az ACE gátlók és az ARB-k önálló vagy kombinált terápiás modalitásként az elsővonalbeli ajánlások között találhatóak kardiovaszkuláris megbetegedésekben.

Az elmúlt évek kutatásai nyomán a kardiovaszkuláris patofiziológiai folyamatok háttérében álló ACE – angiotenzin II (ATII) – angiotenzin II 1-es típusú receptor I (ATRI) tengely mellett az angiotenzin konvertáló enzim 2 (ACE2) jelentősége is előtérbe került. Mindemellett a natriuretikus peptidekkel történő szabályozási lehetőség farmakológiai kiaknázása - neprilizin (NEP) gátlókkal és ARB-vel való kombinációban - szintén egyértelműen kedvező irányú hatásokat gyakorol kardiovaszkulárisan terhelt betegeink életkilátására.

A SARS-CoV-2 kórokozó által kiváltott 2019-ben kezdődő és sajnos napjainkban is komoly egészségügyi problémákat okozó koronavírus pandémia (COVID-19) szintén összefüggést mutat a RAAS rendszerrel. Kísérleteinkben az ACE/ACE2 enzimek humán szövetekben való eloszlását, szabályozásuk mechanizmusait vizsgáltuk kardiovaszkuláris- és COVID-19 betegekből.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A humán renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS)

2.1.1. Az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) → angiotenzin II (ATII) → 1-es típusú ATII receptor (ATRI) tengely

A RAAS elvitathatatlan szerepet tölt be szervezetünk só- és folyadékháztartásában, illetve a megfelelő szöveti perfúzió fenntartásában. Egyik legfontosabb tagjának, az ACE-nak felfedezése az 1950-es évek közepére tehető. Ekkor izolálták elsőként a kardiovaszkuláris rendszerben kulcsfontosságú szerepet betöltő molekulát és az ACE gátló terápiát is ekkor alapozták meg.

A RAAS egy kaszkádfolyamat, melynek kiindulási lépése a májban szintetizált angiotenzinogén (ANG), angiotenzin I (ATI) decapeptiddé való konverziója. Ezen folyamatot a vese juxtaglomeruláris sejtjeiből származó renin katalizálja. A renin felszabadulás fő fiziológiai triggerei a veseperfúzió- és a nátrium-klorid koncentráció csökkenése, illetve a szimpatikus idegrendszeri túlsúly. A funkcionálisan inaktív ATI, ATII oktapeptiddé történő hasításáért az ACE felelős, mely egy peptidil-dipeptidáz enzim és egyben a kaszkádfolyamat sebességlimitáló tényezője is. Az ATII, az ATRI-en hatva felelős a RAAS akut- és krónikus patofiziológiai mechanizmusaiért. Az ATII akut hatásai közé tartozik a nátrium reabszorpció fokozása (ezzel a vértérfogat növelése), a prekapilláris erek vazokonstriktiója, az aldoszteronszekréció- és a szomjúságérzet fokozódása. Az ATII krónikus hatásai közé sorolható a simaizom sejtek proliferációja, inflammatorikus és a pro-fibrotikus folyamatok (szívizom remodelling) megindulása. A RAAS végponti effektor molekulája a mellékvese kéreg *zona glomerulosa*-jában termelődő aldoszteron. Ezen mineralokortikoid molekula elsősorban a vese epitél sejtjeinek magjában hatva szabályozza - a fentiekkel összhangban - nátrium- és káliumion homeosztázis egyensúlyban tartása által a folyadékháztartást.

2.1.2. Az angiotenzin II (ATII) → angiotenzin konvertáló enzim 2 (ACE2) → angiotenzin (1-7) (Ang1-7) → Mas receptor (MasR) tengely

Az elmúlt évek kutatásai rámutattak, hogy a RAAS eddig ismert klasszikus útvonala mellett egy ellenreguláló (vazodilatatív és reno-protéktív) szabályozási kaszkádfolyamat is felfedezhető. Ezen tengely kiindulópontjának az ATII tekinthető. Az ATII az ACE2 által kerül hasításra Ang1-7 heptapeptiddé. Az ACE2 molekula az ACE izoenzime és fő funkciója az ATII → Ang1-7 irányú átalakulás katalízise, továbbá, az ATI, → angiotenzin 1-9 irányú átalakulásért is felelős. Az Ang1-7 molekula a MASR-on hatva az ACE – ATII – ATRI tengely patofiziológiás hatását ellensúlyozza. A szignalizációs kaszkád eredményeképpen anti-proliferatív, vazodilatatív (vényomáscsökkentő), anti-inflammatorikus és paraszimpatikus útvonalak nyílnak meg. Kiemelt molekula még ezen alrendszeren belül a neprilizin (NEP). A NEP másnéven membrán metallo endopeptidáz / neutrális endopeptidáz / CD 10 fő funkciója az élettani szempontból előnyös (Ang 1-7 hatásaival megegyező) atriális- és a B-típusú natriuretikus peptid (ANP, BNP) átalakítása inaktív peptidekké, valamint a vazokonstriktor hatású ATII és endothelin I lebontása. A NEP korlátozottan, de szintén képes AT I → Ang1-7 irányú katalízisre. Ezen élettani rendszer kiaknázása és potenciózása, továbbá a NEP gátlására irányuló erőfeszítések szintén a klinikai terápiák sorába emelkedtek, hatásosságukat a mindennapi klinikai gyakorlat igazolta.

2.2. Az angiotenzin konvertáló enzimek eredete, a keringő ACE és ACE2 forrásai

A keringő ACE eredetét tekintve évtizedek óta tankönyvi dogmaként deklarált állásfoglalás, hogy a keringésben jelen lévő, enzimatikusan aktív ACE a tüdő parenchyma kapillárisainak endotél felszínéről szecernálódik a humán véráramba. Ezen képet árnyalja a Humán Protein Atlasz online adatbázis hiteles és szerteágazó analízise. A Humán Protein Atlasz egy 2003-ban alapított, minden naptári évben frissülő, svéd kezdeményezésű, *open access* adatbázis, mely modern molekuláris biológiai módszerek (tömegspektrometria,

immunhisztokémia, proteomika, „OMIC” -ok) segítségével térképezi fel szisztémásan az emberi testet felépítő fehérjéket. Elemzéseik és méréseik összegzése alapján elmondható, hogy protein és mRNS szinten is az ACE legnagyobb mennyiségben a gasztrointesztinális rendszerben van jelen, ezt követi a kiválasztó szervrendszer, illetve a genitáliák szöveti expressziója és ezektől jelentősen elmarad a tüdőszövetben megfigyelhető expresszió.

Az ACE2 tekintetében a kép hasonló irányvonalat mutat. Elmondható, hogy mind mRNS, mind protein alapú expressziós profil tekintetében az ACE2 jelentős szöveti expressziót mutat a gasztrointesztinális- és kiválasztó szervrendszerben, illetve magában a szívizom szövetben. Tüdőszövet tekintetében az ACE2 esetében mindössze alacsony mértékű expresszióról beszélhetünk.

2.3. A SARS-CoV-2 bemutatása

A 2019 második felében kitört és napjainkban is súlyos népegészsügyi problémákat okozó SARS-CoV-2 vírus pandémia szoros összefüggést mutat a RAAS rendszerrel. A kórokozó világméretű elterjedése nyomán több millió emberélet veszett oda és mind gazdasági, mind egészségügyi szempontból hatalmas kihívásokkal szembesültünk az elmúlt évek során. A koronavírusok (Coronaviridae) madarakban, emlősökben, kétélűekben megtalálható burkos-lipides (peplonos), pozitív szálú RNS vírusok családjába tartozó, magas fertőzési potenciállal- és mutációs rátával bíró kórokozó. A koronavírusok lipid burkának külső felszínén relatíve nagy (20 nm) nyúlványok/tüskék találhatóak, melyekről a víruscsalád nevét kapta, napkoronára emlékeztető morfológiája által. A koronavírusok fertőzőképességének hajtóereje a genetikai sokszínűség fenntartása RNS alapú rekombináció által. Kutatómunkám szempontjából is nagy relevanciával bíró tudományos megfigyelés, hogy a koronavírusok sejtfelszíni kapcsolódása és internalizációja az extracellulárisan jelen lévő ACE2 molekula által valósul meg.

A vírusfertőzés által fellépő betegség az influenzához hasonló kórképet (láz, szag- és ízérzékelés csökkenés, köhögés, torokfájás) alakít ki a humán szervezetben, viszont influenzával összevetve a koronavírus fertőzéshez kapcsoló halálozási számok egyértelműen magasabbak. A magasabb halálozás hátterében az immunrendszer kórosan fokozott válaszreakciója valószínűsíthető. A vírusfertőzés nyomán fellépő panaszok érzékenyen érintik a humán tüdőszövetet (is). Aktív koronavírus fertőzés esetén képalkotó modalitásokkal bizonyított tény, hogy a kórokozó destruálja a humán tüdőszövetet és sejtfelszíni kapcsolódása által ARDS-hez hasonló klinikai képet alakít ki, mely az esetek jelentős részében invazív (CPAP, BIPAP) lélegeztetést tesz szükségessé. Továbbá bronchoalveoláris mosófolyadékban a kórállapottal összefüggő (növekvő mértékű, bizonyos esetekben kiemelkedően nagy) ACE2 aktivitás tapasztalható, mely egyfajta intrinzik, nem specifikus védelmi mechanizmusként értelmezhető koronavírus fertőzés során.

3. Célkitűzések

3.1. Szöveti- és keringő ACE vizsgálata humán tüdőszövetben és szérumban

Célul tűztük ki, mellkassebészeti műtéten átesett betegek populációján megvizsgálni, hogy a keringésben jelen lévő, genotípusosan (II, ID, DD polimorfizmusok által) meghatározott ACE aktivitás- és expresszió a tüdőszövetből származik-e? Célul tűztük ki továbbá a humán szöveti ACE szöveti endogén regulációjának vizsgálatát. Ehhez egy adekvát és hiteles ACE extrakciós protokoll kidolgozása is indokolt volt.

3.2. Angiotenzin konvertáló enzim 2 (ACE2) aktivitásának és expressziójának vizsgálata kardiovaszkulárisan terhelt betegekben

A SARS-CoV-2 kórokozó sejtfelszíni receptoraként működő ACE2 aktivitásának és expressziójának meghatározása, illetve ezen értékek összevetése kardiovaszkulárisan terhelt betegek csoportjaiban. Vizsgálni terveztük az alkalmazott ACE gátló terápia ACE2 aktivitási- és expressziós szintekre való hatásának vizsgálatát szív- és érrendszeri betegek vérében és szöveteiben.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Humán szív- és tüdőszövet bank

A humán tüdőszövetben és a keringésben jelen lévő ACE vizsgálata a Debreceni Egyetemen, a Mellkassebészeti Tanszékkel való közös munka keretében valósult meg. A tüdőszöveti minták mellkassebészeti műtéten átesett (2015-2017 közötti, többségében adenokarcinomával diagnosztizált, n=108) betegekből származnak. A rezekált szövetek a tumorra infiltrált rezekciós szélétől távolabb eső, fiziológias struktúrát mutató szövetdarabokat reprezentálják. A szövetmintákon túl minden egyes páciens esetében vérminták (teljes vér, szérum) is vizsgálatra kerültek. A klinikai adatgyűjtés etikai engedélyeztetése a kutatás etikai

elveknek megfelelően a Magyar Egészségügyi Tudományos Tanács által megtörtént, a kutatási etikai engedély száma: 20753-7/2018/EÜIG.

A Semmelweis Egyetem Városmajori Szívcentrumával való együttműködés keretében szívtranszplantáción átesett betegek explantált szív- és szérummintáit használtuk fel az ACE2 és a koronavírus pandémia összefüggésének vizsgálatához. Kutatásetikai engedélyeztetési szám: ETT TUKEB 7891/2012/EKU (119/PI/12.)

Minden fent említett minta esetében a tárolás mélyfagyasztással -80 Celsius fokon valósult meg, továbbá minden beválasztásra került páciens - a Helsinkai Nyilatkozat alapelveit szem előtt tartva – írásos beleegyezését adta a vér- és szövetminták kutatási célú felhasználására.

4.2. Az ACE inzerció/deléción polimorfizmusának meghatározása

A genotípus meghatározás betegek perifériás véréből, kereskedelmi forgalomban kapható DNS izoláló kit (FlexiGene; Qiagen GmbH, Hilden, Germany) segítségével, PCR technikával valósult meg. Az amplifikáció során használt „forward” (CTGGAGACCACTCCCACTCTTTCT) és „reverse” (GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT) primerek segítségével az előzőekben már munkacsoportunk által ismertetett módon végeztük a kísérleteket. Amplifikációt követően a PCR termékek 3%-os poliakrilamid gélen történő elektroforetikus szeparáción és *SybrSafe* festésen estek át.

4.3. Szövetfeldolgozás ACE aktivitás és expresszió meghatározáshoz

A folyékony levelgőben fagyasztott, majd mélyfagyasztott humán tüdő- és szív mintákat folyékony nitrogén alatt, mozsárban, mozsártörővel törtük. Az így kapott kisebb szövetdarabok minden grammjához (nedves súly) 5 ml 100 mM TRIS-HCl, pH 7,0 puffer került hozzáadásra (jéghidegen). A minták ezek után forgókéses homogenizálásra (Bio-Gen

PRO200, PRO Scientific, Oxford, CT, USA) majd centrifugálásra kerültek (16 100 g 5 percen át). Az így kapott felülúszókat mélyfagyasztottuk a biokémiai mérések elvégzéséig.

4.4. Fehérjemeghatározás és fehérjenormalizálás

Az egyes szövetekből származó felülúszók eltérő fehérjemennyisége indokolta a fehérje meghatározás, illetve normalizálás alkalmazását *bicinchoninic* sav (BCA) esszé szerint, standard marha szérum albumin (BSA) hígítási sorra interpolálva. Megfelelő hígítások alkalmazásával mintáinkat 1 mg/ml-re hígítottuk egységesen az enzim aktivitás mérések előtt.

4.5. ACE aktivitás meghatározás

Szöveti- és keringő ACE aktivitásmérést munkacsoportunk az előzőekben már publikáltak szerint végezte. A mérések *quenched*, fluoreszcens Abz-FRK(Dnp)P-OH ACE szubsztrát felhasználásával, kinetikus esszé segítségével történtek. A mérési elegy összetétele: 0,6 V/V% Triton X-100 tartalmú 100 mM TRIS-HCl, pH 7,0, 50 mM NaCl, 10 μ M ZnCl₂, 10 μ M Abz-FRK(Dnp)P-OH plusz tetszőleges mennyiségű, proteinmennyiségre BCA esszé segítségével normalizált szövetminta vagy szérum. Az aktivitás meghatározás 37 Celsius fokon, fluoreszcens plate reader (NovoStar, BMG Labtech, Ortenberg, Germany) segítségével, 340 nm-es excitációs és 405 nm-es emissziós érték mellett történt. Az egyes méréseket akkor fogadtuk el értékelhetőnek, ha lineáris regressziót követően a kapott egyenesek illeszthetősége (r^2) jobb volt, mint 0,9. Az ACE aktivitás értékek konkrét meghatározása a fluoreszcens intenzitásértékek abszolút növekedésének és a kalibrációs Abz fluorofór intenzitásnövekedés referenciagörbéjének összevetésével határoztuk meg.

4.6. ACE2 aktivitás meghatározás

A keringő, illetve szöveti ACE2 aktivitások meghatározása Mca-APK(Dnp) *quenched*, fluoreszcens szubsztrát segítségével valósult meg, az előzőekben munkacsoportunk

által már publikáltak szerint. A mérési elegy összetétele (200 μ l): 20 μ l szérumszövetminta, 80 μ l mintahígító puffer (szérumszövetminta esetében: 75 mM TRIS HCl, pH 6.5 és proteáz inhibitor koktél; szövetminták esetében az előbbi pufferhez 0,6 V/V% Triton X-100 is hozzáadásra került) és 100 μ l (50 μ M) ACE2 specifikus fluoreszcens szubsztrát [Mca-APK(Dnp)]. A mérési elegy (mintahígító pufferhez adagolva) proteáz inhibitorokat tartalmazott, mely összetétele: 10 μ M Bestatin-HCl, 10 μ M Z-prolyl-prolinal (Enzo Life Science, Exeter, UK), 5 μ M Amastatin-HCl, 10 μ M Kaptopril. Az ACE2 nem-specifikus aktivitásértékek meghatározása 1,25 μ M véghígítású MLN-4760 (specifikus ACE2 gátló) mellett valósult meg.

A mérések kivitelezése 96 lyukú mikroplaten történt (Greiner Bio-One, Frickenhauser, Germany) 340 nm-es excitációs és 405 nm-es emissziós érték mellett az ACE mérésnél már említett NOVOStar fluoreszcens *Plate Reader* segítségével. Az ACE2 enzim aktivitások nominális értékét a fluoreszcens intenzitásértékek lineáris regressziójával határoztuk meg az Mca-APK(Dnp) fluoreszcens szubsztrát intenzitásnövekedésének referenciagörbéjével való összevetés után ($r^2 > 0,9$) feltétel teljesülése mellett 37,0 Celsius fokon.

4.7. ACE és ACE2 expresszió (koncentráció) meghatározása

Az ACE és ACE2 fehérjék mennyiségi meghatározása szendvics alapú enzim kapcsolt immunoszorbiens esszé (ELISA) segítségével történt a forgalmazó iránymutatásainak megfelelően (DY929 és DY933-05, R&D Systems, McKinley Place, MN, USA). Megfelelő koncentrációjú *capture* antitest *overnight* inkubálását követően a visszamaradt kötőhelyeket Dulbecco's foszfát puffer sóoldatban feloldott 10 mg/ml végkoncentrációjú marha szérumszövetminta albuminnal blokkoltuk. A minták (tüdő, szív és szérumszövetminta) hígítása megegyező oldatban az értékelési szempontból előnyös, a standard sor középtartományába eső hígítási arányban valósult meg. A minták felvitelét és egy órás inkubációját és mosatását követően, a

mikroplate-re (Greiner Bio, PS Microplate, Microlon®, Nr. 655061) felvitelre kerültek a primer antitestek. Kettő órás inkubációt és ezt követő mosást követően biotinnal jelölt detekciós antitesteket alkalmaztunk. Újabb kettő órás inkubációt és mosást követően pedig 20 perc erejéig 200-szoros hígítású streptavidin-torma peroxidáz oldattal tettük lehetővé az immunkomplexek detektálását. Ez kromogén szubsztrát (0,3 mg/mL 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, 0,1 mM H₂O₂ és 50 mM ecetsav) segítségével valósult meg. A kromogén színreakció megállítása 0,5 mólos sósavoldattal történt. A keletkezett termék detektálása 450 nanométeren NOVOSTar Fluoreszcens *Plate Readerrel* történt. Az ACE vagy ACE2 konkrét mennyiségét a standard kalibrációs görbével való összevetés után (ng/ml) számszerűsítettük.

4.8. Vegyszerek

Az experimentális munka során (amennyiben azt külön nem jelöljük) a Sigma Aldrich által forgalmazott vegyszerek kerültek alkalmazásra.

4.9. Statisztikai analízis

Adataink eloszlásfüggvényének vizsgálata Kolmogorov-Smirnov teszttel történt. Nonparametrikus, Mann-Whitney tesztet végeztünk kettő, nem normáeloszlást mutató csoport összehasonlítása esetében. Több nem normáeloszlást mutató kohort szimultán összehasonlítása során Kruskal-Wallis teszt került elvégzésre post hoc Dunn's teszttel kombinálva. Korrelációs analízisek során Spearman's tesztet végeztünk. A statisztikai analízis GraphPad Prism 5.0 szoftver segítségével (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) történt. Az egyes statisztikai eredményeket $p < 0,05$ érték alatt tekintettük szignifikánsnak.

5. Eredmények

5.1. Szöveti ACE extrakciós protokoll

Kutatómunkánk első fő kérdésköre egy hatékony szöveti extrakciós (membrán permeabilizációs) protokoll bevezetését indokolta. Különböző detergenssek (Triton X-100, Triton X-114, SDS) kerültek vizsgálatra 0,06-5,0 V/V% *alkalmazott* koncentráció tartományban. Detergensünk közül első körben az SDS-t ACE aktivitást gátló hatása nyomán elvetettük. Triton X-100 és -114 között érdemi hatásspektrumbeli és effektivitási különbséget nem tapasztaltunk ennél fogva a továbbiakban laboratóriumokban általánosan használt Triton X-100-at alkalmaztuk továbbiakban kísérletes munkánkban. Triton X-100 kezelés hatására a szöveti ACE extrakció 250%-os növekedést mutatott már a legkisebb alkalmazott koncentráció esetében is. 100%-os („*baseline*”) extrakciónak tekintettük a csupán pufferoldatban megvalósult ACE kivonást. A legmagasabb, 5,0 V/V% koncentrációjú Triton X-100 hatására ötszörös enzimextrakció javulást tapasztaltunk a detergens nélküli TRIS-HCl pufferben való feltáráshoz viszonyítva. ACE aktivitásértékek terén az extrakciós hatékonyság az előzőektől eltérően alakult. Az aktivitásértékek alacsony koncentrációk esetén erőteljes növekedést mutattak, a maximum értéket 0,3 V/V%-os detergens *végkoncentráció* esetén tapasztaltuk (megközelítőleg 250%). Ezen érték felett a specifikus ACE aktivitásértékek csökkenő tendenciát mutattak, utalva arra, hogy az alkalmazott magasabb Triton X-100 koncentráció ugyan fokozza az ACE extrakciót, de eközben vélhetően gátolja az ACE aktivitást.

A szöveti feldolgozást követően a felülúszókból végeztünk ACE aktivitás- és expresszió meghatározást. A visszamaradó szövetpelletet konzekutív jelleggel, két további alkalommal elvégzett detergens kezelésnek vetettük alá. Célunk az extrakciós hatékonyság vizsgálata volt. Elmondható, hogy általános TRIS HCl pufferben végzett feltárást után 20-25%

ACE aktivitás veszteség volt realizálható a 3. újrafeltárást követően is. 0,6 V/V% Triton X-100 kezelés alkalmazása nyomán a veszteség egyértelműen minimalizálhatóvá vált (az ACE túlnyomó többsége az első feltárást során extrahálódott).

5.2. Genotípus függő (I/D polimorfizmus) tüdőszöveti és keringő ACE expresszió

Genotípus függő ACE expressziós szint növekedést tapasztaltunk mellkasebészeti műtéten átesett betegek (ACE gátlót szedő pácienseket is ideértve) szérummintáiban. Elmondható, hogy a DD genotípussal bíró betegek ACE expressziója (258 ± 109 ng/ml) szignifikánsan magasabbnak bizonyult II genotípusú betegek hasonló szérummintáival összevetve (166 ± 143 ng/ml), utalva az I/D polimorfizmus meghatározó genetikai szerepére a keringő ACE expresszió terén. Ugyanezen páciensek tüdőszövetében az ACE I/D polimorfizmusa nem igazolta vissza a keringésben megfigyelteket (szöveti ACE koncentrációk: II: 1423 ± 1276 ng/mg, ID: 1040 ± 712 ng/mg, DD: 930 ± 1273 ng/mg). ACE gátlót nem szedő páciensek esetében a D allél jelenléte nyomán szignifikánsan magasabb keringő (szérum) ACE aktivitási szinteket tapasztaltunk (II: $3,1 \pm 1,4$ U/mL, ID: $4,0 \pm 1,4$ U/mL, DD: $5,0 \pm 2,5$ U/mL). Az ACE gátlók hatásának kiküszöbölése érdekében, felülúszók magas hígításon történő mérését követően elmondható, hogy (ACE gátló kezelés jelenlététől függetlenül) szignifikánsan magasabb ACE aktivitásértékek mérhetőek DD genotípusú betegek kohortjában II genotípusú páciensekkel összevetve (II: $8,4 \pm 4,9$ U/mL, ID: $8,9 \pm 4,2$ U/mL, DD: $10,3 \pm 3,9$ U/mL).

Megegyező betegek tüdőmintáit összevetve nem tapasztaltunk érdemi kapcsolatot a szöveti ACE I/D polimorfizmus és az ACE aktivitások alakulása között (II: 37 ± 18 U/mg, ID: 37 ± 18 U/mg, DD: 39 ± 15 U/mg, illetve II: 156 ± 161 U/mg, ID: 115 ± 68 U/mg, DD: 108 ± 121 U/mg).

5.2.1. Szöveti- és keringő ACE aktivitás- illetve expresszióértékek összefüggése

Meglepő módon nem találtunk szignifikáns korrelációt a tüdőszövetben kifejeződő és a keringésben jelen lévő ACE mennyisége között ($p=0,06$). Tüdőszöveti és keringő ACE aktivitásértékek terén szintén nem tudtunk érdemleges kapcsolatot kimutatni ($p=0,24$). A fentiekkel ellentétben (szívelégtelen) szívizom szöveti- és szérumban ACE aktivitások összevetésében szignifikáns összefüggés figyelhető meg ($p=0,0054$).

Az egyes betegek szérummintáiban vagy tüdőszövetében megfigyelhető (ugyanonnan származó) expresszió illetve aktivitásértékek lineáris korrelációt mutattak. ($p<0,01$).

5.2.2. Az endogén gátlás jelentősége humán tüdőszövetben

Jelen tanulmányban a keringő és szöveti összefüggések vizsgálatán túl a felülűszók hígításának hatását is vizsgáltuk. ACE mennyiségre normalizált szöveti- és keringő aktivitásértékek (specifikus aktivitás) szignifikáns növekedését tapasztaltuk hígítás hatására. 400-szoros hígítási értéken, szignifikánsan alacsonyabb specifikus ACE aktivitás értéket mértünk keringésben tüdőszövettel összevetve. ($0,06 \pm 0,004$ U/ng vs. $0,13 \pm 0,009$ U/ng, $p<0,05$). ACE gátló kezelésben nem részesülő betegek csoportjában az ACE gátlás százalékos értéke $53 \pm 2\%$ -nak, ACE gátlót szedő páciensek esetében $83 \pm 3\%$ -nak adódott, szignifikáns különbséget és az ACE gátló kezelés hatékonyságát demonstrálva. Hasonló, szignifikáns különbséget a tüdőszöveti ACE gátlás terén nem tudtunk kimutatni. Keringő, illetve tüdőszöveti ACE aktivitások kor- és nemfüggése terén nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni.

5.3. Az ACE2 aktivitás kapcsolata szív- és érrendszeri betegségekkel, illetve kardiovaszkuláris rizikófaktorokkal

A keringésben jelen lévő ACE2 aktivitás egyértelmű és markáns növekedését mutattuk ki a kardiovaszkuláris kontinuum különböző stádiumaiban fellépő patológiás folyamatok során. Egészséges egyének csoportjához viszonyítva szignifikáns ACE2 aktivitás növekedést (+32%) tapasztaltunk magas vérnyomásban szenvedő betegek csoportjában továbbá drasztikusan magasabb ACE2 aktivitást mértünk (+424%) végstádiumú szívelégtelenségben szenvedő páciensek populációjában. Magas vérnyomással karakterizált betegek csoportjában szignifikánsan magasabb ACE2 aktivitást tapasztaltunk férfiak körében nőekkel ellentétben, illetve túlsúlyos és elhízott páciensek esetében fiziológiás testtömeg indexű páciensekkel összevetve. 60 évnél idősebb, magas vérnyomásban szenvedő betegek esetén szintén magasabb ACE2 aktivitást tapasztaltunk 60 év alatti páciensekkel szemben.

Végstádiumú szívelégtelen páciensek csoportjában a keringő-, illetve szöveti ACE2 aktivitás és a kardiovaszkuláris rizikófaktorok kapcsolata más képet mutatott. Ezen betegcsoportban férfi és női nem összevetésében tudtunk szignifikáns, keringő ACE2 különbséget igazolni a férfi nem javára. Szöveti szinten szignifikánsan alacsonyabb bal kamrai ACE2 aktivitást és expressziót tapasztaltunk elhízott páciensek csoportjában fiziológiás testtömeg indexű betegekkel összevetve. Kor tekintetében, 60 éves kor felett szintén szignifikánsan alacsonyabb bal kamrai ACE2 aktivitást tapasztaltunk 60 év alatti betegekkel összevetésben. ACE2 expresszió tekintetében hasonló tendenciát figyeltünk meg.

Tüdőt érintő betegségben szenvedő páciensek csoportjában férfi nem esetében szignifikánsan magasabb keringő ACE2 szintet tapasztaltunk, női betegekkel összevetve. Szöveti szinten további szignifikáns ACE2 aktivitás- vagy expresszióbeli különbségeket nem tudtunk kimutatni.

5.3.1. Bal kamrai ACE2 aktivitás és expresszió összefüggése a keringésben jelen lévő ACE2 szintekkel

Pozitív korrelációt tapasztaltunk keringő- és bal kamrai ACE2 aktivitás és expresszió terén. Eredményeink hitelességét szívizomban mért aktivitás- és expresszióértékek korrelációjával is alátámasztottuk. A keringő- és szívizom szöveti ACE2 aktivitás- illetve expresszióértékekre nem gyakorolt érdemi hatást az alkalmazott ACE gátló terápia.

5.3.2. Tüdőszöveti ACE2 aktivitás- és expresszióértékek korrelációanalízise keringő ACE2 szintekkel

Tüdőszöveti ACE2 aktivitás- és expresszióértékek nem mutattak szignifikáns kapcsolatot a keringő ACE2 aktivitásokkal. A fentiekben, hasonlóképp alkalmazott logika mentén tüdőszöveti ACE2 aktivitások erőteljes korrelációt mutattak tüdőszöveti ACE2 expresszióval eredményeink hitelességét igazolva. A keringő- és tüdőszöveti ACE2 aktivitás- illetve expresszióértékekre nem gyakorolt érdemi hatást az alkalmazott ACE gátló terápia.

5.3.3. RAAS gátló terápia hatása a keringő ACE2 aktivitásra magas vérnyomással bíró betegekben

A keringő ACE2 aktivitásértékek magas vérnyomásos betegekben magasabbnak bizonyultak ACE gátló vagy ARB kezelés mellett, míg RAAS gátló terápia nélkül, átfedésben láthatjuk egészséges betegek csoportjával összevetésben. Magas vérnyomásban szenvedő betegekben alkalmazott különböző ACE gátló terápiás modalitások nyomán hasonló ACE2 aktivitásértéket mértünk (enalapril: 22 ± 14 , n=59; perindopril: 23 ± 15 , n=167; ramipril: 21 ± 15 mU/L, n=113). ACE2 aktivitásbeli különbséget, ACEi terápia 12 hónapnál hosszabb (23 ± 16 mU/L, n=223) vagy rövidebb (22 ± 14 mU/L, n=52) alkalmazása nyomán nem tudtunk kimutatni.

5.3.4. ACE gátló terápia ACE- és ACE2 aktivitásértékekre gyakorolt hatásának vizsgálata

ACE gátló terápia alkalmazását tekintve negatív korrelációt mutattunk ki az ACE gátlás mértéke és a szisztolés, illetve diasztolés vérnyomás összefüggését vizsgálva. A maximális ACE gátlási effektivitást mind szisztolés, mind diasztolés vérnyomásértékek esetében 94-96%-os gátlási tartományban tapasztaltuk. Kísérleteinkben nem találtunk érdemi hatást vagy kapcsolatot az ACE gátlás hatékonysága, illetve a keringő ACE2 aktivitásértékek esetleges változása között.

6. Megbeszélés

6.1. Genotípus függő keringő- és szöveti ACE vizsgálata

A keringő humán ACE forrása általánosan elfogadott és tankönyvi alaptételként deklaráltan a tüdőkapillárisok endotél sejtjei. Ezen tüdőkapilláris endotél sejtek túlnyomó többsége kifejezi az ACE-t, míg a nagyvérkörben ezek aránya kb. 20%-ot tesz ki. A keringő ACE szintjét meghatározó faktorok tekintetében egyrésről az ACE inzerció/s/delécio polimorfizmusa (ACE I/D) emelhető ki. Ezen genotípusos jelleg szoros asszociációt mutat kardiovaszkuláris megbetegedésekkel és szívelégtelenséggel. Ennélfogva az ACE forrásáért felelős szerv(rendszer) I/D regulációja szintén feltételezhető. A genetikai meghatározottságon túl fiziológiai tényezők szerepe vethető fel. A nitrogén-monoxid molekula ACE expresszióra kifejtett gátló szerepe, illetve a nitrogén-monoxid gátlók facilitáló szerepe említhető meg. Összességében tehát elmondható, hogy a metabolikusan aktív (ACE-t termelő) sejtek száma általi passzív meghatározottságon túl a biokémiai és oxidatív környezet is hozzájárul az ACE expresszió szabályozásához.

Kutatómunkánk tárgyaként a keringő, humán ACE forrásának vizsgálatához humán tüdőszövetet, illetve ugyanazén páciensekből származó vérmintákat választottuk. A keringő

ACE szintek meghatározása során DD genotípus esetében szignifikánsan magasabb ACE aktivitást és expressziót tapasztaltunk II genotípusú beteg mintáival összevetve, míg ID genotípus esetén egy intermedier értéket mértünk, ami visszaigazolta az eddigi irodalmi adatokat. Tüdőszöveti szinten ezen genotípusos meghatározottságot igazolni nem tudtuk, ami arra utal, hogy a keringésben jelen lévő genotípusosan meghatározott ACE forrása a tüdőszövetből eltérő.

A keringő ACE alternatív forrásának vizsgálata során szívizom szövet és keringő ACE vetületében szignifikáns pozitív korrelációt tapasztaltunk, mely azt sugallja, hogy a humán szívizomszövet érdemben hozzájárul a keringő, genotípusosan meghatározott ACE aktivitáshoz és expresszióhoz.

A szöveti ACE felszabadulás (szekréció) tekintetében a tumor nekrozis faktor alfa konvertáló enzim (TACE vagy ADAMTS17) szerepét valószínűsítik, de ezen kérdéskör még nem nevezhető egyértelműen eldöntöttnek. A szomatikus ACE hasítási helye az Arginin1203/Szerin1204 peptidpozícióra lokalizálható.

Korábban publikált eredmények alapján, tüdőrákos páciensekben az ACE expresszió mértéke csökken. Az 1970-es évek közepén szintén negatív korrelációról számoltak be limitált számú beteg bevonásával.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a keringő ACE forrása nem kizárólag és talán még csak nem is túlnyomórészt a tüdő kapillárisrendszere. Experimentális munkánk nyomán, alternatív forrásként a humán szívizom hozzájárulása merül fel. További molekuláris biológiai technikákon (Western blot, ELISA, mRNS szekvenálás, immunhisztokémiai) alapuló, komplex adatbázisok (pl. Humán Protein Atlasz) regisztereit figyelembe véve a keringő ACE (általunk humán kísérletekben nem vizsgált) forrásaként jelölhető még meg a vese proximális tubulusainak apikális epitél rétege, a vékonybél mukózarétege, a placenta szinciciális trofoblasztja, a központi idegrendszer egyes régiói,

továbbá a makrofágok M1, pro-inflammatorikus altípusa. Munkacsoportunk által az elmúlt években sikeresen publikált eredmények közé tartozik továbbá, hogy a pro-inflammatorikus makrofágokban felszaporodó, relatíve nagy mennyiségű ACE szarkoidózisban mint biomarker értelmezhető. Általánosan elmondható, hogy ezen - a klasszikus tüdőszöveti lokalizáción felüli - ACE expresszió pontos szerepe még nem tisztázott és további kutatásokat igényel még.

Experimentális munkánk során az ACE termelés szempontjából releváns, patkánymodellből származó saját szövetminták, ezen megfigyeléseket szintén támogatják. Megállapításainkkal nem kívánjuk az eddig ismert klasszikus tankönyvi ismereteket ignorálni, hanem felhívni arra a figyelmet, hogy a keringésben, jelen lévő, genotípusosan meghatározott humán ACE forrása egy színesebb képet mutat, és a humán tüdő szerepe egyáltalán nem kizárólagos.

Az ACE endogén regulációja az 1970-es évek vége óta ismert jelenség. A későbbiekben további humán szívmintákon és szérummintákon végzett kísérletek is igazolták az endogén ACE gátlás jelenségét. A továbbiakban bizonyítás nyert, hogy a hígítás, mint adekvát biokémiai technika szintén igazolja ezen jelenség meglétét patkány szövetekben. Munkacsoportunk az elmúlt évek során a humán szérumalbumin szerepét mutatta ki az endogén gátlás hátterében. Jelen tanulmányban, korábbiakkal megegyező (hígítási) metodikát követve, szintén igazolni tudtuk az endogén gátlás jelenlétét mind keringő, mind szöveti ACE szintjén. Szöveti szinten, ACE gátló terápia jelenlététől függetlenül, hasonló ACE gátlási szinteket tapasztaltunk. Tüdőszövetben a humán szérum albumin koncentrációja alacsony mértékű, ami által egy eddig nem azonosított alternatív gátlási folyamat jelenlétére következtethetünk. Eredményeink összhangban vannak előzetes tudományos eredményekkel, ahol patkány tüdőszövetben legalább 85%-os endogén gátlási szintekről számolnak be.

Szöveti- és keringő specifikus ACE aktivitások terén jelen munka szignifikáns

különbséget állapít meg. Ezen szignifikáns különbség háttérben vélhetően poszttranszlációs módosítások állhatnak, mely módosítások befolyásolják a metabolikusan aktív ACE működését, effektivitását. Eredményeinket támogatja egy korábbi hasonló megfigyelés, mely igazolta az ACE sejt- és szövetspecifikus glikozilációs mintázatának jelentőségét (strukturális feltérképezés, *fingerprinting*). Fontos továbbá megemlíteni az alternatív ANGI → ANGII átalakulási mechanizmusért felelős további molekulát, a kimáz fontosságát. Ezen molekula jelen ismereteink szerint szívizom szövetben aktívabb az ACE-nál, ami által a vazokonstriktív és pro-inflammatorikus ANGII szint nem kizárólag az ACE/ACE2, hanem inkább a kimáz/ACE2 arány által szabályozott. Jelen munkában erre az aspektusra nem tértük ki.

6.2. Az ACE2 jelentősége a koronavírus pandémia tükrében

A 2019-ben kitört koronavírus pandémia munkacsoportunk számára egy egyedi kutatási lehetőséget nyitott meg hosszabb múltra visszatekintő, ACE2 irányú kutatómunkánk terén.

Az általános- és respirációs rendszert érintő problémákon túl a koronavírus fertőzés kardiovaszkuláris vonatkozással is bír. Elmondható, hogy aorta sztenózisban, magasvérnyomás betegségben, illetve szívelégtelenségben szenvedő (HFrEF) betegek csoportjaiban az ACE2 magasabb szintet mutat, biomarkerként értelmezhető. Ezen összefüggés, illetve a SARS-CoV-2 és az ACE2 szoros kapcsolata alátámasztja a koronavírusal fertőzött kardiovaszkuláris betegek magasabb mortalitási számait. A poszt COVID19 tünetek terén megfigyelhető kardiovaszkuláris panaszok (palpitáció, csökkent terhelhetőség, szívizom gyulladás) szintén felvetik az SARS-CoV-2 - ACE2 – RAAS reláció jelentőségét. fenti gondolatok nyomán munkacsoportunk célul tűzte ki a keringő ACE2 aktivitásának- és expressziójának meghatározását, különböző kardiovaszkulárisan betegcsoportokban. Emellett relevánsnak éreztük megvizsgálni az ACE gátló terápia ACE2 szintekre gyakorolt hatásait, ezáltal következtetni a koronavírusos betegekben alkalmazott

ACE gátlók potenciális veszélyeire és reflektálni az ESC ezen irányú irányelveire.

Jelen dolgozatban a koronavírus sejt felszíni receptoraként szolgáló keringő- és szöveti ACE2 molekula szintjét és aktivitását kardiovaszkuláris rizikófaktorok és egyéb patológiás folyamatok, úgy mint magas vérnyomás, idős kor, elhízás és szívelégtelenség, befolyásolják. Munkánk során igyekeztünk a keringő- és szöveti ACE2, mint lehetséges biomarker szerepét vizsgálni a koronavírus fertőzés okozta mortalitás és az ACE gátló terápia alkalmazásának (koronavírus fertőzés esetében) tükrében. Ezen túl az eredmények megvilágítják az ACE2 szerepét a kardiovaszkuláris kontinuum különböző stádiumaiban (egészséges-, magas vérnyomással diagnosztizált-, végstádiumú szívelégtelen egyének csoportjai). Több hasonló tanulmány esetében a keringő ACE2 szint meghatározása molekuláris biológiai, kvantitatív PCR metodika segítségével valósult meg, ami nem alkalmas a valós keringő ACE2 koncentráció értékek meghatározására.

Az ACE2 vérnyomás szabályozásban betöltött kiemelkedő szerepére elsőnek állatmodelles kísérletek hívták fel a figyelmet. Spontán magas vérnyomás patkánymodelljében az *ace2* gén lokusza a magas vérnyomás genetikai szabályozó régiójának közelében helyezkedik el, továbbá igazolták, hogy ezen modellben a keringő ACE2 szintje magasabb. Megegyező modellrendszerben az *ace2* gén deléciója vérnyomás regulációs problémákhoz, illetve funkcionális- és strukturális szívproblémákhoz vezetett. Munkacsoportunk humán mintákon végzett kísérletei az elmúlt évek során egy inverz viszonyt igazoltak a keringő ACE2 aktivitás és csökkent ejekciós frakciójú szívelégtelenség (HFrEF) romló funkcionális stádiumaiban. Jelen eredmények alapján elmondható, hogy végstádiumú szívelégtelenségben megfigyelhető drasztikus ACE2 aktivitás emelkedéshez képest relatíve alacsonynak mondható az ACE2 aktivitás (relatív) emelkedése esszenciális magas vérnyomásban, összhangban korábbi megfigyeléseinkkel és az eddig ismert irodalmi adatokkal.

Munkacsoportunk előzetes eredményei alapján 110 fő kritikus állapotú koronavírus fertőzéssel érintett páciens ACE2 aktivitásértékeinek elemzése nyomán elmondható, hogy ezen betegcsoportban szignifikánsan magasabb ACE2 aktivitásértékek tapasztalhatóak klasszikus (non-COVID) szepszisben szenvedő páciensekkel összevetve. 30 napos mortalitás növekedése terén az ACE2 szintén biomarkerként volt értelmezhető. Elmondható, hogy a növekvő ACE2 aktivitásértékek korrelálnak a halálozással és prediktív funkcióval bírnak a koronavírus iránti vulnerabilitás és fogékonyság terén.

A disszertációban foglalt eredményeink alapján magas vérnyomásban szenvedő páciensek csoportjában RAAS gátló kezelés mellett (ACEi, ARB) 50%-kal magasabb ACE2 aktivitást tapasztaltunk egészséges kontrollcsoporthoz viszonyítva. A koronavírus pandémia berobbanása nyomán felmerül a kérdés, hogy a RAAS gátlók alkalmazása vajon hozzájárulhat-e közvetve vagy közvetlenül a koronavírus okozta mortalitási számok növekedéséhez? Ezen gondolat alapját 3 előzetes megfigyelés szolgáltatta: koronavírusos betegek között a magas vérnyomás betegségben szenvedő páciensek incidenciája magasabbnak bizonyult ⁽⁹²⁾; állatmodelles preklinikai modellek alapján RAAS gátló terápia alkalmazása, emelkedő ACE2 aktivitásértékeket eredményezett; harmadsorban pedig maga a patofiziológiai háttér, miszerint a sejtfelszíni ACE2 receptor bejutási kapuként szolgál a SARS-CoV-2 kórokozó számára. Kísérletes munkám igyekezett ezen kérdéskört árnyalni. Munkacsoportunk által előzetesen már publikált, újszerű hígítási módszerrel határoztuk meg az alkalmazott ACE gátló terápia hatékonyságát. Ezen módszerrel tudtuk elemezni a keringő ACE2 aktivitás és az ACE gátló terápia hatásosságának relációját. Az ACE gátló terápia elhagyása egyrészt (értelemszerű módon) magasabb vérnyomás értékekben testesült meg, másrészt azonban az ACE gátlás hatékonysága nem befolyásolta a keringő ACE2 szinteket. Korábbi és jelenlegi experimentális megfigyeléseink alapján a keringő ACE2 aktivitásértékek jól korrelálnak a humán szív ACE2 expressziójával

(biomarker funkció, akár szív irányú koronavírus érintettség monitorizálására). Tüdőszövet esetében hasonló kapcsolat nem figyelhető meg. Korábbi preklinikai kutatási eredmények szintén támogatják ezen megfigyeléseket. A keringő- és tüdőszöveti ACE2 kapcsolatának hiánya több elméleti-gyakorlati tényezővel magyarázható. Egyrészt a humán szívben fellelhető ACE2 expresszió közel négyszerese a tüdőszövetben megfigyelhető ACE2 expresszióknak, továbbá lehetséges, hogy a szívizomszövetben működő ACE2 expresszió/szekréciónak mechanizmus effektívebbnek tekinthető, mint tüdőszöveti társáé. Alternatív szervek/szervrendszerek (pl. gasztrointesztinális szervrendszer) ACE2 szekréciónak való aktív szerepvállalása szintén felmerül további lehetőségként. Érdekesként megemlíthető, hogy koronavírusal fertőződött betegek közel 70%-a számolt be a betegség aktív fázisában gyomor-bélrendszeri panaszokról.

A keringő ACE2 aktivitásértékek konzekvensen magasabbnak bizonyultak férfiak körében nőkkel összevetve, igazolva korábbi, hasonló tudományos megfigyeléseket. Elmondható továbbá, hogy ezen nemfüggő ACE2 aktivitásbeli különbség kórképtől függetlenül megfigyelhető, ami egy egyéni, nonspecifikus szekréciónak mechanizmusra utalhat. Szöveti expresszió szintjén érdekes módon, nem találtunk érdemi, nemfüggő különbséget bal kamrában, illetve tüdőben mért értékek terén. Magas vérnyomással diagnosztizált páciensek csoportjában magasabb testtömeg index, magasabb keringő ACE2 aktivitásértékeket vont maga után. Ezen betegekben korfüggő ACE2 aktivitásemelkedést figyeltünk meg, kiegészítve, eddigi hasonló megfigyeléseket.

ACE2 és a SARS-CoV-2 kapcsolatát árnyaló eredményeink (indirekten) támogatják az ESC 2020-as *“position statement-jét”* miszerint, az antihipertenzív gyógyszerek aktív koronavírusos megbetegedésben való elhagyása sem klinikai, sem tudományos oldalról nem indokolt (hiányzó evidencia).

6.3. Limitációk

A genotípusfüggő szöveti-, illetve keringő ACE kapcsolatát vizsgáló munkánkban egy egycentrumos, etnikailag homogén kaukázusi (magyar) betegsoporton folytattuk vizsgálatunkat ennél fogva az ACE gátló terápiára és annak hatásosságára vonatkozó klinikai adataink csupán feltáró jellegűnek tekinthetőek. Szöveti elérhetőség és humánetikai szempontok nyomán párhuzamos tüdő- és szív minták vételezésére nem volt lehetséges. Szívizomszöveti genotípusfüggő ACE expresszió mérésre és az ACE gátló terápia szívizombeli monitorizálásra nem került sor.

ACE2 és a koronavírus pandémia viszonyát taglaló eredményeink retrospektív klinikai adatokon és mintagyűjtésen alapulnak. A vizsgálati populáció etnikailag homogén, kaukázusi (magyar) betegsoportot reprezentál. Koronavírussal fertőzött egyének vér- vagy szövetmintáit munkánkhoz nem tudtunk felhasználni. Tüdőmintáink különböző individuális tüdőbetegségekkel (tüdő adenokarcinóma, szarkoidózis, légmell) bíró páciensek közül kerültek gyűjtésre. A vizsgálati populációban koronavírussal fertőzött betegek mintái nem szerepelnek, így a prezentált eredmények ezen szempontból áttételesek.

7. A doktori értekezésben szereplő új tudományos eredmények

Kísérletes eredményeink alapján az alábbi új megállapításokat fogalmazzuk meg:

- a) A keringésben jelen lévő, genotípusosan meghatározott humán ACE aktivitás- és expresszióértékei nem korrelálnak tüdőszövetben mérhető ACE aktivitás- és expresszióértékekkel.
- b) A keringő ACE aktivitás erős korrelációt mutat szívizomban mért ACE aktivitással szívelégtelen betegek mintái alapján.
- c) A keringő- és tüdőszöveti humán ACE endogén gátlást mutat.
- d) A keringésben jelen lévő ACE2 összefüggést (növekedést) mutat a kardiovaszkuláris kontinuum progresszív stádiumaival és szerepet játszhat a koronavírus fertőzés nyomán igazolt, magasabb kardiovaszkuláris mortalitás kialakításában.

8. Összefoglalás

Jelen dolgozatban bemutatott experimentális eredményeink alapján a keringésben jelen lévő genotípusosan meghatározott, humán ACE aktivitás és expresszió nem kizárólag a tüdőszövetből származik. Saját eredményeink, illetve modern molekuláris biológiai technikákon nyugvó adatbázisok megfigyelései nyomán kijelenthető, hogy a szívben, a gasztrointesztinális-, kiválasztó- és urogenitális traktusokban kitüntetett mennyiségben van jelen az ACE (illetve az ACE2), árnyalva ezen molekulák termelődési- és metabolikus sokszínűségét a humán szervezetben.

A humán, keringő ACE2 biomarkerként értelmezhető a kardiovaszkuláris kontinuum progresszív stádiumaiban, illetve kardiális/szív-érrendszeri érintettséggel terhelt koronavírus fertőzés esetén, ennél fogva magyarázatot nyújthat kardiovaszkuláris terhelt betegek magasabb mortalitási számaira koronavírus fertőzésben. A keringő ACE2 összefüggést mutat továbbá a nemmel és kardiovaszkuláris rizikófaktorokkal (BMI, vérnyomás, életkor). ACE gátló terápia elhagyása (a farmakológiai ACE gátlás mértéke) nem befolyásolja a keringő ACE2 szintjét, így ezen gyógyszerek aktív koronavírusos megbetegedésben való elhagyása nem indokolt.

9. Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/1/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

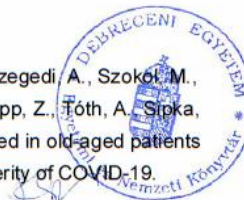
Jelölt: Bánhegyi Viktor
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10057399

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Fagyas, M.*, Bánhegyi, V.*, Uri, K., Enyedi, A., Lizanecz, E., Mányiné Siket, I., Mártha, L., Fülöp, G. Á., Radovits, T., Pólos, M., Merkely, B., Kovács, Á., Szilvássy, Z., Ungvári, Z., Édes, I., Csanádi, Z., Boczán, J., Takács, I., Szabó, G., Balla, J., Balla, G., Seferović, P. M., Papp, Z., Tóth, A.: Changes in the SARS-CoV-2 cellular receptor ACE2 levels in cardiovascular patients: a potential biomarker for the stratification of COVID-19 patients. *GeroScience*. [Epub ahead of print], 2021.
* Megosztott első szerzős közlemény.
IF: 7.713 (2020)
2. Bánhegyi, V., Enyedi, A., Fülöp, G. Á., Oláh, A., Mányiné Siket, I., Váradi, C., Bottyán, K., Lódi, M., Csongrádi, A., Umar, M. A. J., Fagyas, M., Czuriga, D., Édes, I., Pólos, M., Merkely, B., Csanádi, Z., Papp, Z., Szabó, G., Radovits, T., Takács, I., Tóth, A.: Human Tissue Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Activity Is Regulated by Genetic Polymorphisms, Posttranslational Modifications, Endogenous Inhibitors and Secretion in the Serum, Lungs and Heart. *Cells*. 10 (7), 1-13, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells10071708>
IF: 6.6 (2020)

További közlemények

3. Fagyas, M., Kertész, A. B., Mányiné Siket, I., Bánhegyi, V., Kracsó, B., Szegedi, A., Szokol, M., Vajda, G., Rácz, I., Gulyás, H., Szkibák, N., Rácz, V., Csanádi, Z., Papp, Z., Tóth, A., Sipka, S. i.: Level of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 activity is highly elevated in old-aged patients with aortic stenosis: implications for ACE2 as a biomarker for the severity of COVID-19. *GeroScience*. 43 (1), 19-29, 2021.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s11357-020-00300-2>
IF: 7.713 (2020)





4. Fülöp, G. Á., Oláh, A., Csipő, T., Kovács, Á., Pórszász, R., Veress, R., Horváth, B., Nagy, L., Bódi, B., Fagyas, M., Helgadottir, S. L., Bánhegyi, V., Juhász, B., Bombicz, M., Priksz, D., Nánási, P. P. i., Merkely, B., Édes, I., Csanádi, Z., Papp, Z., Radovits, T., Tóth, A.: Omecantiv mecarbil evokes diastolic dysfunction and leads to periodic electromechanical alternans. *Basic Res. Cardiol.* 116 (1), 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-021-00866-8>
IF: 17.165 (2020)
5. Lódi, M., Bánhegyi, V., Bódi, B., Gyöngyösi, A., Kovács, Á., Árokszállási, A., Hamdani, N., Fagyas, M., Édes, I., Csanádi, Z., Czuriga, I., Kisvárday, Z., Lekli, I., Bai, P., Tóth, A., Papp, Z., Czuriga, D.: Prophylactic, single-drug cardioprotection in a comparative, experimental study of doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J. Transl. Med.* 18 (1), 1-48, 2020.
IF: 5.531
6. Santer, D., Nagel, F., Gonçalves, I. F., Kaun, C., Wojta, J., Fagyas, M., Krššák, M., Balogh, Á., Papp, Z., Tóth, A., Bánhegyi, V., Trescher, K., Kiss, A., Podesser, B. K.: Tenascin-C aggravates ventricular dilatation and angiotensin-converting enzyme activity after myocardial infarction in mice. *ESC Heart Failure.* 7 (5), 2113-2122, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ehf2.12794>
IF: 4.411
7. Nagy, L., Gödény, I., Nánási, P. P. i., Leskó, Á., Balogh, L., Bánhegyi, V., Bódi, B., Csipő, T., Csongrádi, A., Fülöp, G. Á., Kovács, Á., Lódi, M., Papp, Z.: A szív pozitív inotróp támogatása a miozin-aktivátor hatású omecantiv-mecarbil segítségével. *Cardiol. Hung.* 47 (1), 69-76, 2017.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 49,133

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
14,313

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

Debrecen, 2022.01.05.



10. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani elsősorban témavezetőmnek **Professzor Dr. Tóth Attilának**, akinek szakmai-emberi tanácsaira, támogatására mindig számíthattam Ph.D. tanulmányaim alatt. Köszönöm a példamutatást a tudatos kísérlettervezés, a minőségi tudományos publikálás és a szakmai elhivatottság terén.

Tisztelettel köszönöm tanszékvezetőnknek **Professzor Dr. Papp Zoltánnak**, hogy biztosította számomra a kutatómunka eszközös- és szakmai-anyagi háttérét, illetve támogatott tudományos munkámban és ösztöndíjpályázataimban.

Köszönetet szeretnék mondani **Dr. Fagyas Miklós, Dr. Czuriga Dániel és Dr. Csató Viktória** tanszéki kollégáimnak, illetve **Dr. Bodoki Leventének** szakmai segítségükért, tanácsaikért és a közös munkáért.

Külön köszönöm **Mányiné Siket Ivetta** laboratóriumi asszisztens önzetlen segítségét, aki nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg ténylegesen.

Kollaborációs partnereink közül kiemelt köszönettel tartozom a Debreceni Egyetem **Mellkasebészeti Tanszék munkatársainak, Dr. Lódi Máriának, Dr. Varga Alízna, Professzor Dr. Bácsi Attilának, Prof. Dr. med. Bruno Podessernek és Dr. Kiss Attilának.**

Köszönöm szépen a **Debreceni Egyetem Klinikai Fiziológiai Tanszék** minden volt és jelenlegi munkatársának készséges segítségét és támogatását kutatómunkámban.

Köszönöm Családomnak, Édesanyámnak, Feleségemnek az odaadó támogatást.

Munkámat Kisfiámnak Medárdnak és Kislányomnak Otíliának ajánlom.

A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00043, GINOP-2.3.2-15-2016-00050 és az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 pályázatok támogatták. A projekt az Európai Unió támogatásával és Magyarország Kormányának társfinanszírozásával valósult meg.

