

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**AZ ANGIOTENZIN KONVERTÁZ ENZIM (ACE) SZEREPE
KARDIOVASZKULÁRIS KÓRKÉPEKBEN**

Dr. Daragó Andrea

Témavezető: Dr. Tóth Attila



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2015

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS.....	4
A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) működése	6
A RAAS gyógyszeres befolyásolása	8
Az ACE genotípus jelentősége	10
Endogén ACE szabályozás	11
A koronária bypass műtét jelentősége.....	12
CÉLKITŰZÉSEK	16
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	17
Etikai engedély	17
A vérminták gyűjtése, szérum és DNS izolációja	17
Az ACE aktivitás mérése	17
A szérum ACE koncentrációjának mérése	18
Az ACE aktivitás számítása hígítatlan humán szérumban	19
Bypass műtét kapcsán humán szövetminták gyűjtése	19
Bypass graftok vazokonstriációjának mérése.....	20
Bypass műtött betegek szöveti ACE expressziójának mérése	21
Az ACE I/D polimorfizmusának meghatározása.....	21
Statisztikai analízis.....	21
EREDMÉNYEK	22
DISZKUSSZIÓ	45
ÖSSZEFOGLALÁS.....	53
SUMMARY.....	54
TÁMOGATÁS	55
IRODALOMJEGYZÉK.....	56
Köszönetnyilvánítás	69

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACE: angiotenzin konvertáz enzim

ACE 2: angiotenzin konvertáz enzim 2

ACTH: adrenokortikotróp hormon

ADH: antidiuretikus hormon

Ang I: Angiotenzin I

Ang II: Angiotenzin II

Ang 1-7: angiotenzin 1-7

ARB: angiotenzin receptor blokkoló

AT1R: angiotenzin II 1. típusú receptora

AT2R: angiotenzin II 2. típusú receptora

CABG: koronária by-pass műtét

DNS: deoxiribonukleinsav

ECMO: extrakorporális membrán oxygenátor

EECP (Enhanced External Counter Pulsational therapy): külső ellenpulzációs pumpa

GFR: glomeruláris filtrációs ráta

GnRH: gonadotropin-releasing hormon

HDL (high-density lipoprotein): nagy sűrűségű lipoprotein

HSA: humán szérum albumin

Lp(a): lipoprotein (a)

NO: nitrogén-monoxid

NS: nem szignifikáns

PAI 1: plazminogén aktivátor inhibitor 1

PAI 2: plazminogén aktivátor inhibitor 2

PCR: polimeráz-lánreakció

RAAS: renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

BEVEZETÉS

A kardiovaszkuláris halálozás világszerte a vezető halálokok közé sorolható, az összes halálozás egyharmadát teszi ki (Lozano és mtsai. 2012). A kardiovaszkuláris rendszert érintő megbetegedések előfordulási gyakorisága függ az adott ország társadalmi és gazdasági fejlettségi szintjétől (Collaboration 2013). A fejlett országokban a daganatos megbetegedésekkel összevetve közel azonos, magas incidenciát mutatnak (Puymirat és mtsai. 2013). A magasabb életszínvonalon élő társadalmakban, így az Amerikai Egyesült Államokban a szív- és érrendszeri megbetegedések előfordulási gyakorisága már a XX. század elején, az 1930-as években látványosan megemelkedett (Stamler 1985). A világon első ízben az USA-ban indítottak a szív- és érrendszeri megbetegedések etiológiájának, rizikófaktorainak tisztázása céljából átfogó, prospektív vizsgálatot, mely közel 50 év után még napjainkban is tart, követve Framingham városka lakosainak aktuális egészségi állapotát, illetve annak változásait (Dawber és Kannel 1958) (Dawber és Kannel 1966). Ezen vizsgálatnak köszönhető, hogy az ateroszklerózis folyamatában kikristályosodott a vérsírok szerepe, fontossága, letisztult a hipertónia, diabétesz jelentősége, a dohányzás egyértelműen káros volta. A Framingham study erősítette meg a minor rizikófaktorok közül a helytelen táplálkozás, ülő életmód, elhízás szerepét, rávilágított a homociszteinszint, a lipoprotein(a) [Lp (a)] szintjének valamint nőknél a perimenopauzális változásoknak a jelentőségére (Kannel 2002) (Rosito és mtsai. 2004). A kutatók jelenleg a betegségek hátterében álló genetikai eltéréseket kutatják a vérmintákból létrehozott „DNS-könyvtárak” segítségével (Peter és mtsai. 2005).

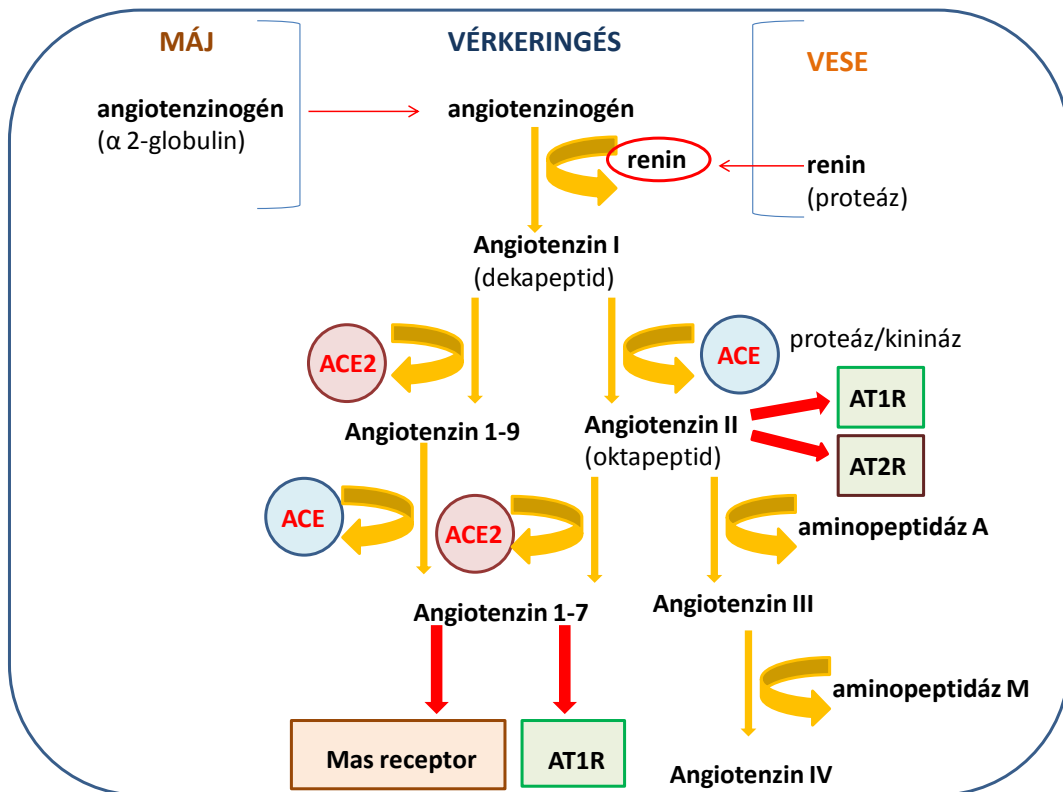
A szív és érrendszer patofiziológiája számos változó súlyosságú megbetegedés formájában ölthet testet. Általában a rizikófaktorok megjelenésével kezdődik, fokozva az ateroszklerózis progresszióját, majd miokardialis infarktusból, stroke-ból, illetve a végtagi ütőerek elzáródásából végződik. A patofiziológiai folyamatok azonban nem csak az érrendszert érintik. A nekrotizált területeken kötőszövetes átépülési folyamat (remodelling) indul el, mely hosszú távon az adott célszerv elégtelenségéhez, például szívelégtelenség, kardiomiopátia kialakulásához, a szívizomzat elgyengüléséhez, a szívüreg kitérüléséhez vezethet (Velagaleti és mtsai. 2008). Mindezen folyamatok a beteg számára, amennyiben az akut eseményen szerencsésen túljutott, hosszú távú,

életminőségét fokozatosan és jelentősen rontó állapotot eredményeznek, majd egyénileg eltérően, de átlagosan 5-15 éven belül halálozáshoz vezethetnek (Go és mtsai. 2013). A társadalom számára egyre jelentősebbé válik az iszkémiás kardiomiopátiás betegcsoport, mivel a primer koronária intervenció elterjedését követően, az akut szívizominfarktus okozta mortalitás világszerte látványosan visszaesett (Keeley és mtsai. 2003), viszont a túlélő betegek képezik a szívelégtelen beteg populáció igen nagy hányadát (Maron és mtsai. 2006).

Az iszkémiás szívizomzat kezelésére mára már számos lehetőség áll rendelkezésünkre. Alapvető terápiás eszköztárunk a gyógyszeres kezelés, ezen belül az acetilszalicilsav használata, béta-blokkolók, Ca^{2+} -csatorna blokkolók, illetve I_f -csatorna gátlószerek alkalmazása, tüneti szerként nitrát terápia folyamatos és *ad hoc*, rohamokra használt alkalmazása (Fihn és mtsai. 2014). Prevenációs céllal, de bázis terápiaként adjuk az angiotenzinkonvertáz enzim (ACE) gátlókat, angiotenzin receptor blokkolókat (ARB), a koleszterin szintézist csökkentő sztatinokat és a vékonybél Niemann-Pick sejtjeiben a koleszterin felszívódását gátló ezetimibet (Fihn és mtsai. 2014). Szintén főképp tüneti szerként használjuk a mitokondriumokban az aerob anyagcserét „erősítő” trimetazidine-t (Montalescot és mtsai. 2013). A szekunder prevenció célja a már igazolt, gyakran maradandó szervkárosodást okozó érlemezés progressziójának mérséklése, leállítása, esetlegesen - például bizonyos sztatinok esetében, így az ASTEROID vizsgálatban (Nissen és mtsai. 2006) - visszafordítása. A fent említett gyógyszeres terápia, mely mind primer, mind szekunder prevencióra hatékony, a koronária meszesedés igazolása után invazív terápiás eljárásokkal (perkután koronária angioplasztika és koronária by-pass műtét) egészíthető ki az iszkémia teljes megoldásának, az életminőség javításának céljából. Instabil esetben, azaz nyugalmi állapotban jelentkező mellkasi fájdalom, valamint kardiogén sokk fennálltakor áthidaló megoldásként (úgynevezett bridge-terápia) keringéstámogató eszköz: intraaortikus ballonpumpa kerülhet behelyezésre, esetleg ECMO (extrakorporális membrán oxigenátor) használható (Loforte és mtsai. 2014). Az eszközös terápia új lehetőségét jelenti szekunder és terciár preventív céllal terápia rezisztens, úgynevezett refrakter anginás esetekben a külső ellenpulzációs pumpa (EECP) sorozatos használata mind az anginás rohamok, mind a szívelégtelenség tüneteinek mérséklése céljából (Montalescot és mtsai. 2013).

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) működése

Az orvostársadalom kutatási erőfeszítéseinek eredménye a ma már közismert, számos aspektusból részletesen vizsgált renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) feltárása (Gross 1968). A RAAS valójában hormonrendszerként működik, feladata a szervezet só-, vízháztartásának és a vérnyomásnak a szabályozása.



1. ábra: A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) működésének vázlata

ACE: angiotenzin konvertáz enzim, ACE 2: angiotenzin konvertáz enzim 2, AT1R: angiotenzin II 1. típusú receptora, AT2R: angiotenzin II 2. típusú receptora

A folyamat első lépéseként a májban szintetizálódó angiotenzinogén (alfa2-globulin) N-terminális végéről a vese juxtaglomeruláris sejtjeiben termelődő proteáz, a renin Angiotenzin I-et (decapeptid) hasít le. A renin felszabadulását a vese alacsony perfúziós nyomása, fokozott β_1 -szimpatikus aktivitás, hyponatremia válthatja ki. Az Angiotenzin I – Angiotenzin II átalakulást az angiotenzin konvertáz enzim (ACE) katalizálja, mely szintén

proteáz. Az ACE az Angiotenzin I (AngI) C-terminálisáról 2 aminosavat hasítva eredményezi az Angiotenzin II (AngII) nevű oktapeptidet (Yang és mtsai. 1970). Mivel az ACE más folyamatokban is részt vesz, például inaktíválja a bradykinint, ezért kinináznak is hívják (Greenberg és mtsai. 1979). Az Ang I – Ang II átalakulás más ACE-től eltérő alternatív útvonalon például a kimáz által is végbemehet (Tom és mtsai. 2003). Az ACE az Ang I és a bradykinin hasításán kívül egyéb molekulák átalakításában is közreműködik: például P-anyag (substance P), gonadotropin releasing hormon (GnRH), amiloid- β peptid, kallidin. Az Ang II a sejtek 1-es típusú Angiotenzin II receptoraihoz (AT1R) és 2-es típusú Angiotenzin II receptoraihoz (AT2R) kötődik. Az Ang II a két receptoron ellentétes hatást vált ki, bár az AT2R-aktiváló hatása elenyésző az AT1R-hez képest. Az Ang II a kardiovaszkuláris rendszerben mind az artériák, mind a vénák AT1 receptorain az intracelluláris inozitol út és a G-protein útvonal segítségével vazokonstriktiót vált ki. Az Ang II prothrombotikus hatással is rendelkezik: a vérlemezkék adhéziójára és aggregációjára is hat, stimulálja a plazminogén aktivátor inhibitor 1 és 2-t (PAI 1, PAI 2) (Dandona és mtsai. 2007) (Weir és Dzau 1999). Az Ang II a simaizom sejtek és szívmusculus sejtek hipertrófiáját okozza, fokozza a hipertónia, az ateroszklerózis progresszióját, valamint endotél sérülések esetén - a trombocita aktiváció által - a thrombotikus kaskád beindulását (Dandona és mtsai. 2007) (Weir és Dzau 1999). A posztganglionális szimpatikus rostokra direkt hatva fokozza a norepinefrin elválasztását (Lees és mtsai. 1993). Szintén AT1R-on hatva fokozza a vazopresszin elválasztást (ADH), az adrenokortikotrop hormon (ACTH) valamint a mellékvesekéreg aldoszteron elválasztását, utóbbi által fokozva a vese Na^+ -visszatartását, és a K^+ -kiválasztást (Biron és mtsai. 1961) (Lees és mtsai. 1993). A vese artériáiban, afferens arterioláiban gyenge, az efferens arterioláiban erősebb vazokonstriktiót okoz. A tubulo-glomeruláris feedback érzékenységét növeli, a vesemedulla vérátáramlását csökkenti (Belleau és Earley 1967). A mezangiális sejteket kontrahálja, így a kiválasztó felszínt csökkenti. Vizsgálatok igazolták, hogy AT1R-on Ang II hatásra fokozódik a sejtek migrációja, növekedése, a szövetek kötőszövetes átépülése, azaz a fibrózis folyamata (Schieffer és mtsai. 1994). A zsírszövetben is fokozza a lipogenezist és csökkenti a lipolízist (Yvan-Charvet és Quignard-Boulangé 2011). AT2R-on hatása ellentétes: fokozza a NO-termelést, vazodilatációt vált ki (Schulman és Raj 2008). Az Ang II-t az aminopeptidáz A hasítja a rövidebb féléletidejű és ez által csekélyebb, de elődjével egyező hatású angiotenzin III-má, melyet az

aminopeptidáz M tovább hasít biológiailag kevésbé hatékony angiotenzin IV-gyé. A RAAS egyik legfiatalabb tagja az angiotenzin konvertáz enzim 2 (ACE 2) (Oudit és mtsai. 2003), mely az Ang I-t és II-t is képes hasítani, ezzel csökkentve a szubsztrátok mennyiségét (Oudit és mtsai. 2003). A keletkezett angiotenzin 1-7 (Ang 1-7) Mas receptorokon többnyire az Ang II AT1R-on mediált hatásával ellentétes válaszokat generál, például csökkenti a remodelling folyamatát (Ferrario 2011). Az AT1R-hoz kapcsolódva azzal egy hetero-oligomert képez, ezáltal csökkenti annak hatásait, például a simaizomsejt proliferációt és migrációt (Hayashi és mtsai. 2010). Az Ang 1-7 különböző szervekben, így a tüdőben, vesében, májban javítja a gyulladásszerű és fibrotikus folyamatokat (Chen és mtsai. 2013). Az anyagcserére is pozitív hatásai vannak: javítja a glükózfelvételt és a lipolízist, csökkentve az inzulinrezisztenciát és a dyslipidémiát (Than és mtsai. 2013). Hatással van a tanulásra és a memóriára, javítja az iszkémiás stroke elleni védekező mechanizmusokat (Jiang és mtsai. 2013). Az Ang 1-7-nek a reprodukciós rendszerre is jótékony hatása van: elősegíti az ovulációt, a spermiogenezist és a szexuálsteroidok szintézisét (Pereira és mtsai. 2009). Legvégül az Ang 1-7-nek a jövőben szerepe lehet a tumorellenes terápiában, mivel gátolni képes az angiogenezist és sejtproliferáció folyamatát (Passos-Silva és mtsai. 2013) (1. ábra).

A RAAS gyógyszeres befolyásolása

A fent vázolt szöveti RAAS rendszer jelentősége élettani szempontból hatalmas. A rendszer különböző pontjainak befolyásolása már régóta foglalkoztatja a kutatókat. Ennek eredményeként született meg az ACE gátlók népes családja, majd az angiotenzin receptor blokkolók nem kevésbé nagy számú csoportja, legutóbb pedig a direkt renin inhibitorok, melyek közül egy, az aliskiren a napi orvosi gyakorlatban is bevezetésre került (Robles és mtsai. 2014).

Az első ACE gátló a captopril volt, melyet a '70-es évek végén ismertettek (Ondetti és mtsai. 1977). Azóta világszerte legalább 16 ACE-gátló jelent meg a piacon. Kémiaiailag 3 csoportba sorolhatóak: 1., szulfhidril-csoportot (captopril), 2., dikarboxilát-csoportot (enalapril, lisinopril, perindipril, ramipril) és 3., foszfonát csoportot (fosinopril) tartalmazó vegyületek (Gomez és mtsai. 2013). A kifejlesztett vegyületek nagy része pro-drug, csupán a májban történő metabolizáció után válik aktívvá (Johnston és mtsai. 1986). A

captopril és a lisinopril viszont aktív hatóanyagok (Fyhrquist 1986). A különböző ACE gátlók a keringő ACE gátlásának időtartamában valamint a szöveti ACE gátlásának mértékében is eltérhetnek egymástól. Az ekvipotens dózisban alkalmazott ACE gátlók szöveti ACE gátló hatása több tényező függvénye. Ilyen a gátló molekula kötődésének erőssége az ACE C-terminálisához, a gátló molekula disszociációs kinetikája, valamint az ACE gátló szöveti penetranciája, lipofilitása (Dzau és mtsai. 2001). Utóbbit jól példázza a hasonló molekulaszervezetű trandolapril enalaprillal szemben tapasztalt 3-4-szer hatékonyabb szöveti penetranciája (Vittorio és mtsai. 2007), melyet a prolin-oldallánc lipofilebb indolilkarboxilsav-oldallánra cserélése okoz. Ezáltal a trandolapril kiválasztása megnyúlik, és az ACE gátló hatása kb. 10-szer erősebb lesz az enalaprilénál (Zannad 1993).

Bár kiterjedt információ áll rendelkezésünkre a vérkeringésben fellelhető RAAS elemeiről, működéséről, a RAAS moduláció orvosi jelentőségét sokak szerint a kevéssé ismert, már a '80-as években leírt szöveti renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer adja (Unger és mtsai. 1985). Azonban míg 20%-os primer végpont csökkentést (beleértve a mortalitást is) tudtak kimutatni a perindoprillal és ramiprillel végzett vizsgálatokban, a szekunder prevencióban adott, magasabb szöveti affinitású trandolaprillal és quinaprillal végzett vizsgálatok nem mutattak szignifikáns hatást a túlélésre és a koronária-események bekövetkezésének megelőzésére. Utóbbi esetben felmerült az ACE-gátlók osztály-specifikus hatásának esetleges hiánya. Ehelyett azonban valószínűbb, hogy az ACE-gátlók szöveti affinitásában tapasztalt eltérései állnak a háttérben.

Az ACE lehetséges célpont számos betegség kezelésében, így az ACE gátlók az 5. leggyakrabban használt gyógyszercsoport (Bian és mtsai. 2010). Hatékonyságukat számos nagy klinikai vizsgálat is bizonyította: az ACE gátlók csökkentik a kardiovaszkuláris halálozást, a non-fatális miokardiális infarktus vagy a szívleállás előfordulási gyakoriságát stabil koronária betegségben (Fox 2003), javítják a miokardiális infarktus prognózisát (NI Miocardico 1996), csökkentik infarktus után 5 héttel a mortalitást (Collaborative 1995), csökkentik a szívelégtelenség okozta mortalitást (Cohn és mtsai. 1991), gátolják a balkamrai remodelling folyamatát (Greenberg és mtsai. 1995), késleltetik a hipertónia megjelenését (Lüders és mtsai. 2008), csökkentik balkamra hipertrófiában a balkamrai tömeg-indexet (Cuspidi és mtsai. 2002), mérséklék diabéteszben a diabéteszes nefropátia kialakulásának valószínűségét, valamint a mikroalbuminuria incidenciáját (Jermendy és

Ruggenenti 2007) és az újonnan diagnosztizált diabétesz valószínűségét (Hoogwerf és Young 2000). A legutóbbi terápiás útmutatók már mindezeket evidenciaként fogalmazták meg (Taylor 2012)(McMurray és mtsai. 2012)(Hamm és mtsai. 2012)(Tendera és mtsai. 2011)(Wijns és mtsai. 2010), és így az ACE gátlók a legnagyobb mortalitású megbetegedések primer és szekunder prevenciójára bázis terápiaként adható gyógyszerekké váltak (Wald és Law 2003).

Az ACE genotípus jelentősége

Az ACE gátlók klinikai hatékonysága genetikailag determinálnak tűnik, miután az ACE gátló kezelés az afro-amerikai betegcsoportban kevésbé hatékony a kaukázusi rasszba tartozó betegekkel összevetve (Ferdinand 2003). Genetikai vizsgálatok világítottak rá arra, hogy az ACE expressziója az ACE génállományában inszerciós/deléciós (I/D) polimorfizmus által szabályozott, mely DD genotípusú egyéneknél kb. 50%-kal magasabb ACE expressziót eredményez, mint az II genotípus esetén (Rigat és mtsai. 1990). Eszerint a D allél jelenlétében megemelkedett ACE szérumszint felveti a D allél major kardiovaszkuláris rizikófaktor szerepét. A hipertónia mögött is felmerült a DD genotípus oki szerepe, melyet az első metaanalízis csupán részben tudott igazolni. A DD genotípusú betegek között a hipertónia gyakorisága 10%-kal nagyobb arányban, de nem szignifikáns mértékben volt kimutatható. Az egyik vizsgálat a DD genotípusú ázsiai nők csoportjában igazolta a hipertónia fokozott gyakoriságát (Staessen és mtsai. 1997), míg egy másik vizsgálat a kubai populáción belül nem tudott összefüggést találni a hipertónia és az ACE genotípus között (Companioni Nápoles és mtsai. 2007). A hipertónia kialakulásában a genetikai eltérések mellett a környezeti faktoroknak, az életmódbeli eltéréseknek és az etnikai eltéréseknek egyaránt meghatározó szerepük lehet. A kardiovaszkuláris betegségcsoporton belül az iszkémiás stroke független prediktora a D allél jelenléte (Sharma 1998), hasonló, szignifikáns összefüggést a miokardiális infarktusnál ezidáig nem igazoltak. Hara és munkatársai csupán nem szignifikáns eltérést találtak a D allél hordozóknál, de ha az angiotenzinogén T1311 gén C alléljára homozigóta volt és ACE D allél hordozó együttesen, akkor már az akut miokardiális infarktus utáni mortalitási mutatók szignifikánsan megemelkedtek (Hara és mtsai. 2014). Egy 14727 beteget vizsgáló metaanalízis mutatott rá arra, hogy a DD allélt hordozó diabéteszes betegek között a

nefropátia kialakulásának valószínűsége nagyobb (Ng és mtsai. 2005). Az ACE I/D polimorfizmus diabéteszes retinopátiában betöltött szerepe még kérdéses, több mellette és ellene (Globocnik-Petrovic és mtsai. 2003) szóló tanulmány is napvilágot látott. A DD genotípus szerepét iráni és japán populációkban látták bizonyítottnak (Matsumoto és mtsai. 2000) (Fegghi és mtsai. 2008). Sayed-Tabatabaei 2003-ban publikálta 23 cikk, 9833 betegén elvégzett metaanalízisét, mely az *arteria carotis* intima-média vastagság aránya alapján vizsgálta az ateroszklerózis mértékét. Ebben a közleményben a DD genotípusú betegeknél szignifikánsan magasabb volt az ateroszklerózis mértéke. Az eredmények még szembetűnőbbek voltak cerebrovaszkuláris megbetegedés, diabétesz vagy hipertónia egyidejű fennállása esetén (Sayed-Tabatabaei és mtsai. 2003).

Az ACE genotípus vizsgálata túlmutatott a kardiovaszkuláris rendszeren. Az II genotípus pozitív hatású a születéskörüli testsúlyra, illetve testsúly-gyarapodásra. (Kajantie és mtsai. 2004) Az ACE I/D polimorfizmusnak további jelentőséget tulajdonítanak a kaukázusi rasszhoz tartozó egyének daganatos megbetegedésének fokozott rizikójában (pl. emlő-I allél, szájürei daganatok-II genotípus, gyomorrák-ID genotípus, kolorektális karcinómák nőknél ID, férfiaknál ID és DD genotípus esetén gyakoribbak) (Zhang és mtsai. 2014). A DD genotípus megléte fokozza a Schönlein-Henoch purpura és az annak következtében kialakuló nephritis valószínűségét (Li és mtsai. 2014) Az II genotípus az Alzheimer kór ellen bizonyos védelmet jelenthet (Kehoe és mtsai. 1999), míg a DD genotípus fokozza a Parkinson-kór kialakulási gyakoriságát (Lin és mtsai. 2002). Csontritkulás hatékonyabb kezelése esetén mindkét nemben előnyös az ACE II genotípus megléte (Pérez-Castrillón és mtsai. 2003).

Endogén ACE szabályozás

Az endogén ACE gátlás lehetősége már az 1970-es évek végén megfogalmazódott. 1979-ben egymástól párhuzamosan két munkacsoport is közölte eredményeit. Ryan és munkatársai humán, tengerimalac és oposszum szérumból, valamint vizeletből mutattak ki egy kb. 10 kDa molekulaméretű ACE gátlásra képes anyagot (Ryan és mtsai. 1979). Klauser és munkacsoportja egy forgalomban lévő plazma készítményből a humán albumint és a tartósítószerként alkalmazott acetil-triptofánt azonosította endogén ACE gátlóként. Azt is igazolták, hogy az albumin C-terminális része önmagában jelentősebb

endogén gátló hatással bír, mint a teljes fehérje. (Klauser és mtsai. 1979). A '80-as években négy munkacsoport publikálta eredményeit az endogén ACE gátlás témakörében. Közülük Liebermann és munkatársainak eredménye emelhető ki, akik egy 50 kD tömeget meghaladó, reverzibilisen gátló molekulát izoláltak szarkoidózisos betegek szérumból, mely megnehezítette az ACE szérumszintjének mérését. A szérum kifejezett hígítása (8x) után a mérés kivitelezhetővé vált (Lieberman és Sastre 1986). A '90-es évek végén Thevananther és társai humán szérumból egy 14 kD molekulatömegű, ACE gátló hatással bíró fehérjét különítették el affinitás kromatográfia és poliakrilamid gélelektroforézis segítségével (Thevananther és Brecher 1999).

Az elmúlt időszakban megerősítette munkacsoportunk a humán szérum albumin (HSA) endogén ACE gátló tulajdonságait. A HSA $5,7 \pm 0,7$ mg/ml IC₅₀ értékkel gátolta a szérum ACE aktivitást, míg az élettani humán szérum albumin koncentrációja 35-52 mg/ml sávban volt. Ezek az adatok azt jelzik, hogy a humán szérum albumin szignifikánsan képes gátolni az angiotenzin konvertáz enzimet *in vivo* (Fagyas, Úri, Siket, Daragó, és mtsai. 2014; Fagyas, Úri, Siket, Fülöp, és mtsai. 2014). Azt találtuk, hogy függetlenül az ACE expresszió szintjétől a humán szérum albumin nagyon alacsony szinten stabilizálja az angiotenzin konvertáz enzim (ACE) aktivitását.

A koronária bypass műtét jelentősége

A leggyakrabban elvégzett kardiovaszkuláris sebészeti eljárás a koronária bypass műtét (CABG), mely során új csatornákat létesítenek a beszűkült, illetve elzáródott erek mellett, hogy javuljon a nem megfelelő perfúziójú szövetek oxigén- és tápanyagellátása. Már az 1960-as évek óta használ a szívsebész társadalom *vena saphena* graftokat a koronária artériák áthidalása céljából (Favaloro 1968). Jelentős elterjedésüket rugalmasságuk, könnyű hozzáférhetőségük, alacsony disszekciós rátájuk magyarázza. Sajnos a gyakorlatban hamar kiderült, hogy a vénás graftok élettartama nem túl hosszú, különböző degeneratív folyamatok már a felhelyezést követő első évben úgynevezett korai degenerációt okozhatnak. Az első évben a saphena graftok 15-30%-a elzáródik, de a folyamat tovább halad, a műtét után 10 évvel a saphena graftok csupán 30%-a átjárható (Veldkamp és mtsai. 2000). Az okok keresése közben számos klasszikus magyarázatot is találhatunk a graftok ateroszklerotikus degenerációjának folyamata mögött: ilyen az

életkor, elhízás, dohányzás, hipertenzió, diabétesz, emelkedett vérszír szintek szerepe (Angelini 1992). A vénás graftok degenerációja a natív erekben tapasztalt folyamatoktól időbeni lefolyásában, valamint az egyes periódusokban kiemeltebb szerepet játszó etiológiai faktorokban eltérhet egymástól (Underwood és Coumbe 1994)(Bikdeli és mtsai. 2012). A degenerációs folyamatokban a szakirodalom megkülönböztet korai, azaz a műtét után közvetlenül elkezdődő és 1 évig tartó időszakot, valamint 1 év után tapasztalt, úgynevezett késői graft degenerációs periódust (Bourassa és mtsai. 1991). A legfőbb károsodást előidéző tényezőnek a vénás endothelium elégtelen adaptálódását tartják az artériás rendszer magasabb vérnyomásához, mely egy fajta mechanikus stresszként hat a vénás rendszerre (Cox és mtsai. 1991). A korai graft degeneráció mögött elsősorban technikai okok állnak, ilyen a vénás endotélium perioperatív sérülése (pl. felfújás okozta feszítő erők miatt), kanyargós vena graft lefutás (elősegíti a thrombociták kitapadását, összecsapzódását), a vénás graftok kiáramlási pályája és az artériák befogadó felülete közötti téraránytalanság (nehezített egyesítés, fokozódó lokális turbulencia nyíró hatása) (Joviliano és mtsai. 2011). Mindezek hatására az első hónapban a thrombotikus folyamatok, majd a 2-12. hónapban az intima hiperplázia játsszák a főszerepet (Joviliano és mtsai. 2011). A posztoperatív első év után az ateroszklerózis folyamata válik a legfőbb károsító folyamattá (Kim és mtsai. 2013). A mechanikus stressz hatására elsősorban az anasztomózis területén gyulladós sejtek, főként limfociták halmozódhatnak fel, melyek további citokineket bocsátanak ki fokozva a lokális gyulladást, nekrozis majd kalcifikáció folyamatát. Ezen folyamatok a natív *vena saphená*kban kevésbé, inkább az artériás rendszerben fellelhető ateroszklerotikus plakkok megjelenéséhez vezethetnek (Bikdeli és mtsai. 2012). Bár ezen plakkok atípusosak, kevésbé kalcifikáltak mint artériás társaik, felületüket vastagabb fibrin sapka fedi, ruptúrára, fokozott thrombogenezisre hasonlóan hajlamosak (Garratt és mtsai. 1991).

Habár egyre magasabb rizikójú betegek esnek át CABG műtéten, a perioperatív mortalitási ráta csökken (Ferguson és mtsai. 2002). Azonban azt is leírták, hogy az elmúlt 20 évben a bypass műtét után a betegek hosszú távú túlélése érdemben nem javult (Bradshaw és mtsai. 2002). Számos vizsgálat célozta meg az optimális gyógyszeres kezelés feltárását szekunder prevenciók céljával bypass műtött betegek esetén az ateroszklerózis progressziójának lassítása, az iszkémiás kardiomiopátia kialakulásának

késleltetése, újabb heveny kardiovaszkuláris esemény megelőzésének céljából (De Martino és mtsai. 2014) (Kuhn és mtsai. 2011). A posztoperatív szak kezelésére alapvonalbeli gyógyszernek minősül az acetilszalicilsav, béta-blokkolók, sztatinek és az ACE gátló vagy angiotenzin receptor blokkolók (ARB) csoportja (Montalescot és mtsai. 2013). Az alkalmazott gyógyszeres kezelés, valamint a betegek terápiahűsége azonban gyakorta nem követi a szakirodalomban javalltakat. Egy kanadai vizsgálatban az elbocsátáskor a betegek 90% feletti gyakorisággal kaptak aszpirint, sztatint és béta-blokkolót, addig az ACEI/ARB felhasználása csak 42% volt. Érdekességképpen elmondható, hogy az utánkövetésnél a betegek terápiahűsége igen magas, 85%-os volt, és az ACEI/ARB felhasználása is 65%-ra növekedett (Barry és mtsai. 2014). Hazai felmérések nem igazolják a magyar betegek ilyen kifejezett, hosszú távú terápiahűségét (Paragh és mtsai. 2007). A szekunder prevenciók terápia szigorú betartásának nem csupán egészségügyi, de gazdasági hozadéka is vannak. Egy bostoni munkacsoport prospektív vizsgálatában azt találta, hogy a béta-blokkoló, sztatint és ACEI/ARB hármas kombináció adása mellett akut miokardiális infarktuson átesett betegek esetén mind a bypass műtét után, mind a hagyományos gyógyszeresen kezelt csoportban a kardiovaszkuláris események előfordulási gyakorisága nem szignifikáns mértékben, de csökkent. A bypass műtött csoportban a 3-as kombináció ellenére a terápiahűség magasabb volt. Ugyanezen csoportban a betegek egyéb gyógyszer kiadásai csökkentek, és a betegek fordított általános egészségügyi ráfordítás is csökkent (Kulik és mtsai. 2013).

Az egyes felhasználásra kerülő graft típusoknak a nyitva maradása, illetve túlélése függ a graft szöveti összetételétől. Leghosszabb, akár teljes élethosszig tartó élettartama az *arteria mammaria internának* van. A kiperparált *arteria radialisok* átlagosan 10-15 évig maradnak átjárhatóak. Legrosszabb a nyitva maradási esélye - a már fentebb részletezett degenerációs folyamatok miatt - a *vena saphenának* (átlagosan 7-9 év). Egy kanadai munkacsoport szerint előre lehetne becsülni a vénás és artériás graftok nyitva maradási esélyeit. A diabétesz megléte, valamint biomarkerek közül a plazma fibrinogén, kreatinin és high-density lipoprotein (HDL), illetve a glutation-S-transzferáz $\alpha 3$ szintje jelzi előre a fokozott graft degenerációt (Yanagawa és mtsai. 2013). Összevetve az *arteria mammaria interna* graftot és *vena saphena* graftot kapott betegek rövid távú eseménymentes

túlélési időszakát (Bradshaw és mtsai. 2002), felmerül az igény a saphena graftok posztoperatív egyedi kezelésére a graft-túlélés javítása érdekében.

CÉLKITŰZÉSEK

- Korábbi klinikai vizsgálatokban megfigyelt, szérumban albumin által kiváltott endogén ACE gátlás jelenségének ellenőrzése.
- Az endogén ACE gátló szérumban albumin lehetséges szerepének feltárása az eltérő ACE szérumban szintek mellett.
- Az ACE I/D polimorfizmus kardiovaszkuláris szerepének feltárása magyar beteganyagunkon.
- Összefüggések azonosítása a koronária bypass graftként használt erek ACE expressziója és várható élettartama között egy személyre szabott terápia kialakításának reményében.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Etikai engedély

Minden vizsgálatunk a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Etikai Bizottságának (UDMHSC REC/IEC, 2894-2008) és a magyarországi Egészségügyi Tudományos Tanács engedélyével történt. Minden bevont betegről írásos beleegyező nyilatkozatot kaptunk.

A vérminták gyűjtése, szérum és DNS izolációja

A vérmintáinkat kétféleképp gyűjtöttük. 151, a DE OEC Kardiológiai Klinika ambulanciáján gondozott önként jelentkezőtől szokványos aseptikus technika segítségével perifériás vénás vérmintát vettünk (betegenként 1x10 ml natív és 1x5 ml alvadásgátolt vér levétele történt). További vérmintákat (n=76) kaptunk a DE OEC Szívsebészeti Klinikáján by-pass műtetre kerülő betegektől (1x10 ml natív és 1x5 ml alvadásgátolt vérminta). Az utóbbi vérminták szintén perifériás vénás vérből származtak. A natív vérmintákat 60 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A szérum és sejtes frakciókat 15 percig 1500 g-vel centrifugálva szétválasztottuk, majd további vizsgálatokig -20 °C-on tároltuk. Genomi DNS-t antikoagulált vénás vérből preparáltunk, melyhez DNS szeparációs kit-et (Qiagen) használtunk. A betegek kardiovaszkuláris rizikóját felmérő adatokat (morfometria, dohányzás, diabétesz, diszlipidémia, ejekciós frakció, vérnyomás paraméterek, vesefunkciós értékek, alkalmazott antitenzív, anti-ischemiás és sztatin terápia) részletesen kigyűjtöttük (1. táblázat).

Az ACE aktivitás mérése

Az ACE aktivitást Beneteau (Beneteau és mtsai. 1986), valamint Murray és munkatársai (Murray és mtsai. 2004) által leírt metodikák szerint mértük. Röviden, az ACE aktivitást mesterséges szubsztrát (FAPGG, N-[3-(2-furyl)acryloyl]-L-phenylalanylglycylglycine, Sigma-

Aldrich) segítségével határoztuk meg 8,2-es pH-n az alábbi reagensben: 25 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-etanszulfonsav), 0,5 mM FAPGG, 300 mM NaCl és a szérum kívánt hígítása. A vizsgálatokat 96 lyukú plate-en (Greiner-Bio One) 37 °C-on végeztük. Az optikai denzitás (340 nm) változást 5 perces intervallumokban legalább 90 percig vizsgáltuk (NovoStar plate reader, BMG Labtech). Az optikai denzitási értékeket a reakciós idő függvényében ábrázoltuk, és lineáris regressziós egyenest illesztettünk rá. Az illesztést és az eredményt $r^2 > 0,90$ esetén fogadtuk el. Az ACE aktivitást az alábbi egyenlet segítségével számítottuk:

$$\text{ACE aktivitás} = -(S/k) \times D,$$

ahol S az optikai denzitás csökkenésének mértéke (1/perc), k az optikai denzitás változása a FAPGG 1 nmol-jának teljes hasításáig, D a szérum hígítása. Az ACE aktivitást egységben (U) adtuk meg, ahol 1 U megfelel percenként 1 nmol FAPGG hasításának. Számos kísérletben a reakcióelegy humán szérum albumint (HSA, Human BioPlazma Manufacturing and Trading) is tartalmazott. A méréseket egy-egy mintán háromszor végeztük el, az eredményeket U/l szérum egységben adtuk meg. A captopril (ACE gátló) humán szérum ACE-ra gyakorolt gátló hatását 0,1 nM-1,0 mM-os koncentrációs sávban vizsgáltuk.

A szérum ACE koncentrációjának mérése

A szérum ACE koncentrációt a kereskedelmi forgalomban kapható humán ACE ELISA kit-tel (R&D Systems) mértük a gyári leíratnak megfelelően, kicsiny módosításokkal. Röviden, a plate-ek (Greiner-Bio-One) 80 ng/lyuk ACE elleni antitesttel voltak bevonva, a maradék kötőhelyek inert fehérjével (10 mg/ml borjú szérum albumin, Sigma-Aldrich) voltak blokkolva Dulbecco's foszfát-puffer sóoldatában (PBS, Gibco). Hígított reagenssel 100-szorosra hígított szérumot adtunk a felszínhez, majd biotinált detekciós antitesttel (20 ng/kád, 200-szoros hígítású streptavidine-konjugált torma-peroxidáz, a kit tartalmazza) jelölt antigén-antitest komplexeket juttattunk a kádakba. Végül a komplexek mennyiségét 0,3 mg/ml tetramethyl-benzidine-t, 0,1 μM H_2O_2 -t és 50 mM ecetsavat tartalmazó szubsztrát oldattal detektáltuk. A reakciót 20 perc után 0,5 M sósav hozzáadásával

állítottuk le. Az optikai denzitást 450 nm-en mértük. Az ACE koncentrációt a mintákban legalább 3 független kísérletben mértük, hogy a standard deviáció legfeljebb 15%-os legyen. A szérum ACE expresszió eredményét ng ACE/ml szérum mennyiségben tüntettük fel.

Az ACE aktivitás számítása hígítatlan humán szérumban

Hígítatlan szérumban az ACE aktivitást az alábbi képlet alapján számítottuk:

$$K_i = ([\text{Aktív ACE}] \times [\text{HSA}]) / [\text{Inaktív ACE}]$$

K_i a HSA gátlási állandója már korábban meghatározásra került (83 μM) (Fagyas, Úri, Siket, Fülöp, és mtsai. 2014). [Aktív ACE] - az ACE aktív formáinak koncentrációja. [Inaktív ACE] – az ACE gátolt formáinak koncentrációja. [HSA] – humán szérum albumin koncentráció kolorimetriás módszerrel meghatározva.

Számításaink során az alábbiakat vettük figyelembe:

[Teljes ACE mennyiség] = [Aktív ACE] + [Inaktív ACE], ahol a [Teljes ACE mennyiség]-et ELISA-val mértük,

$$[\text{Aktív ACE}] = (K_i \times [\text{Teljes ACE mennyiség}]) / ([\text{HSA}] + K_i).$$

Hígítatlan humán szérumban az aktivitás becslése érdekében ugyanazon beteg 20-szoros hígítású mintáiban mértük az ACE aktivitást, mely az [Aktív ACE] aktivitásával összefüggést mutatott, és amely esetben az ACE aktivitást a HSA által nem gátoltnak tekintettük.

Bypass műtét kapcsán humán szövetminták gyűjtése

Humán vaszkuláris szövetekben az angiotenzin konverzió vizsgálatára prospektív vizsgálatot végeztünk. Koronária bypass műtéten átesett betegektől nyertünk vérmintákat (korábban már említettük), valamint disztális *vena saphena* és *arteria mammaria* segmentumokat. A vizsgálatba 76 beteget vontunk be. A sebészi csoportot 4

szívsebész szakorvos alkotta, akik azonos technikával nyerték a mintaként szolgáló ér-graftokat. A felesleges, műtétekből visszamaradó graft szöveteket jéghideg fiziológiás sóoldatba (KREBS oldat, összetétele: 0,69 g NaCl, 0,035 g KCl, 0,028 g CaCl₂, 0,014 g MgSO₄, 0,21 g NaHCO₃, 0,016 g KH₂PO₄, 0,109 g glukóz, 0,022 Na-piruvát - feltöltve desztillált vízzel 100 ml-re, karbogénnel (5% CO₂- 95% O₂) buborékolatva, pH: 7.4) helyezték a szívűtőben, onnan szállítottuk laboratóriumunkba. A szövetmintákat funkcionális mérésekre (izometriás kontraktilis erő mérése), és az ACE szöveti expressziójának meghatározására használtuk fel. 4 mm vastag körkörös, gyűrűszerű preparátumokra szeltük az érmintákat, és jéghideg, oxigenizált fiziológiás sóoldatba (KREBS) helyeztük további funkcionális vizsgálatok céljából, valamint szárítottuk és fagyasztottuk biokémiai meghatározásokra. A vérmintákat az ACE-genotípus és a szérum ACE meghatározása céljából gyűjtöttük. A betegek orvosi adatait szintén részletesen kigyűjtöttük (2. táblázat).

Bypass graftok vazokonstriktójának mérése

A vaszkuláris kontraktilitás izometriás mérése céljából az érgyűrűket izometriás kontraktilitási mérőrendszerre rögzítettük (DMT 510A, Danish Myotechnology). A simaizom funkciót 30 µM norepinephrin, az endothel integritását 10 µM metacholin hozzáadásával teszteltük. A vaszkuláris kontraktilitást az angiotenzin I és II (mindkettő Sigma-Aldrich) emelkedő koncentrációjával teszteltük. A vizsgálatot sok esetben az angiotenzin II 1-es típusú receptor blokkoló (AT1R) – telmisartan 1,0-10 nM - hozzáadásával, máskor az angiotenzin II 2-es típusú receptor blokkoló (AT2R) – PD123319, 10 µM -, valamint ACE-gátló captopril (0,1-100 µM) és chymase inhibitor chimostatin (300 µM), hozzáadása mellett is elvégeztük (minden gyógyszer Sigma-Aldrich termék). A kontraktilis választ a gyógyszer által kiváltott maximális hatáshoz vagy az angiotenzin kezelés előtt norepinephrinnal elért maximális erőhatáshoz viszonyítottuk (9. és 10. ábra).

Bypass műtött betegek szöveti ACE expressziójának mérése

A fagyaszott érminta darabokat homogenizáltuk és centrifugálással szeparáltuk (16000 g, 5 percig, 4 °C-on). A felülúszót összegyűjtöttük, és fagyasztva tároltuk (-20°C) a mérésekig. Az ACE koncentrációt a Human ACE ELISA kidolgozott, fent már részletezett rendszer segítségével határoztuk meg a gyári leirat protokolljához híven (R&D). Átlagosan legalább 2 független mérést használtunk, hogy az ACE koncentrációt megbecsüljük, míg a fehérje meghatározás három párhuzamos mérés alapján történt. Az ACE expresszált mennyiségét ng ACE/mg fehérje egységben fejeztük ki.

Az ACE I/D polimorfizmusának meghatározása

A genom DNS-t perifériás vér leukocytaiból izoláltuk FlexiGene® DNA Kit (Qiagen) felhasználásával. Az ACE inszerció/deléción (I/D) polimorfizmusát az I és D allél PCR amplifikációjával határoztuk meg Rigat és munkatársai által leírt standard protokollnak megfelelően (Rigat és mtsai. 1992). Az amplifikációs termékeket 5%-os poliakrilamid gélelektroforézissel szeparáltuk és ethidium-bromid festéssel vizualizáltuk. 490-bp vagy 190-bp PCR termékben volt kimutatható az I vagy D allél jelenléte.

Statisztikai analízis

A statisztikai analízisnél Graphpad Prism szoftverrel (GraphPad Software) egy utas ANOVA analízist végeztünk Dunnett többszörös összehasonlító teszt illetve t-teszt segítségével. Szignifikánsnak vettük az eltérést, ha $p < 0,05$. A folyamatos klinikai paraméterek összefüggéseinek vizsgálatokor regressziós analízist alkalmaztunk.

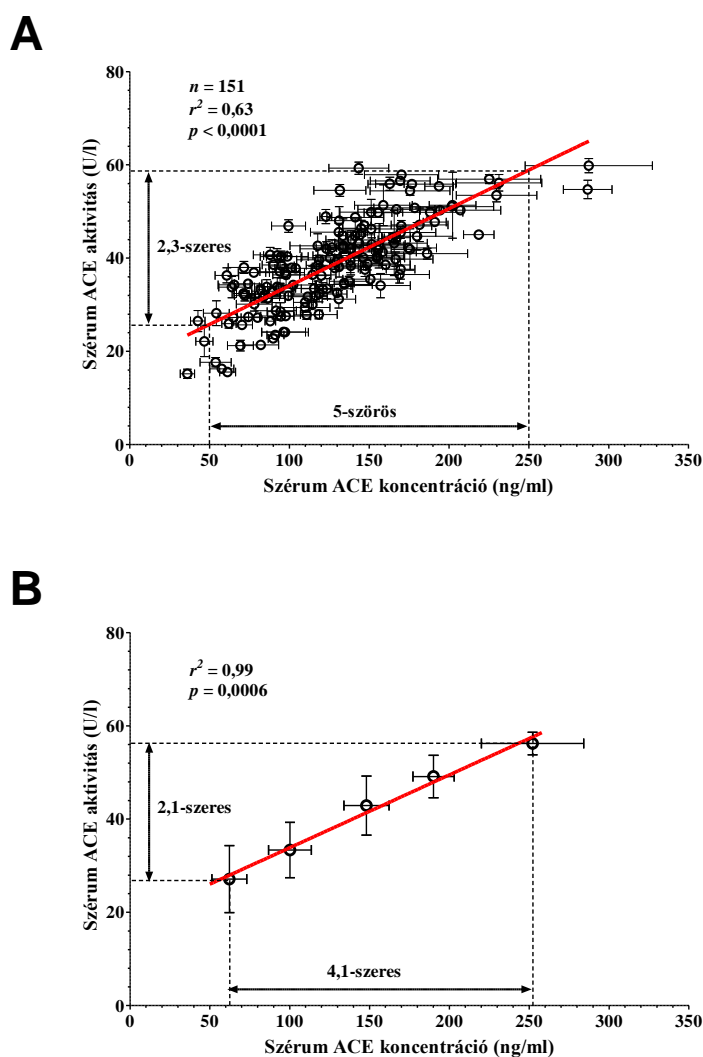
EREDMÉNYEK

151 magasvérnyomás betegségben szenvedő páciensünk vérmintáját gyűjtöttük össze. Az ACE I/D genotípus alapján 3 csoportot (DD, ID, II) képeztünk. Táblázatba foglaltuk betegeink legfontosabb morfológiás paramétereit, mint például nemek, életkor, testtömeg index, dohányzás, bal kamra szisztolés ejekciós frakció, szisztolés és diasztolés vérnyomás, szívfrekvencia szerinti eloszlás. Lejegyeztük a diabétesz, a hiperlipidémia meglétét, az aktuális össz-koleszterin szintet, valamint a veseműködés legfontosabb jellemzőit: a szérum urea, kreatinin, húgysav szinteket és a glomeruláris filtrációs rátát. Feltüntettük továbbá a betegek által leggyakrabban szedett antitenzív gyógyszereket gyógyszercsoportok szerint. A három csoport között érdemi statisztikai eltérést nem találtunk (1. táblázat).

	II	ID	DD	Összes beteg	
Betegek száma	28	71	52	151	
Nemek arány (férfi / nő)	12 / 16	33 / 38	36 / 16	81 / 70	
Életkor	58 ± 11	58 ± 14	52 ± 13	56 ± 13	
Body mass Index (kg/m ²)	28.9 ± 5.6	29.2 ± 5.9	29.0 ± 5.0	29.0 ± 6.0	
Dohányzás	4 (14%)	15 (21%)	7 (13%)	32 (21%)	
Diabétesz mellitus	IDDM	2 (7%)	3 (4%)	3 (6%)	8 (5%)
	NIDDM	6 (21%)	13 (19%)	8 (15%)	27 (18%)
Diszlipidémia	19 (68%)	48 (68%)	32 (62%)	99 (66%)	
Össz-koleszterin (mmol/L)	4.96 ± 1.34	5.21 ± 1.38	5.28 ± 1.39	5.19 ± 1.36	
Ejekciós frakció (%)	57 ± 6	56 ± 8	59 ± 7	57 ± 7	
Szívfrekvencia (1/min)	71 ± 10	75 ± 12	75 ± 13	74 ± 12	
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	130 ± 21	128 ± 16	128 ± 16	129 ± 17	
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	81 ± 12	80 ± 9	78 ± 10	80 ± 10	
Urea (mmol/L)	7.3 ± 2.3	5.6 ± 2.7	5.4 ± 1.9	5.8 ± 2.3	
Kreatinin (μmol/L)	85 ± 29	82 ± 52	71 ± 17	77 ± 38	
Glomeruláris filtrációs ráta (mL/min/1.73 m ²)	75 ± 21	87 ± 25	85 ± 12	84 ± 20	
Húgysav (μmol/L)	356 ± 126	313 ± 101	313 ± 72	319 ± 94	
ACE mennyisége (közép (min, max), U/L)	95 (47, 194)	114 (36, 202)	155 (74, 288)	127 (36, 288)	
ACE aktivitás (közép (min, max), ng/mL)	33 (16, 55)	35 (15, 59)	43 (27, 60)	38 (15, 60)	
Alkalmazott vérnyomáscsökkentő gyógyszerek:					
Diureticumok	15 (54%)	23 (32%)	16 (31%)	54 (36%)	
clopamide	0	1 (1%)	0	1 (0.5%)	
hydrochlorothiazide	10 (36%)	13 (19%)	13 (25%)	36 (24%)	
indapamide	0	3 (4%)	0	3 (2%)	
spironolactone	3 (11%)	3 (4%)	3 (6%)	9 (6%)	
amiloride	2 (7%)	3 (4%)	0	5 (3%)	
β-blokkolók	21 (75%)	51 (72%)	32 (62%)	104 (68%)	
betaxolol	0	1 (1%)	0	1 (0.5%)	
bisoprolol	11 (40%)	24 (34%)	19 (37%)	54 (36%)	
carvedilol	2 (7%)	5 (7%)	2 (4%)	9 (6%)	
metoprolol	2 (7%)	5 (7%)	2 (4%)	9 (6%)	
nebivolol	6 (21%)	16 (23%)	9 (17%)	31 (21%)	
α1-antagonisták	3 (11%)	4 (6%)	2 (4%)	9 (6%)	
doxazosin	2 (7%)	3 (4%)	0	5 (3%)	
prasosin	1 (4%)	1 (1%)	2 (4%)	4 (3%)	
ACE-gátlók	0	0	0	0	
Angiotenzin II receptor blokkolók	17 (61%)	31 (44%)	22 (42%)	70 (46%)	
irbesartan	6 (21%)	13 (19%)	11 (21%)	30 (20%)	
losartan	7 (25%)	15 (21%)	5 (10%)	27 (18%)	
telmisartan	1 (4%)	2 (3%)	4 (8%)	7 (5%)	
valsartan	3 (11%)	1 (1%)	2 (4%)	6 (4%)	
Renin-Inhibitor	0	0	0	0	
Kalcium-csatorna blokkolók	11 (39%)	20 (28%)	13 (25%)	44 (29%)	
amlodipine	11 (39%)	19 (27%)	11 (21%)	41 (27%)	
diltiazem	0	1 (1%)	1 (2%)	2 (1%)	
verapamil	0	0	1 (2%)	1 (0.5%)	
Imidazoline-I agonisták	2 (7%)	1 (1%)	2 (4%)	5 (3%)	
rilmenidin	2 (7%)	1 (1%)	2 (4%)	5 (3%)	
Sztatin	13 (46%)	36 (51%)	23 (44%)	72 (48%)	

1. táblázat A humán szérumban albumin vizsgálatához nyert vérminták ACE genotípusai a morfológiás, laborparaméterek és az alkalmazott gyógyszerek függvényében.

Elsőként a humán szérumban albumin (HSA) endogén ACE gátló képességét ellenőriztük. Az ACE aktivitást a szérumban angiotenzin konvertáz enzim (ACE) működésékként térképeztük fel, mely lineáris összefüggést mutatott az egyes betegek esetén (2A ábra), és az eltérő endogén ACE expressziót mutató betegcsoportok esetén egyaránt (2B ábra). Azonban a szérumban ACE koncentrációjának 5-szörös emelkedése csupán a szérumban ACE aktivitás 2,3-szeres emelkedését vonta maga után (2A ábra). Ennek megfelelően a szérumban ACE koncentráció 62 ± 11 ng/ml-ről 252 ± 32 ng/ml-re emelkedése (4,1-szeres emelkedés az expresszióban, 2B ábra) az ACE aktivitás részleges (2,1-szeres) emelkedésével járt (27 ± 7 U/ml-ről 56 ± 2 U/ml-re, 2B ábra).

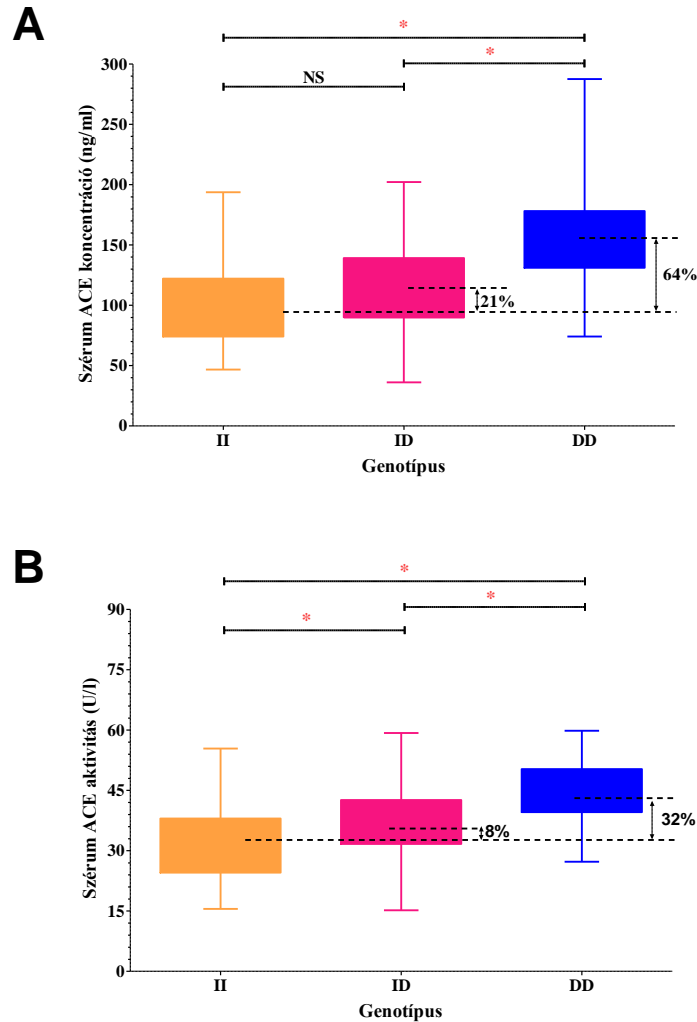


2. ábra: A szérumban ACE koncentrációja és aktivitása közötti összefüggés.

Hipertóniás betegekben határoztuk meg a szérumban ACE koncentrációt és ACE aktivitását ($n=151$ beteg). A szérumban ACE koncentráció meghatározására ELISA módszert

használtunk a szérum 100-szoros hígításából. Minden egyes individuális plate kalibrációs görbéjének elkészítéséhez humán rekombináns ACE-t használtunk. A szérum ACE expressziót ezen kalibrációs görbe segítségével számítottuk. Az ACE aktivitást a mesterséges FAPGG szubsztrát bomlástermékének mérése által becsültük 4-szeres hígítás mellett. A szérum ACE aktivitást a szérum ACE koncentráció függvényében mutatják az ábrák. Az A ábra az individuális értékeket mutatja, míg a B ábrán a betegek a szérum ACE koncentráció alapján csoportosítva voltak. Mindkét grafikonra lineáris regressziós egyenest illesztettünk, hogy az értékek közötti korrelációt kimutassuk, és az illeszkedés mértékét meghatározzuk. Az ACE koncentráció és ACE aktivitási értékek közötti különbség nagyságát is bemutatjuk. A jelek az átlagot reprezentálják (minden mérést legalább 3 alkalommal végeztük el).

Azon betegek esetén, akik homozigóták voltak az ACE gén D (deléció) alléljére, a szérumukban magasabb ACE koncentrációt tudtunk kimutatni, mint akik homozigóták voltak az I (inszerció) allélre (Inszerció, II=47-194 ng/ml, átlag: 94,5 ng/ml, n=28, ID=36-202 ng/ml, átlag: 112,9 ng/ml, n=70, DD=74-288 ng/ml, átlag: 154,9 ng/ml, n=53, 3A ábra). Az ACE aktivitás szintén emelkedett DD homozigóta betegek esetében (II=15,6-55,4 U/ml, átlag: 32,74 U/ml, n=28, ID=15,2-59,3 U/ml, átlag: 35,94 U/ml, n=70, DD=27,3-59,8 U/ml, átlag: 42,95 U/ml, n=53, 3B ábra). Összességében a DD genotípusú betegek esetén az ACE szérum koncentrációjának 64%-os emelkedése csupán 31%-os ACE aktivitás emelkedéssel jár az II genotípusú betegekkel összevetve.

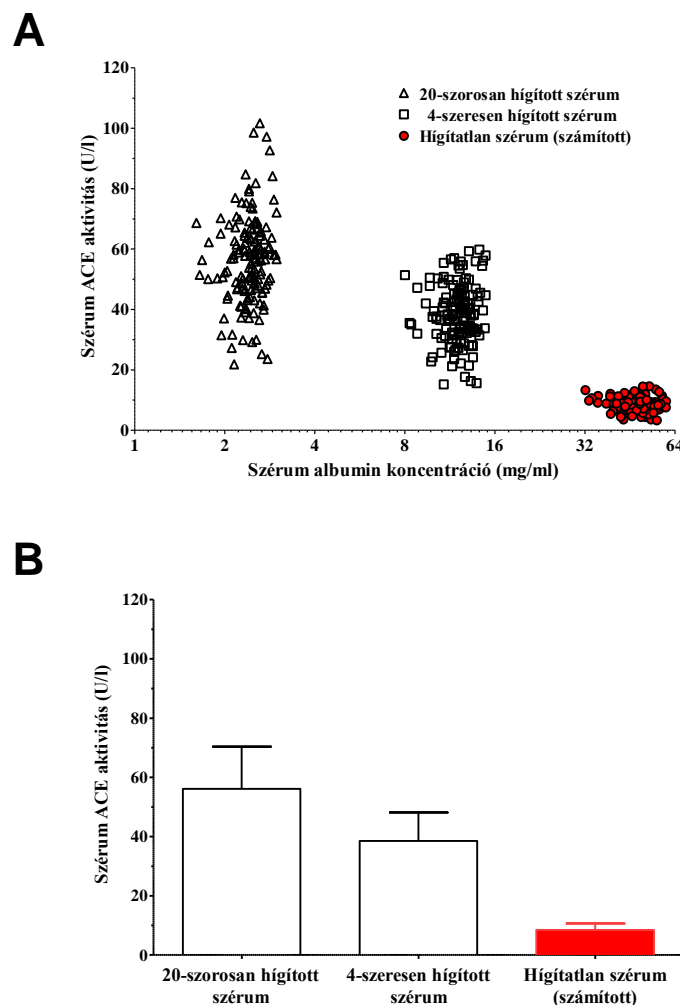


3. ábra: Az ACE genotípus meghatározó szerepe a szérumban mért ACE koncentrációra és aktivitásra

A szérumban mért ACE koncentrációt és aktivitást a korábban már leírt módon határoztuk meg (2. ábra). Az ACE genotípus vizsgálata perifériás vérből történt. Izolált DNS genomból sokszorosítottuk az ACE megfelelő szakaszát, hogy a 190 bázis pár hosszú inszerciósszekvencia jelenlétét meghatározzuk. A PCR reakciótermék hossza azonosította be a genotípust. A genotípust deléciós (D) tekintettük, amikor a 190 bázispár hosszú szekvencia hiányzott, és inszerciósnak (I), ha jelen volt. A betegekben mért ACE koncentrációt (A. ábra) és aktivitást (B. ábra) az ACE genotípus függvényében mutattuk be (inszerció: II, n=28, deléciós: DD, n=53 és heterozygóta: ID, n=70). A grafikon oszlopai az interkvartilist mutatják be a középértékkel, a szórással a minimum és maximum értékeket jelöltük. A szignifikáns eltéréseket (1 utas ANOVA, Bonferroni post hoc teszt) csillaggal jelöltük.

Ezek az adatok azt sugallják, hogy az ACE aktivitás a humán szérumban mért ACE koncentrációja mellett további faktorok által is szabályozott. Korábbi eredményeink alapján azt

gyanítottuk, hogy a humán szérumban albumin egyfajta endogén ACE gátló, melynek koncentrációfüggő hatása van a szérumban ACE aktivitásra. Megpróbáltunk összefüggést találni a szérumban albumin koncentráció és a szérumban ACE aktivitás között a humán szérumban *in vitro* kísérletes körülmények között. A specifikus ACE aktivitás magasabb volt, ha a szérumban hígítása miatt a szérumban albumin koncentráció csökkent (4. ábra). Az ACE aktivitás $56,13 \pm 1,17$ U/ml-ről $38,55 \pm 0,78$ U/ml-re csökkent, ha a HSA koncentráció $2,42 \pm 0,02$ mg/ml-ről $12,12 \pm 0,12$ mg/ml-re emelkedett. A humán szérumban ACE-HSA összefüggésében a stabilitási állandó (K_i) $5,7 \pm 0,7$ mg/ml volt, mely azt sugalmazta, hogy az ACE aktivitás $8,47 \pm 0,18$ U/ml (kalkulált értékek) $48,46 \pm 0,46$ mg/ml HSA jelenlétében. (4. ábra).

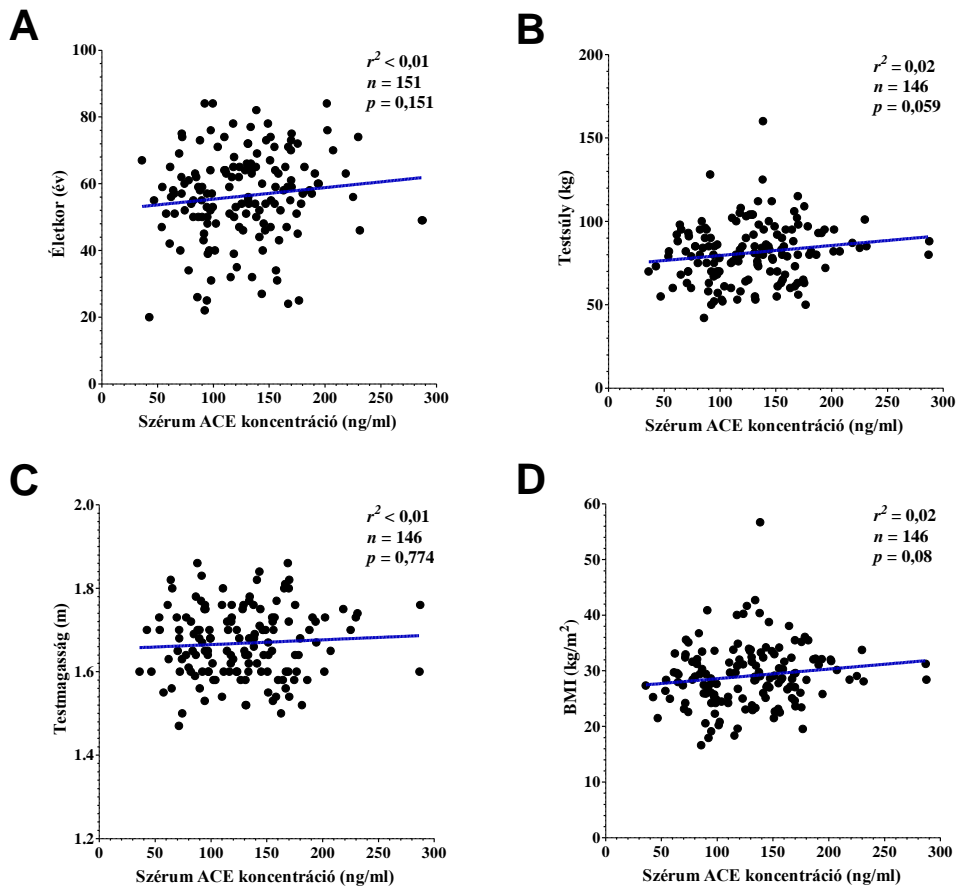


4. ábra: A szérumban albumin koncentráció szerepe a szérumban ACE aktivitás szabályozásában

A szérumban ACE aktivitást ($n=151$ beteg) különböző hígítások (20-szoros és 4-szeres hígítás) mellett határoztuk meg. A szérumban ACE aktivitást az aktuális szérumban albumin koncentráció

függvényében adtuk meg az individuális mintákban (A panel). Hígitatlan szérumban a szérum ACE aktivitási értékeket a 20-szoros hígitás után mért aktivitási értékek és az ismert ACE-HSA inhibitoros konstans ($K_i = 5,7 \text{ mg/ml}$) alapján becsültük. Ezeket a kalkulált ACE aktivitási értékeket az individuálisan mért humán szérum albumin koncentráció funkciójaként ábrázoltuk. Az értékeket az egyedi adatok átlaga \pm SD adtuk meg (B panel). Szignifikáns különbség volt (páros t-próba) a 20-szoros és 4-szeres hígitáson mért eredmények között.

Vizsgáltuk, hogy a HSA szérum ACE-ra kifejtett endogén gátló hatása alkalmas-e hipertóniás betegekben a különböző ACE expressziós szintek kompenzálására, ahol a terápiás ACE gátlás csak részben eredményes. ACE gátlót szedő betegeket ($n=151$) vontunk be vizsgálatunkba. A szérum ACE koncentráció nem mutatott összefüggést a morfolometriás paraméterekkel, pl. életkor, testsúly, testmagasság vagy testtömeg index (5. ábra).

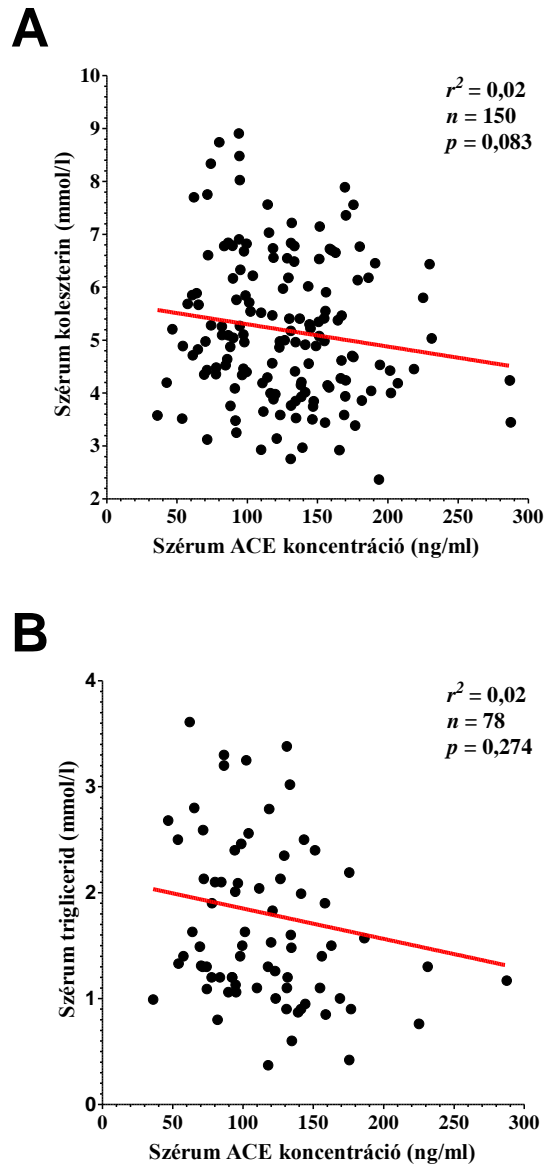


5. ábra: A morfolometriás paraméterek és a szérum ACE koncentráció között nincs összefüggés

A betegek életkorát, testtömegét, testmagasság és testtömeg indexét is kigyűjtöttük a vizsgálatban ($n=151$), és a szérum ACE koncentráció függvényében ábrázoltuk. A pontokra

lineáris regressziós egyenest illesztünk, hogy a lehetséges korrelációt feltárjuk. Minden egyes grafikon mutatja az illesztés mértékét. A BMI normál értéke 18,5–25 kg/m².

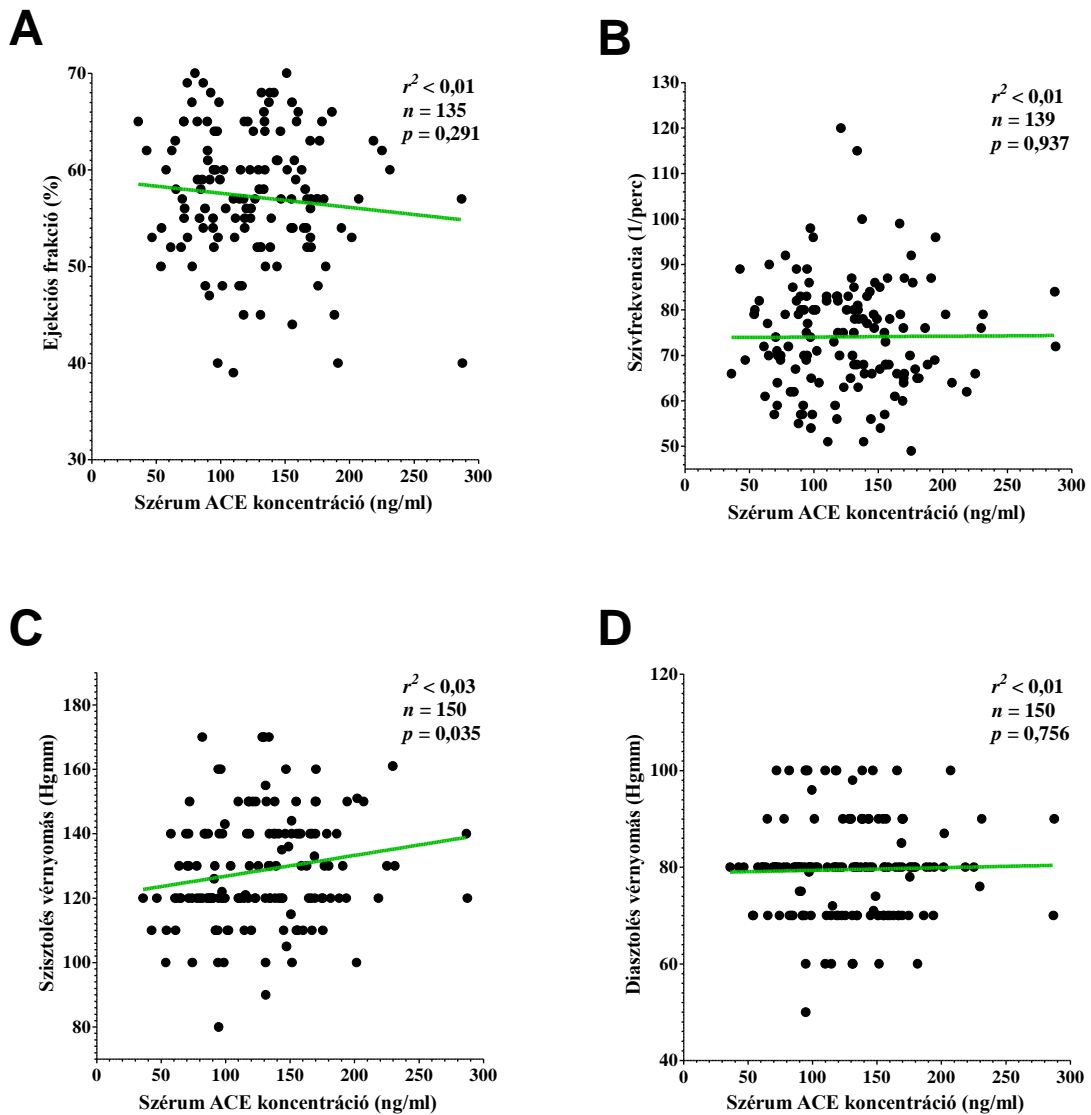
A szérumszintű ACE koncentráció nem mutatott összefüggést az összkoleszterin és triglicerid szintekkel sem (6. ábra).



6. ábra: A szérumszintű lipidszintek és a szérumszintű ACE koncentrációja között nincs összefüggés

A totál koleszterin és triglicerid szinteket ábrázoltuk a szérumszintű ACE koncentráció függvényében (n=151 beteg). A pontokra lineáris regressziós egyenest illesztünk, hogy a lehetséges korrelációt az ábrázolt paraméterek között megkapjuk. Minden egyes grafikon mutatja az illesztés mértékét. A totál koleszterin normál értéke 5,2 mmol/l, a triglicerid esetében 1,7 mmol/l alatt volt.

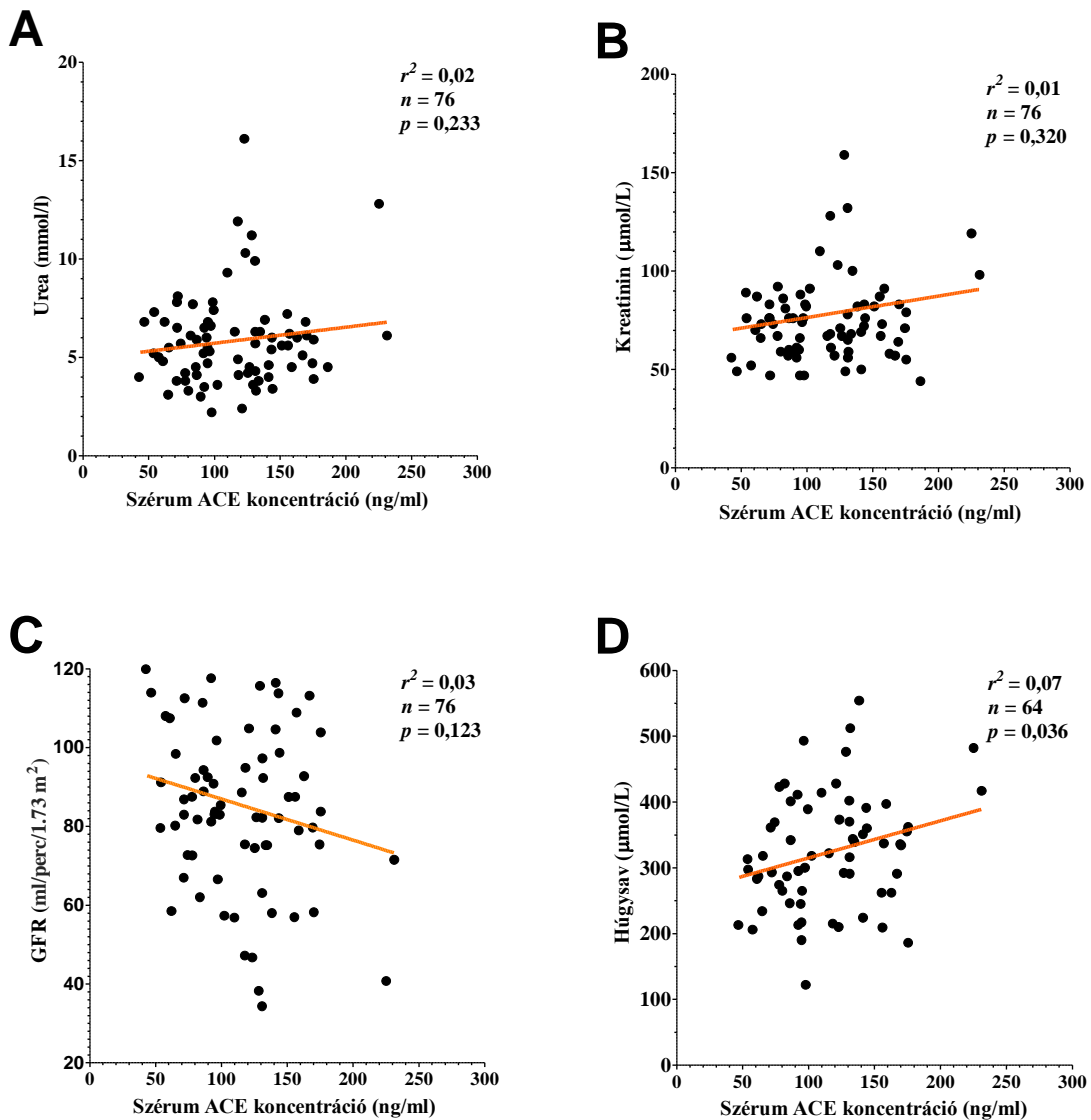
A kardiovaszkuláris paraméterek (ejekciós frakció, szívfrekvencia, szisztolés és diasztolés vérnyomás) is függetlenek voltak a szérums ACE koncentrációjától pontatlan illeszkedés miatt (alacsony r^2 értékek alapján, 7. ábra).



7. ábra: A szérums ACE koncentráció és a kardiovaszkuláris paraméterek között nincs összefüggés

A szérums ACE koncentráció függvényében ábrázoltuk a kardiovaszkuláris paramétereket (ejekciós frakció, szívfrekvencia, szisztolés és diasztolés vérnyomás, $n=151$). A pontokra lineáris regressziós egyenest illesztettünk, hogy a lehetséges korrelációt feltárjuk. Minden egyes grafikon mutatja az illesztés mértékét. Az ejekciós frakció 50% felett, a szívfrekvencia 60-100/min között, a szisztolés és diasztolés vérnyomás 90-140, illetve 60-90 Hgmm-es tartományban normális.

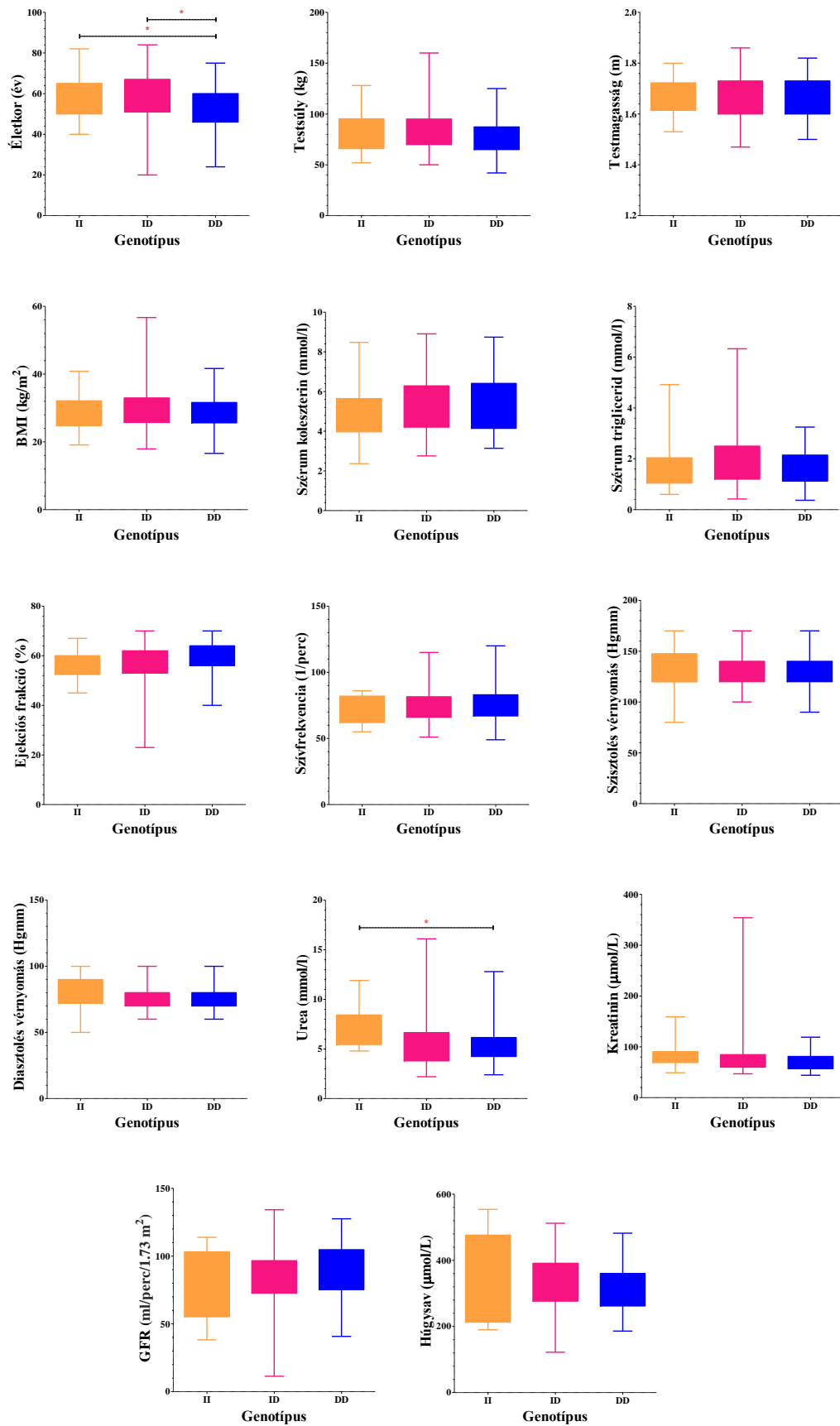
A vesefunkciós paraméterek (szérum urea, kreatinin és a glomeruláris filtrációs ráta) is jelentős szórást mutattak (alacsony r^2 értékek), ezzel cáfolva korrelációt a szérum ACE koncentrációval (8. ábra).



8. ábra: A szérum ACE koncentráció és a vesefunkciós paraméterek között nincs összefüggés

A vesefunkciót az urea, kreatinin és húgysav szérumban mért átlag koncentrációjával és a glomeruláris filtrációs rátával (GFR) mértük. Az értékeket a szérum ACE koncentráció függvényében adtuk meg ($n=151$). A pontokra lineáris regressziós egyenest illesztettünk, hogy a lehetséges korrelációt feltárjuk. Minden egyes grafikon mutatja az illesztés mértékét. Normál értékek: urea 3,6-7,2 mmol/l, kreatinin 44-97 $\mu\text{mol/l}$ (nő) és 62-106 $\mu\text{mol/l}$ (férfi), GFR 90 ml/min/1,73m² felett, húgysav 140-340 $\mu\text{mol/l}$ (nő) és 220-420 $\mu\text{mol/l}$ (férfi).

Ezen értékek és az ACE expressziót szignifikánsan meghatározó genotípus között is próbáltunk párhuzamot vonni (3A ábra). Hasonlóan nem találtunk összefüggést a klinikai paraméterek és az ACE genotípus között (9. ábra), illetve az individuális ACE expressziós szintek között (5-8. ábra).



9. ábra: A betegek paramétereit és az ACE I/D genotípus közötti összefüggése

Különböző paramétereiket (életkor, testtömeg, testtömeg index, totál koleszterin, triglicerid, ejekciós frakció, szívfrekvencia, szisztolés és diasztolés vérnyomás, urea, kreatinin, glomeruláris filtrációs ráta és húgysav) hasonlítottunk össze a betegek genotípusával (inszerciós:II, n=28, deléciós: DD, n=53 és heterozygota: ID, n=70). A grafikon boxai az interquartile sávot mutatják be a mediánnál, jelöltük a minimum és maximum értékeket. A szignifikáns értékeket (1 utas ANOVA, Bonferroni post hoc teszt) csillaggal jelöltük (NS, nem szignifikáns).

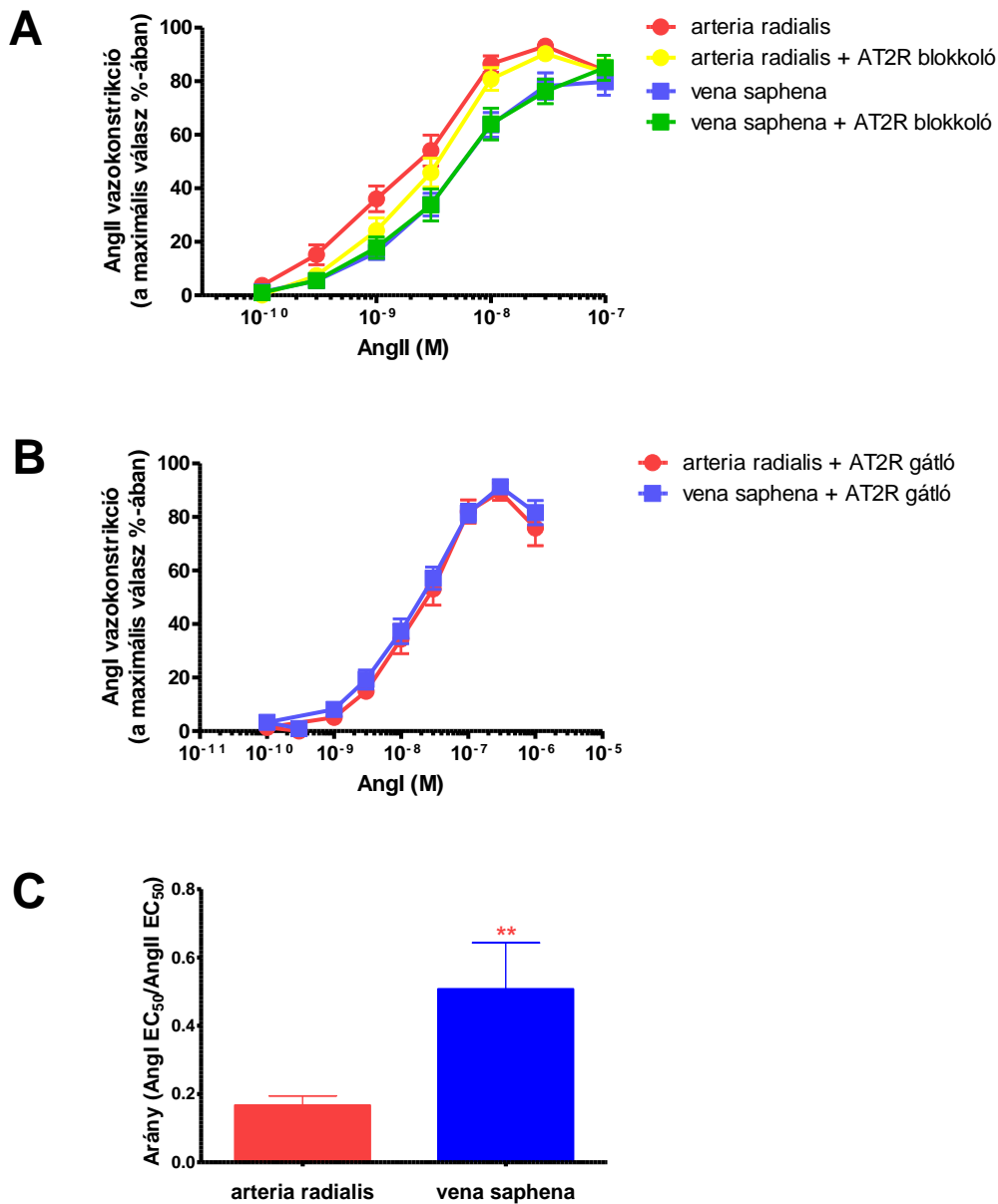
További vizsgálataink bypass műtéten átesett betegek felé irányult. A vizsgált 76 betegből *arteria radialis* (31 betegből 120 szegmentum) és *vena saphena* (45 betegből 148 szegmentum) mintákat nyertünk. Táblázatba foglaltuk a legfontosabb morfológiás paramétereiket, mint például nemek, életkor, testtömegindex, szisztolés és diasztolés vérnyomás, szívfrekvencia szerinti eloszlást. Elemeztük a koleszterin és triglicerid szintek, az aktuális éhgyomri glükóz szint mellett az igazolt diabétesz meglétét, illetve a műtét idején a NYHA státuszt. Feltüntettük továbbá a műtét előtt leggyakrabban alkalmazott primer és szekunder prevenciós gyógyszer csoportokat, mely terápiában a betegek részesültek. A két csoport között érdemi statisztikai eltérést nem találtunk (2. táblázat).

		a. radialis csoport	v. saphena csoport	Összes
Betegszám		31	45	76
Vizsgált ér-szegmentumok száma		120	148	268
Férfi		23 (74%)	32 (71%)	55 (72%)
Nő		8 (25%)	13 (28%)	21 (28%)
Átlag életkor (év)		60.5 ± 7.29	63.3 ± 7.88	62.1 ± 7.71
Dohányzás		5 (16%)	8 (18%)	13 (17%)
Testtömeg index (kg/m ²)		28.96 ± 4.82	29.76 ± 3.82	29.43 ± 4.24
triglicerid (mmol/l)		2.05 ± 0.88	2.03 ± 0.87	2.03 ± 0.86
High Density Lipoprotein (mmol/l)		1.35 ± 0.40	1.39 ± 0.53	1.38 ± 0.48
Low Density Lipoprotein (mmol/l)		3.21 ± 1.05	3.05 ± 1.16	3.11 ± 1.11
Diabetes mellitus:	NIDDM	8 (26%)	18 (40%)	26 (34%)
	IDDM	5 (16%)	8 (18%)	13 (17%)
Éhgyomri glükóz (mmol/l)		6.76 ± 2.70	7.65 ± 3.62	7.30 ± 3.30
New York Heart Association beosztás:	I.	0 (0%)	2 (4%)	2 (3%)
	II.	3 (10%)	6 (13%)	9 (12%)
	III.	25 (81%)	31 (69%)	56 (74%)
	IV.	3 (10%)	6 (13%)	9 (12%)
Ejekciós frakció (echokardiográfia)		50.14 ± 8.69	51.20 ± 9.50	50.76 ± 9.12
Szívfrekvencia (ütés/perc)		67.73 ± 11.46	72.67 ± 16.54	70.60 ± 14.72
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)		129.95 ± 18.16	135.94 ± 20.57	133.5 ± 19.67
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)		81.10 ± 9.83	84.69 ± 8.79	83.22 ± 9.31
szedett gyógyszerek	beta-blokkoló	26 (84%)	39 (87%)	65 (86%)
	Ca- csatorna gátló	12 (39%)	16 (36%)	28 (37%)
	ACE gátló	27 (87%)	38 (84%)	65 (86%)
	Ang II receptor blokkoló	1 (3%)	5 (11%)	6 (8%)
	diuretikum	13 (42%)	18 (40%)	31 (41%)
	sztatin	25 (81%)	34 (76%)	59 (78%)
	amiodaron	3 (10%)	2 (4%)	5 (7%)
	digoxin	2 (6%)	2 (4%)	4 (5%)
	K-vitamin antagonist	0 (0%)	2 (4%)	2 (3%)
	aszpirin	22 (71%)	27 (60%)	49 (64%)
	GPIIb/IIIa antagonist	5 (16%)	5 (11%)	10 (13%)
	heparin	2 (6%)	0 (0%)	2 (3%)
	Kis molekula súlyú heparin(LMWH)	18 (58%)	24 (53%)	42 (55%)
	NO-donor	10 (32%)	18 (40%)	28 (37%)
	trimetazidin	13 (42%)	20 (44%)	33 (43%)
	ezetimibe	3 (10%)	2 (4%)	5 (7%)
	inzulin	7 (23%)	8 (18%)	15 (20%)
sulfonylurea	3 (10%)	8 (18%)	11 (14%)	
metformin	3 (10%)	6 (13%)	9 (12%)	

2. táblázat A vizsgált érminták megoszlása a morfometriás, laboratóriumi paraméterek és az alkalmazott gyógyszerek függvényében.

Vizsgálataink a szöveti ACE karakterizálása felé irányultak a vazokonstriktós hatást, az ACE expressziót, ACE aktivitást vizsgálva a szövetspecifitást (*arteria radialis* és *vena saphena* graft minták esetén) és a genotípus függvényében. Az angiotenzin II (Ang II) kezelés szignifikáns vazokonstriktiót váltott ki mind az *arteria radialis* érmintákon, mind a *vena saphena* érgyűrűkön. Az Ang II által kiváltott vazokonstriktió szignifikánsan magasabb volt ($p < 0,01$) az *arteria radialis* mintákon ($82 \pm 6\%$, $n=30$), mint a *vena saphena* vénákon ($61 \pm 5\%$, $n=39$). A maximális vazokonstriktiót $30 \mu\text{M}$ norepinephrin hozzáadásával becsültük meg. Annak ellenére, hogy a maximális vazokonstriktós válaszban ilyen különbségek jelentkeztek Ang II-re, az Ang II érzékenység is szignifikánsan magasabb volt (10A ábra) a *radialis* arteriákban ($p < 0,01$) összehasonlítva a *saphena* vénákkal ($3,0 \pm 0,5 \text{ nM}$, $p=31$ valamint $6,6 \pm 0,9 \text{ nM}$, $p=36$). 2-es típusú angiotenzin II receptor (AT2R) gátló (PD123319 $10 \mu\text{M}$) előkezelés hatására a *radialis* artériákon ($EC_{50}=4,4 \pm 0,7 \text{ nM}$, $n=27$) és a *saphena* vénákon ($EC_{50}=8,2 \pm 2,0 \text{ nM}$, $n=25$) az Ang II érzékenység nem változott, így ezen kísérleti rendszerekben a vaszkuláris válaszokban az AT2R limitált szerepe merül fel.

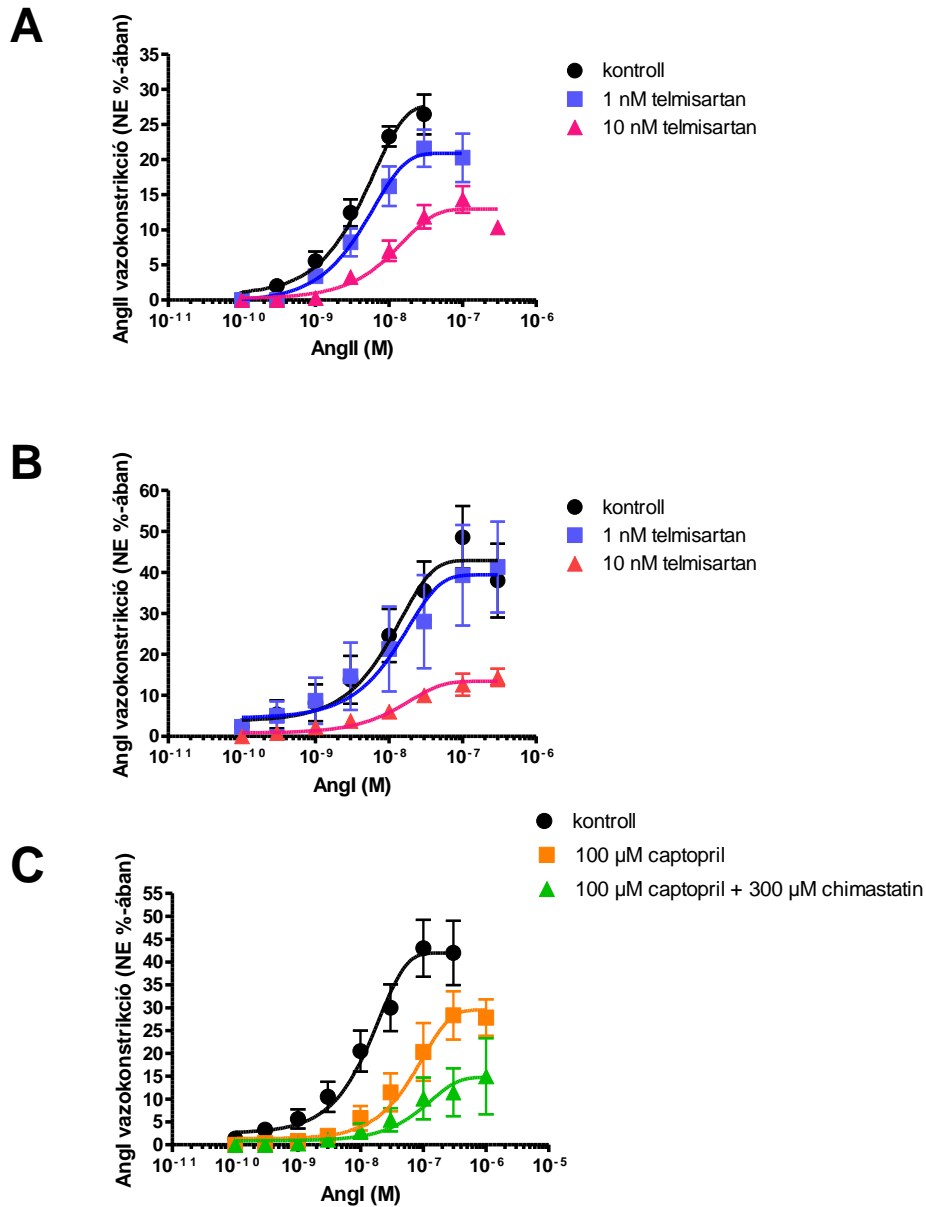
A szöveti Ang I » Ang II konverzió vizsgálata céljából megmértük az Ang I-re adott válaszokat (10B ábra). Az Ang I félmaximális hatása $EC_{50}=31 \pm 6 \text{ nM}$, ($n=26$) volt *radialis* artérián, és $30 \pm 4 \text{ nM}$ *vena saphena*n ($n=40$). Tekintettel arra, hogy az Ang I szöveti hatása Ang II-vé történő konverziója után jön létre, ezen kísérleti eredmények jelentős szöveti Ang I » Ang II átalakulásra utalnak a vizsgált erekben. Számítottuk az Ang II és Ang I hatás (EC_{50}) arányát is, hogy mennyiségileg kifejezhessek az Ang I » Ang II konverzió mértékét. Ez az arány szignifikánsan alacsonyabb volt ($p=0,02$) az *arteria radialis* mintákban ($0,17 \pm 0,03$, $n=23$), mint *vena saphena* vénákon ($0,51 \pm 0,14$, $n=24$). Ezek az eredmények háromszor hatékonyabb Ang I konverziót mutatnak *saphena* vénákban, mint *radialis* arteriákon (10C ábra).



10. ábra: az angiotenzin I-re és angiotenzin II-re adott kontrakciós válaszok

Érgyűrűkön mértük az izometriás kontrakciós erőt. Az angiotenzin peptideket emelkedő dózisban használtuk. A magasabb dózisokat 5 perc inkubáció után vagy a steady state állapot kialakulása után adtuk a mérőrendszerhez. Az Ang II (A panel, n=25-36) és az Ang I (B panel, n=26-40) dózis-hatás görbéje ábrázolódik radiális artérián (körökkel jelölve) és saphena vénán (négyzetekkel jelölve). Az angiotenzin II hatást vizsgáltuk 2. típusú angiotenzin II receptor blokkoló PD 123319 (10 μ M) jelenlétében. Az Ang I és Ang II vazokonstrikciót kiváltó hatékonyságát (EC₅₀) minden egyes individuális kísérlet eredményeinek az illesztésével becsültük meg. Az Ang I-re és Ang II-re kapott EC₅₀ értékek arányát szintén kiszámítottuk (C panel). Az értékek az átlag \pm S.E.M. (átlagtól való eltérés) adta. A szignifikáns eltérést (t-teszt, $p < 0,01$) kettős csillaggal jelöltük.

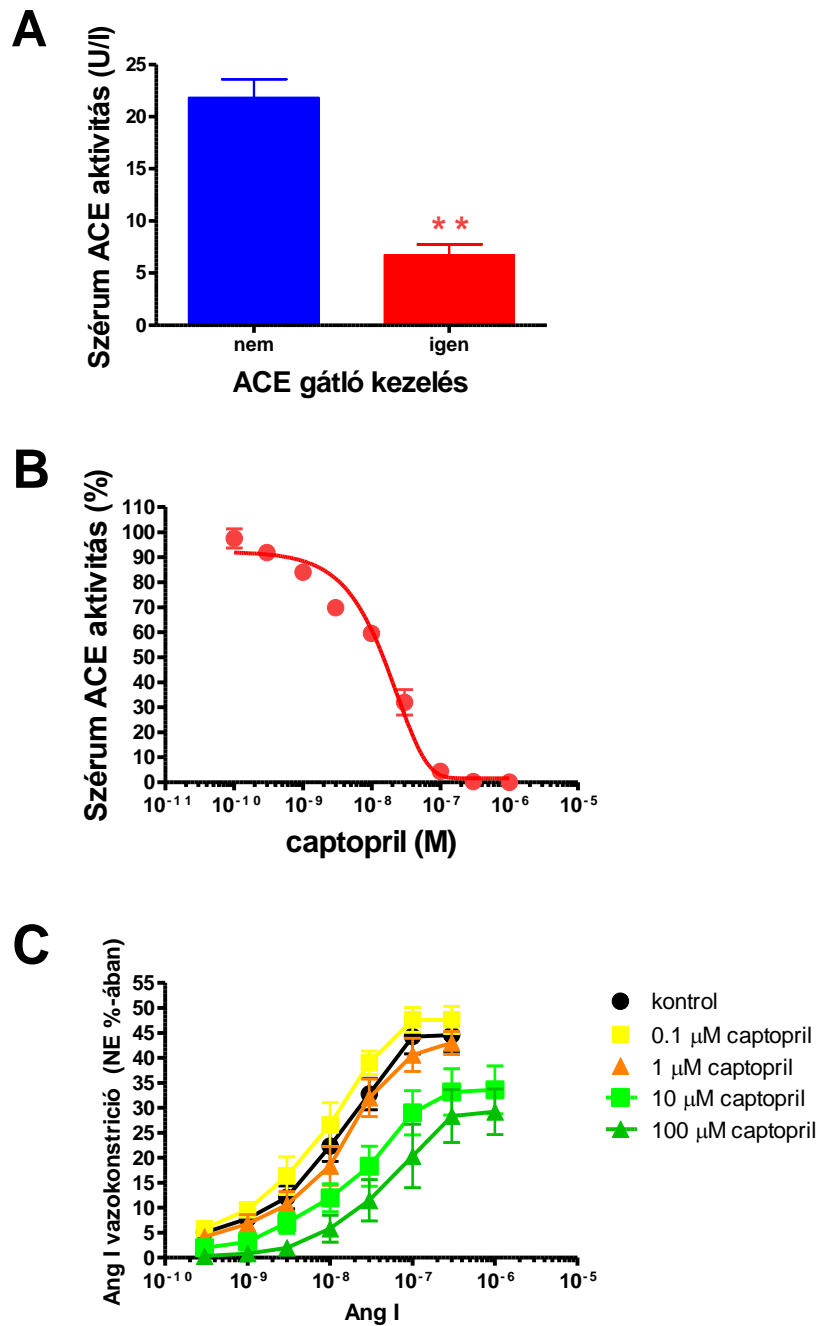
Az eredményekkel azt is igazoltuk, hogy vena saphenákon az Ang I hatás az Ang I » Ang II lokális konverziója révén jön létre. Az Ang II telmisartannal történő dózis függő (1,0 nM-10 nM) gátlására kapott válaszok azt sugallják, hogy az Ang II hatás 1. típusú angiotenzin II receptorokon (AT1R) valósul meg (11A ábra). Hasonló módon képesek voltunk telmisartannal gátolni az Ang I provokálta vazokonstriktiót, és ebből arra következtethettünk, hogy az Ang I hatás is AT1R receptorokon át közvetítődik (11B ábra.). Az angiotenzin I konvertáz enzim identitását is vizsgáltuk. Az ismert angiotenzin konvertáz enzim (ACE) gátló hatású captopril hozzáadása (100 μ M) után az Ang I-re adott válasz szignifikánsan csökkent (10C ábra), mely az ACE konverzióban játszott szerepét alátámasztja. Mindezen túl 100 μ M captopril és 300 μ M chimáz gátló chimastatin együttes hozzáadásával is gátoltuk az Ang I-et. Az eredmények a chimastatin sikeres gátló hatását sugallják magasabb Ang I koncentrációk esetén (11C ábra).



11. ábra: az angiotenzin kiváltotta vazokonstrikció mechanizmusai

Az érgyűrűkön kontraktilis válaszokat mértünk, melyekhez izometriás kontraktilis erőmérő rendszert használtunk. Az angiotenzint az 9. ábrán korábban már említettek szerint alkalmaztuk. Az angiotenzin II mediálta vazokonstrikciót az angiotenzin II 1. típusú receptor blokkolója, a telmisartan hozzáadása mellett határoztuk meg (A panel). A *vena saphena* szegmentumokat az Ang II hozzáadása előtt telmisartannal (1 és 10nM, n=5-7) előkezeltük. Következő lépésként az Ang I-re adott válaszokat határoztuk meg telmisartan jelenlétében (B panel, n=5) ugyanolyan kísérleti körülmények között. Végül az Ang I-re adott válaszokat mértük az angiotenzin konvertáz enzim gátló captopril jelenlétében (100 μM, n=6), majd a captopril és a kimáz gátló chymostatin kombinációja mellett (300 μM, n=6) (C panel). Az értékeket az átlag ± S.E.M. (átlagtól való eltérés) adta.

Részletesen vizsgáltuk a captopril mind a keringő, mind a szöveti ACE-ra kifejtett gátló hatását. Először az ACE gátló kezelés keringő ACE-ra kifejtett gátló hatását erősítettük meg. Az ACE gátló kezelésben részesülő betegeknél szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,01$) szérumszintű ACE aktivitást tudtunk mérni ($7,0 \pm 1,0$ U/l, $n=15$) összevetve az ACE gátló kezelésben nem részesülő betegek szérumszintű ACE aktivitásával ($22,0 \pm 2,0$ U/l, $n=15$, 12A ábra). Következően humán szöveti ACE-n teszteltük in vitro a captopril hatását (12B ábra). Eredményeink alapján a humán szérumszintű ACE-t a captopril 15 nM-nál (IC_{50}) teljesen gátolta. A captopril szöveti angiotensin I-re gyakorolt konverziós hatását is vizsgáltuk, hogy megbecsüljük ezen gyógyszer szöveti ACE-ra gyakorolt gátló potenciálját (12C ábra). A captopril 1 μ M-os koncentrációiban hatástalan volt, míg a 10 μ M-os és 100 μ M-os koncentrációnak non-kompetitív gátló hatását sikerült kimutatnunk (hasonlóan a 11. ábrán szemléltetettekhez).

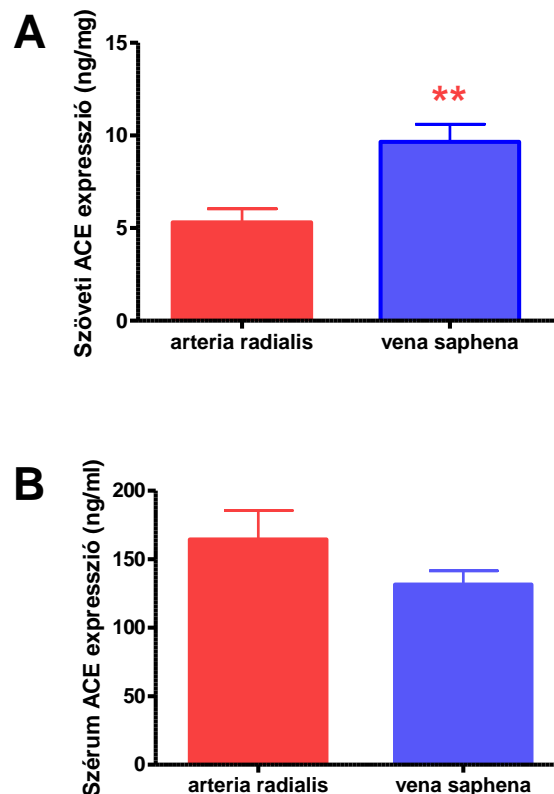


12. ábra. A captopril keringő és szöveti ACE-ra kifejtett gátló hatásainak vizsgálata

A betegek szérumban mértük az ACE aktivitását (n=15 mindkét csoportban), hogy igazoljuk az ACE gátlás hatékonyságát (A panel). Az ACE gátló kezelés elkezdése után szignifikánsan alacsonyabb szérumban ACE aktivitást detektáltunk (átlag ± S.E.M., p<0,01). Következő lépésként a captopril keringő ACE-ra kifejtett dózis-hatás görbét határoztuk meg (B panel). Egészséges személyek szérumban ACE aktivitását is megmértük különböző dózisu captopril jelenlétében (átlag ± S.E.M., n=3 ismételve). A captopril szérumban ACE-hoz való kötődési képessége terápiás tartományban volt. Végül a captopril szöveti ACE-ra kifejtett gátló hatását vizsgáltuk. Az érgyűrűk kontraktilis válaszait izometriás kontrakciós erőmérő rendszeren mértük. Az angiotenzin I-et az 1-es ábrán korábban már említették

szerint alkalmaztuk. Az angiotenzin I által kiváltott vazokonstriktiót 0-100 μ M captopril jelenlétében vizsgáltuk (C panel). Az adatokat az átlag \pm S.E.M. adja, n=5-11 önálló mérés.

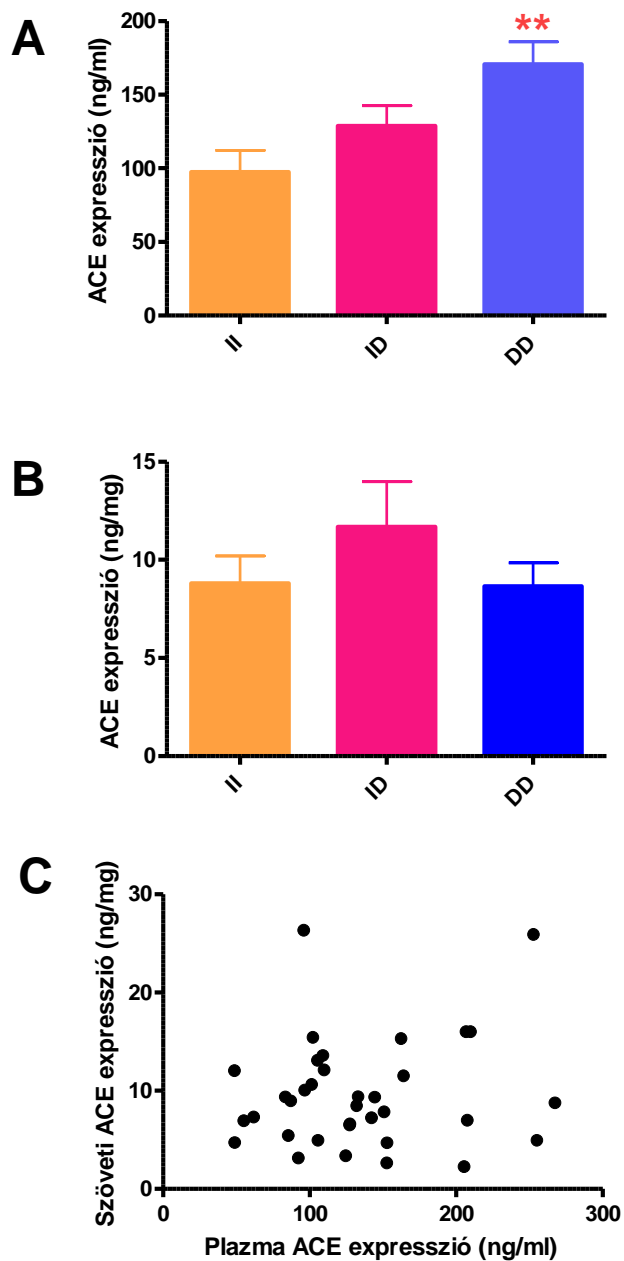
Az ACE expressziót mindkét szövetmintában megmértük (13A ábra). Az eredmények a saphena vénákban kétszer magasabb ACE expressziót mutatnak, mint az arteria radialis érszövetben ($5,3 \pm 0,7$ ng/mg szöveti protein, n=14 az a. radialisban, és $9,7 \pm 1,0$ ng/mg, n=35 szöveti protein a saphena vena mintákban, $p < 0,01$). Ezek az eredmények összecsengtek ezen szövetekben talált háromszoros Ang I konverziós hatékonysággal. Ezzel ellentétben az adott betegek vérmintáiban az ACE koncentrációban nem volt különbség ($p = 0,12$) (13B ábra, a szérum ACE koncentráció az a. radialis szövetmintájú betegeknél: 164 ± 21 ng/ml n=14, a v. saphena szövetmintájú betegek esetén: 134 ± 10 ng/ml, n=34).



13. ábra: A vérkeringésben (szérum, A panel) és a szövetekben (*vena saphena*, B panel) fellelhető angiotenzin konvertáz enzim (ACE) expressziója.

Az ACE expressziót homogenizált erekből (A panel) illetve szérumból (B panel) határoztuk meg ACE ELISA módszerrel.

Más vizsgáló csoportokban is felmerült a gondolat, hogy a szérumban ACE expresszióját genetikai polimorfizmus kontrollálja. Vizsgálatainkkal valóban sikerült ezt a tényt az ACE expresszióról megerősítenünk. Mintáinkban a DD genotípussal bíró betegek esetében a szérumban ACE expresszió szignifikánsan magasabb volt az II genotípussal bíró betegek mintáival szemben (14A ábra, II genotípus: 97 ± 15 ng/ml, $n=11$ és DD genotípus esetén: 171 ± 15 ng/ml, $n=13$, $p < 0,01$). Ezzel ellentétben a *vena saphena* mintákban ugyanazon betegek esetén a szöveti ACE expresszió mögött ezen genetikai polimorfizmus által meghatározott összefüggést nem sikerült kimutatnunk. (14B ábra, II genotípus esetén: 9 ± 1 ng/mg, $n=11$ és DD genotípus esetén: 9 ± 1 ng/mg, $n=13$). További részletes vizsgálatunk azt mutatta, hogy a szöveti (*vena saphena*) és a szérumban ACE koncentráció egymástól függetlenül regulálódik (az eredményekhez nem illeszthető egy lineáris regressziós egyenes, $r^2=0,014$ a legjobb illeszkedés esetén, $n=35$, 14C ábra).



14. ábra: A szöveti és a keringő ACE expressziója

A vérkeringésben (szérum, panel A) és a szövetekben (*vena saphena*, panel B) fellelhető angiotenzin konvertáz enzim (ACE) expresszáldása az ACE genotípus függvényében (inszerciós/deléciós, I/D). Az ACE genotípust teljes vérből, az ACE expressziót szendvics ELISA módszerrel határoztuk meg.

DISZKUSSZIÓ

Az 5. leggyakrabban felírt gyógyszercsoport az angiotenzin konvertáz enzim (ACE) gátlók csoportja, melyek a kardiovaszkuláris (hipertónia, szívelégtelenség) terápia alapját képezik (Taylor 2012),(McMurray és mtsai. 2012),(Hamm és mtsai. 2012),(Tendera és mtsai. 2011),(Wijns és mtsai. 2010),(Rydén és mtsai. 2014). Munkacsoportunk korábbi vizsgálataira arra mutattak rá, hogy a szérumban lévő albumin egy endogén ACE gátló, mely koncentráció-függő mértékben képes gátolni az ACE-t (K_i érték $5,7 \pm 0,7$ mg/ml humán szérumban ACE-n), hasonlóan a felírt ACE gátló gyógyszerekhez (Fagyas, Úri, Siket, Fülöp, és mtsai. 2014).

Az ACE inszerciós-deléciós (I/D) polimorfizmusát már több mint 20 éve azonosították (Rigat és mtsai. 1990), és ezen polimorfizmust a keringő ACE expressziós szintek közötti 20-50%-os interperszonális variabilitás alapjának tekintették. Ennek megfelelően a humán szérumban lévő ACE expresszió széles tartományban mozog (47-288 ng/ml), és a DD genotípusú betegeknél saját vizsgálatunkban is 64%-kal magasabb ACE expressziót találtunk, mint az II genotípusúaknál. A kardiovaszkuláris paraméterek és az ACE expresszió (genotípus) közötti nyilvánvaló korreláció hiánya érdekes, különösen annak fényében, hogy az ACE gátlók kardiovaszkuláris hatékonyságát számos nagyszámú klinikai vizsgálat és elfogadott guideline is alátámasztja (Fox 2003)-(Rydén és mtsai. 2014). Korábbi adatokra való tekintettel feltételeztük, hogy az ACE expresszióban észlelt különbség, mely az ACE I/D polimorfizmusából adódik, szerepet játszhat a miokardiális infarktus, a koronária megbetegedések, a koronária artériák meszesedése, a szívelégtelenség és a hipertenzió előfordulásában (Oshima és mtsai. 1997) (Niu és mtsai. 2002) (Fedor és mtsai. 2011) (Hara és mtsai. 2014) (Chen és mtsai. 2012). Mi ilyen összefüggést nem tudtunk kimutatni, mely megegyezett egy több mint 30000 beteget vizsgáló meta-analízis eredményeivel (Agerholm-Larsen és mtsai. 2000), ahol leírták, hogy az ACE genotípusnak nincs hatása a vérnyomásra, és a miokardiális infarktus, iszkémiás szívbetegségek vagy iszkémiás cerebrovaszkuláris megbetegedések fokozott rizikójával sincs összefüggésben.

Jelen vizsgálatunkban közvetlenül teszteltük hipertóniás betegek szérumban lévő ACE expresszió és ACE aktivitás közötti összefüggést. Azt találtuk, hogy ugyan a DD genotípusú

hipertóniás betegek szérumban az ACE koncentrációja 64%-kal magasabb volt, mint az II genotípusú betegek esetén, azonban az ACE aktivitásban csak 31%-os különbséget tapasztaltunk. Ez azt sugallja, hogy a magasabb ACE expresszió élettani körülmények között pufferolt. Észrevételeink összecsengenek azzal a megfigyeléssel, hogy a helyi angiotenzin I » angiotenzin II átalakulás és az angiotenzin II/I arány független az I/D genotípustól humán mintákban (van Dijk és mtsai. 2000).

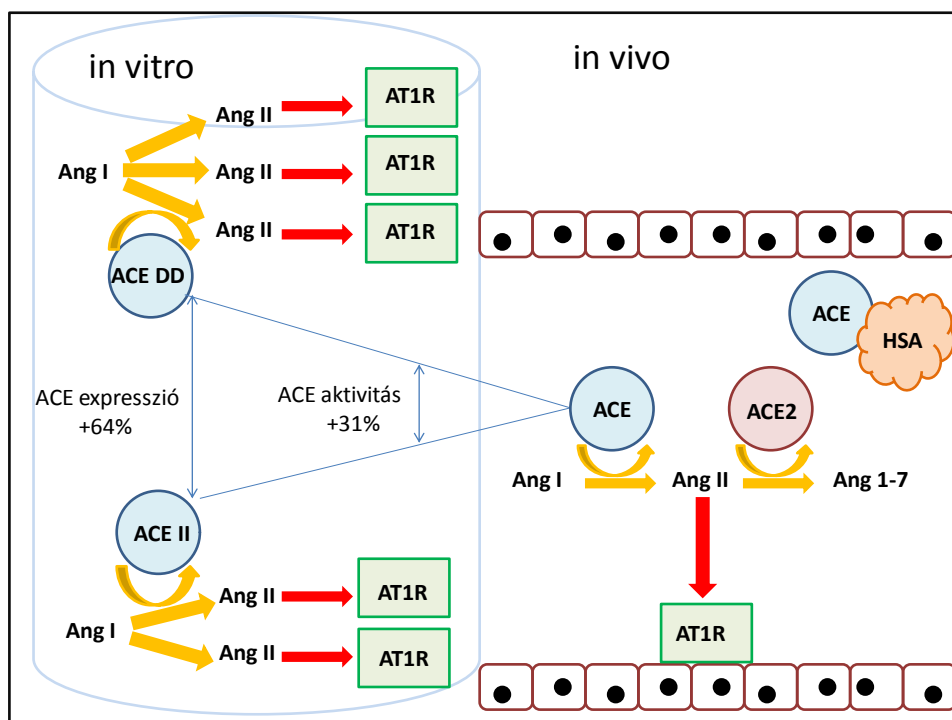
Fontos megjegyezni, hogy a probléma bonyolultabb annál, mint a szérumban ACE aktivitás precíz meghatározása. Részben, mert korábbi vizsgálatok arról tájékoztattak, hogy a szérumban hígításának az ACE aktivitási értékeire szignifikáns hatása volt (Lieberman és Sastre 1986). Ezen hatás csökkentése érdekében magas hígítási faktor használatát javasolják (Muller 2002). Ez összecseng a munkacsoportunk eredményeivel, amennyiben a szérumban albumin endogén ACE gátlóként azonosítottuk $K_i = 5,7 \pm 0,7$ mg/ml értékkel. Azt tapasztaltuk, hogy ha a szérumban albumin eltávolítjuk a humán szérumból, az aktuális szérumban ACE aktivitás magasabb, és a dilúciós hatás elmarad.

Jelen vizsgálatunk legnagyobb újdonsága az, hogy klinikai körülmények között mutat rá a szérumban albumin ACE gátló hatására. A betegek szérumban 4,1-szeresére emelkedett ACE koncentráció mellett 2,1-szeresre emelkedett ACE aktivitás azt sugallja, hogy a szérumban ACE aktivitás szabályozott. Az enzim koncentrációján kívül is hozzájárulnak faktorok az ACE aktivitáshoz. Ezen túl egy ilyen faktor elnyomhatja az ACE aktivitását különböző ACE expressziós szinteken, feltételezve egy endogén ACE aktivitást stabilizáló mechanizmus meglétét. Ez a szuppressziós hatás klinikailag szignifikáns lehet akkor is, ha a keringő ACE szint genetikai faktorok (pl. az ACE I/D polimorfizmusa) vagy megbetegedés következtében megemelkedik. Az ACE gén *saar* régiójában létrejövő pontmutáció például 5-szörösére emeli a keringő ACE koncentrációját (Kramers és mtsai. 2001). Ezt a mutációt legalább 8 családban sikerült azonosítani, de nem találtak ezzel korreláló klinikai eltérést vagy hipertóniát. Egy másik mutáció, mely 13-szorosra emelte meg a szérumban ACE koncentrációt, szintén nem okozott a kardiovaszkuláris megbetegedések megjelenésében emelkedést (Nesterovitch és mtsai. 2009). Az ACE gén számos egyéb mutációjához társul az ACE koncentráció enyhe emelkedése a kardiovaszkuláris megbetegedések incidenciájának erősödése nélkül (Semmler és mtsai. 2006),(Eyries és mtsai. 2001),(Linnebank és mtsai. 2003),(Persu és mtsai. 2013). Mindezen megfigyelések azt

sugallják, hogy az ACE koncentrációban kialakuló jelentős különbségek *in vivo* jól tolerálhatóak. Ez a tolerabilitás azzal magyarázható, hogy az ACE aktivitást endogén faktorok alacsonyabb szinten stabilizálják. A munkacsoport korábbi eredményei a HSA-t azonosították, mint egy ilyen endogén ACE inhibitor. Jelen tanulmányunkban pedig azt vizsgáltuk, hogy a humán szérumban a szérumban albumin milyen mértékben felelős az ACE endogén gátlásáért. Az ACE aktivitás mértéke meghatározható adott mennyiségű HSA jelenlétében (például 56 ± 14 U/ml $2,4 \pm 0,3$ mg/ml HSA mellett), de csökken, ha a HSA koncentrációját növeljük, összhangban a HSA ACE-gátló képességével (például az ACE aktivitás 9 ± 10 U/ml-re csökken, ha a HSA koncentrációja 12 ± 1 mg/ml-re emelkedik).

Sajnos hígítatlan szérumban az ACE aktivitás direkt meghatározása nem volt kivitelezhető. Az ACE aktivitását 4-szeres hígítás után mértük, mert a szérumban 340 nm-en jelentős fény abszorpcióval rendelkezik, amely lehetetlenné teszi az alkalmazott szubsztrát átalakulásának mérését. Mindazonáltal az ACE aktivitást hígítatlan szérumban becsültük meg a szérumban albumin és az ACE koncentráció mérésével, illetve 20-szoros hígításnál mért ACE aktivitás és a korábban humán szérumban meghatározott HSA gátló konstans ($K_i = 5,7 \pm 0,7$ mg/ml) felhasználásával. Ezeket a méréseket és számításokat figyelembe véve - eredményeink alapján - a hígítatlan humán szérumban ACE aktivitása $8,5 \pm 2,2$ U/ml körül lehet.

A humán szérumban mintákban általunk is mért ACE (127 ng/ml) és szérumban albumin (48 mg/ml) koncentrációk felvetik, hogy az ACE koncentráció eltérései mögött a HSA pufferoló hatása áll. A szérumban albumin 10-szer magasabb koncentrációban van jelen, mint a HSA ACE gátló K_i mennyisége. Ezek a mért értékek felvetették annak lehetőségét, hogy az ACE jelentős mértékben HSA-hoz kötött, gátolt formában van a vérkeringésben (15. ábra).



15. ábra: A RAAS rendszer működése *in vitro* és *in vivo*

AT1R: angiotenzin II 1. típusú receptora, AngI: angiotenzin I, AngII: angiotenzin II, ACE DD: DD homozigóta genotípusú angiotenzin konvertáz enzim, ACE II: II homozigóta genotípusú angiotenzin konvertáz enzim, ACE 2: angiotenzin konvertáz enzim 2, HSA: humán szérum albumin, Ang 1-7: angiotenzin 1-7

A szérum ACE aktivitás megfigyelt szuppressziója gyakorlatilag jelentős következtetések alapjául szolgálhat. Nagy fokú *in vivo* endogén ACE gátlás esetén ugyanis a fiziológias angiotenzin II koncentrációt az angiotenzin II eliminációja jelentősen befolyásolhatja. Ebben az esetben a RAAS aktivációját, mely a kardiovaszkuláris megbetegedések (mint pl. hipertónia, szívelégtelenség) alapját képezi, az angiotenzin II csökkenő eliminációja is okozhatja. Az ACE2 (Tipnis és mtsai. 2000) az egyik legjobban karakterizált enzim, mely az angiotenzin II eliminációjában is szerepet játszik, ismereteink szerint aktivációja védelmet nyújt a hipertónia, miokardiális fibrózis, remodelling (Ferreira és mtsai. 2011) és vesekárosodással szemben (Oudit és mtsai. 2010). Ezzel összhangban kutatócsoportunk is igazolta az ACE2 szerepét a hipertónia és a szív szisztolés funkciója között (Úri és mtsai. 2014).

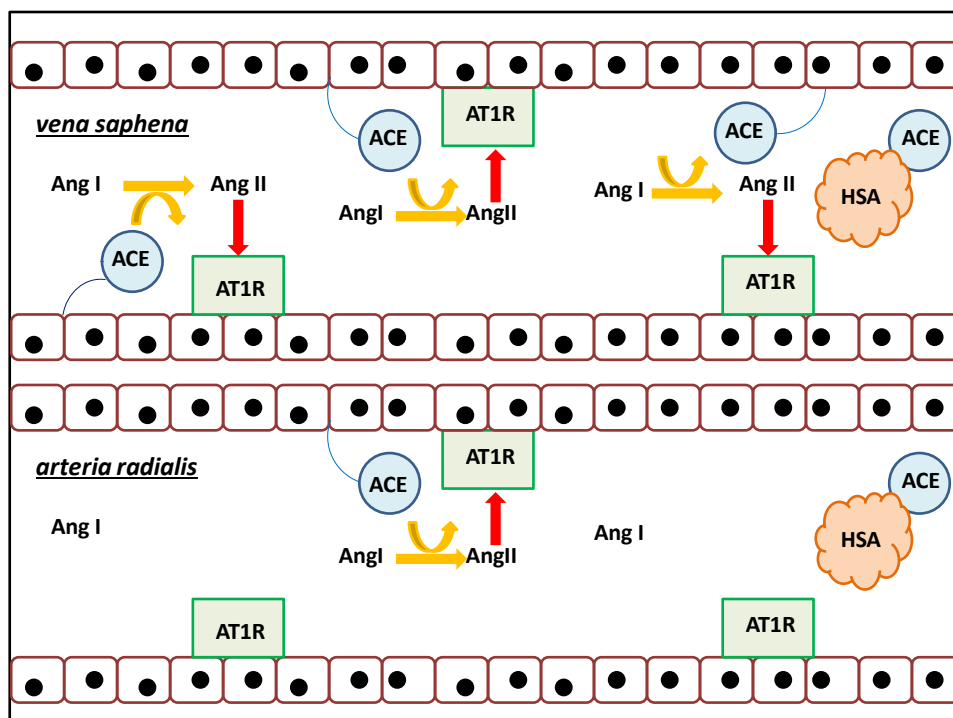
A másik következtetés szerint a szérum albumin koncentráció hathat a RAAS funkciójára az ACE aktivitás modulációján keresztül. Eredményeink azt vetik fel, hogy az ACE jól

szupprimált, amíg a szérum albumin koncentráció legalább 30 mg/ml. Mindazonáltal a humán szérum albumin koncentráció a fenti szint alá csökkenhet pl. fehérje malnutrició és veseelégtelenség esetén is. Eredményeink alapján felmerül, hogy humán szérum albumin infúzió adásával az ACE gátlás fokozódhat, melyet az a megfigyelés is alátámaszt, miszerint posztoperatív használt humán szérum albumin infúzió gyakorta okozott hipotenziót ACE gátló terápiában részesülő betegekben (Howard és mtsai. 2001).

További kutatásaink humán érmintákon, koronária bypass (CABG) műtetre kerülő betegek érszövet mintáin: *vena saphena*kon és *arteria radiálison* zajlottak, és a szöveti ACE vizsgálatára irányultak.

A bypass műtött betegek hosszú távú túlélését jelentősen meghatározza a felvarrt ér konduktivitása, amely viszont az érszövet típusától is függ. Az artériás graftok élethossza kedvezőbb a *vena saphena* graftokénál (Bradshaw és mtsai. 2002). Közel 40 év telt el a bypass műtét bevezetése óta, a vénás graft-elégtelenség aránya elfogadhatatlanul magas (Parang és Arora 2009), mégis a *vena saphena* a leggyakrabban felhasznált graft típus napjainkban is. A *vena saphena* graftok rövid túlélése miatt felmerül az igény egy graft-specifikus kezelésre, mellyel a CABG-n átesett betegek eseménytelen posztoperatív időszakát megnyújthatnánk. Ahhoz, hogy kialakítsunk egy graft-specifikus kezelést, meg kell értenünk a *saphena* graftok *arteria radialis*-szal szembeni fokozott vulnerabilitását befolyásoló tényezőket. A bypass műtét utáni első hónap során a *saphena* graft korai degenerációját thrombotikus okklúziós folyamatok okozzák. Később pedig a neointimális hiperplázian alapuló ateroszklerotikus, obstrukciós folyamatok dominálnak (Motwani és Topol 1998). Az angiotenzin konvertáz enzim (ACE) mindezen folyamatokban szerepet játszhat, mivel az ACE gátlás csökkenti a thrombocita aggregációt (Brown és mtsai. 1998), javítja az endothel funkciót (Miyazaki és mtsai. 1999), és mérsékli a neointima képződést (Okimoto és mtsai. 2001). Számos korábbi vizsgálat is jelentős javulást mutatott az ACE gátló kezelés hatására (QUO VADIS, APRES, HOPE vizsgálat) (Kjøller-Hansen és mtsai. 2000), (Oosterga és mtsai. 2001). Az IMAGINE vizsgálat viszont megkérdőjelezte az ACE gátló hasznosságát bypass műtött betegek terápiájában (Warnica és mtsai. 2002). Mindezen ellentmondásos eredmények tovább sarkalltak minket vizsgálataink pontos megtervezésére, kivitelezésére.

Vizsgálatunkban erőfeszítéseket tettünk annak érdekében, hogy igazoljuk *vena saphena* graftokon az ACE hatásának jelentőségét. Összehasonlítottuk a *vena saphena* és *arteria radialis* eredetű graft szövetmintákat. Eredményeink 2-szer nagyobb angiotenzin konvertáz enzim (ACE) expressziót és 2,5-szer hatékonyabb szöveti angiotenzin I-ből angiotenzin II (Ang I » Ang II) konverziót mutattak *saphena vena* mintákban, mint a *radialis arteriákban* (16. ábra).



16. ábra: A RAAS rendszer működése *arteria radialis* és *vena saphena* érmintákban

AT1R: angiotenzin II 1. típusú receptora, AngI: angiotenzin I, Ang II: angiotenzin II, ACE: angiotenzin konvertáz enzim, HSA: humán szérum albumin

További erőfeszítéseket tettünk a vérkeringésben fellelhető és a szövetekben kötött angiotenzin konvertáz enzim összehasonlítására. Feltételeztük, hogy a keringő ACE aktivitás meghatározása segíthet az egyedi rizikó felmérésében és a személyre szabott kezelés felállításában. Érdekes módon nem találtunk összefüggést a keringő és a szöveti lokalizációjú ACE expressziója között. Ennek a feltűnő megfigyelésnek az lehet a magyarázata, hogy míg a keringő ACE expressziója genetikai polimorfizmus által determinált (Rigat és mtsai. 1992), addig a szöveti ACE expresszió esetében ilyen háttérrel nem sikerült kimutatni. Ez a megfigyelés is magyarázhatja azt, hogy a szérum ACE

szinteknek (ACE polimorfizmusnak) a különböző kardiovaszkuláris betegségekben nincs szignifikáns jelentőségük, míg ugyanazon betegcsoportban az ACE gátlók jelentős terápiás eszköztárként szolgálnak. Ezen túl szembeötlő különbséget találtunk a keringő (szérum) és a szöveti (*vena saphena*) ACE mennyisége között captoprillal történő gátlás után. A szérum ACE-t a captopril már 15 nM-nál, míg a szöveti ACE-t csak az 1000-szer nagyobb dózisban, 10 μ M-os mennyiségnél tudta gátolni.

A szöveti ACE aktivitást funkcionális méréseken alapulva adtuk meg, a bypass felvarrása előtt már megszerzett graft-szövet mintákban vizsgáltuk az Ang I » Ang II konverziót. Meg kell említenünk, hogy a helyi ACE szinteket és ACE aktivitást a graft implantációval elméletileg egy időben vett vénás vérmintákból határoztuk meg.

Legvégül vizsgálatunk korlátairól is szót kell ejtenünk. A legfőbb limitáló tényezőt a kísérleti eredmények klinikai környezetbe történő átültetése jelentheti. Míg a captopril hatékonyan gátolja a keringő ACE aktivitást a fiziológiásnak megfelelő tartományon belül, a szöveti ACE gátlásra kevésbé volt hatékony. Ezen megállapításaink azt sugallják, az ACE gátlók közül némelyiknek nincs hatása a *vena saphena* graft szöveti ACE aktivitásának gátlására. Így elfedi, elhomályosítja a *vena saphena* graftok degenerációjának megelőzése céljából végzett klinikai vizsgálatok eredményeit. Ezen túl a graftok átjárhatóságára jótékonyan hathat a magasabb ACE aktivitás: a fokozott angiotenzin II mediálta értónus miatt emelkedik a véredényen történő vérátáramlás sebessége, csökken a lokális sztázis. A másik oldalon azonban az emelkedett angiotenzin II szint aktiválhatja a lokális neurohormonális mechanizmusokat, tovább bonyolítva a képet. Végül, de nem utolsó sorban a koronária keringésbe implantálása után a saphena vénák átjárhatósága, illetve véráramlási sajátossága jelentősen megváltozik.

Valószínűleg specifikusabban megvilágítaná az ACE gátló hatására változó, javuló *vena saphena* graftok átjárhatóságának kérdését, ha tovább tudnánk tesztelni kétféle ACE gátló összehasonlító vizsgálatával, melyek közül az egyik szelektívebben hat a saphena vénában fellelhető ACE-ra. Ezen felállásban a szisztémás ACE gátlás jótékony hatásai okozta komplikációk (pl. volumen háztartásra, vese anyagcserére kifejtett hatás következményei) elkerülhetőekké válnak.

Elmondhatjuk, hogy adataink szerint a humán szérumban az ACE aktivitás a szérumban albumin által szuppresszált, illetve puffert. A szérumban ACE aktivitás ezen szuppressziója alapján felmerül, hogy az angiotenzin II szintézis limitált, és így az angiotenzin II eliminációnak szignifikáns élettani szerepe lehet. Mindazonáltal, itt nyert klinikai adataink felvetik azt, hogy a fiziológiás ACE aktivitás ilyen gátlása hozzájárulhat az ACE I/D polimorfizmus által determinált eltérő ACE expressziós szintek tolerálásához.

Eredményeink továbbá azt mutatják, hogy *vena saphena*-ban az angiotenzin I angiotenzin II konverzió (Ang I » Ang II) jóval nagyobb hatékonysággal zajlik, mint a radialis artériákban. A *saphena* vénákban az angiotenzin konvertáz enzim expressziója magasabb, mint az artériákban. *Saphena* vénákban a szöveti ACE expressziója független az ACE ID gén polimorfizmusától, ellentétben ugyanazon betegek szérumban ACE koncentrációjával, mely mögött kimutatott a gén-polimorfizmus regulatórikus szerepe. A szöveti és szérumban ACE expressziója egymástól független folyamat. A captopril szöveti és szérumban ACE-ra kifejtett gátló potenciálja szignifikánsan különbözik.

Végül elmondhatjuk, hogy adataink rávilágítanak az ACE gátló kezelés jelentőségére *vena saphena*-val graftolt betegek esetén: a szövet-specifikus ACE gátló használata javíthatja a *saphena* graftok átjárhatóságát, elnyújtva ezzel életképességüket. Javasoljuk a magas szöveti affinitású ACE gátlót tartalmazó terápia bevezetését minden *vena saphena* graft implantáción átesett beteg esetében.

ÖSSZEFOGLALÁS

A mindennapi orvosi gyakorlatban az 5. leggyakrabban felírt gyógyszercsoport az angiotenzin konvertáz enzim (ACE) gátlók csoportja, mely a kardiovaszkuláris terápia alapját képezi.

Korábbi vizsgálatunkban a szérumból albumint endogén ACE gátlóként azonosítottuk $K_i = 5,7 \pm 0,7$ mg/ml értékkel. Ha a szérumból albumint eltávolítottuk a humán szérumból, az aktuális szérumból ACE aktivitás magasabb volt. Jelen vizsgálatunk legnagyobb újdonsága az, hogy klinikai körülmények között mutat rá a szérumból albumin ACE gátló hatására. A szérumból ACE aktivitás nem korrelál teljesen az ACE koncentrációval. A betegek szérumból 4,1x-re emelkedett ACE koncentráció mellett 2,1x-re emelkedett ACE aktivitás azt sugallja, hogy a szérumból ACE aktivitás szabályozott. Adicionális faktorok (az enzim koncentrációján kívül) is hozzájárulhatnak az ACE aktivitáshoz. Ezen túl egy ilyen faktor elnyomhatja az ACE aktivitását különböző ACE expressziós szinteken, feltételezve egy endogén ACE aktivitást stabilizáló mechanizmus meglétét. Vizsgáltuk továbbá *vena saphena* graftokon az angiotenzin konvertáz enzim hatásának jelentőségét. Összehasonlítottuk a *vena saphena* és *arteria radialis* eredetű graft szövetmintákat. A sérülékenyebb *vena saphena* graftokon 2-szer nagyobb angiotenzin konvertáz enzim (ACE) expressziót és 2,5-szer hatékonyabb szöveti angiotenzin I-ből angiotenzin II (Ang I » Ang II) konverziót igazoltunk, mint a radialis arteriákban. *Saphena* vénákban a szöveti ACE expressziója független az ACE ID gén polimorfizmusától, ellentétben ugyanazon betegek szérumból ACE koncentrációjával, mely mögött kimutatott a gén-polimorfizmus regulatórikus szerepe. A szöveti és szérumból ACE expressziója egymástól független folyamat. A captopril szöveti és szérumból ACE-ra kifejtett gátló potenciálja szignifikánsan különbözik.

Összefoglalva: a fiziológiás ACE aktivitás HSA-val történő gátlása hozzájárulhat az ACE I/D polimorfizmus által meghatározott eltérő ACE expressziós szintek tolerálásához, így a különböző szív és érrendszeri betegségek kialakulási valószínűségének mérsékléséhez. Adataink az ACE gátló kezelés fontosságára hívják fel a figyelmet *vena saphena* graftot kapó páciensek esetén: a szövetspecifikus ACE gátló használata javíthatja a *saphena* graftok átjárhatóságát.

Tárgyszavak: *saphena* vena graft, angiotenzin konvertáz enzim, humán szérumból albumin

SUMMARY

The renin-angiotensin-aldosterone system is one of the best researched and the well cured pathophysiological unit in the medical everyday routine. The fifth most frequently prescribed group of drugs are the ACE inhibitors, which gives the principle of the cardiovascular therapy.

In our previous study we have identified the human serum albumin as an endogenous ACE inhibitor with an IC₅₀ value of 5.7±0.7 mg/mL. The apparent serum ACE activity is higher and the effect of dilution is missing when serum albumin is removed from the human sera. The major novelty of the present work is to show that serum albumin suppresses ACE activity in clinical setup. Serum ACE activity did not correlate perfectly with the ACE concentration. A 4.1-fold increase in ACE concentration resulted in 2.1-fold increase in ACE activity in the patient's sera, suggesting that serum ACE activity is regulated. Additional factors than the concentration of the enzyme contribute to the ACE activity. Moreover, this factor suppressed the effects of the different ACE expression levels on ACE activity, suggesting the existence of an endogenous ACE activity stabilizing mechanism. Furthermore we examined the importance of ACE in saphenous vein graft tissue samples, and compared the saphenous vein and radial artery graft tissues. Our data suggested about 2-fold higher ACE expression and about 2.5-fold more effective tissue Ang I to Ang II conversion in more vulnerable saphenous veins compared to radial arteries. The tissue ACE expression was not affected by the ACE I/D polymorphism in saphenous veins in contrast with circulating ACE expression regulated by gene polymorphism. No relationship was found between circulating and tissue located ACE expression. Striking differences were found between circulating and tissue ACE in terms of their inhibition by captopril.

In summary, clinical data provided here suggest that this suppression of physiological ACE activity may contribute to the tolerance of different ACE expression levels, determined by ACE I/D polymorphism, and can reduce the risk of evaluation of cardiovascular diseases. Our data draw attention to the notability of the ACE inhibitor therapy after bypass operation with saphenous vein grafts: vascular tissue specific ACE inhibitors may improve saphenous vein patency after CABG operation.

Key words: saphenous vein graft, angiotensin converting enzyme, human serum albumin

TÁMOGATÁS

Vizsgálatainkat az alábbi támogatások segítségével végeztük:

- Magyar Akadémia Tudományos OTKA (K84300, 068363),
- Magyar Egészségügyi Minisztérium (ETT 377/2009),
- TÁMOP 4.2.1./B-09/1/ KONV-2010-0007 TÁMOP 4.2.2.A-11/1/ KONV-2012-0045, REG-EA-09-1-2009-0013 projekt,
- MSD Magyarország Kft.,
- Pfizer Magyarország Kft.,
- Projekt az Új Magyar Fejlesztési Alapon (az Európai Szociális Alappal társ-finanszírozva) és a Magyar Nemzeti Innovációs Hivatalon (Baross Gábor Projekt, ÉletMent.).

IRODALOMJEGYZÉK

- Agerholm-Larsen, B., Nordestgaard, B.G., Tybjaerg-Hansen, A., 2000. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(2), pp.484–92.
- Angelini, G.D., 1992. Saphenous vein graft failure: etiologic considerations and strategies for prevention. *Current Opinion in Cardiology*, 7(6), pp.939–44.
- Barry, A.R., Koshman, S.L., Norris, C.M., Ross, D.B., Pearson, G.J., 2014. Evaluation of preventive cardiovascular pharmacotherapy after coronary artery bypass graft surgery. *Pharmacotherapy*, 34(5), pp.464–72.
- Belleau, L.J., Earley, L.E., 1967. Autoregulation of renal blood flow in the presence of angiotensin infusion. *The American Journal of Physiology*, 213(6), pp.1590–5.
- Beneteau, B., Baudin, B., Morgant, G., Giboudeau, J., Baumann, F.C., 1986. Automated kinetic assay of angiotensin-converting enzyme in serum. *Clinical Chemistry*, 32(5), pp.884–6.
- Bian, B., Kelton, C.M.L., Guo, J.J., Wigle, P.R., 2010. ACE Inhibitor and ARB utilization and expenditures in the Medicaid fee-for-service program from 1991 to 2008. *Journal of Managed Care Pharmacy : JMCP*, 16(9), pp.671–9.
- Bikdeli, B., Hassantash, S.-A., Pourabdollah, M., Kalantarian, S., Sadeghian, M., Afshar, H., Sabeti, S., Marzban, M., Ahmadi, H., Mohammadi, F., 2012. Histopathologic insight into saphenous vein bypass graft disease. *Cardiology*, 123(4), pp.208–15.
- Biron, P., Koiw, E., Nowaczynski, W., Brouillet, J., Genest, J., 1961. The effects of intravenous infusion of valine-5 angiotensin II and other pressor agents on urinary electrolytes and corticosteroids, including aldosterone. *The Journal of Clinical Investigation*, 40(2), pp.338–47.
- Bourassa, M.G., Lespérance, J., Eastwood, C., Schwartz, L., Côté, G., Kazim, F., Hudon, G., 1991. Clinical, physiologic, anatomic and procedural factors predictive of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Journal of the American College of Cardiology*, 18(2), pp.368–76.
- Bradshaw, P.J., Jamrozik, K., Le, M., Gilfillan, I., Thompson, P.L., 2002. Mortality and recurrent cardiac events after coronary artery bypass graft: long term outcomes in a population study. *Heart (British Cardiac Society)*, 88(5), pp.488–94.
- Brown, N.J., Agirbasli, M.A., Williams, G.H., Litchfield, W.R., Vaughan, D.E., 1998. Effect of activation and inhibition of the renin-angiotensin system on plasma PAI-1. *Hypertension*, 32(6), pp.965–71.

- Chen, Q., Yang, Y., Huang, Y., Pan, C., Liu, L., Qiu, H., 2013. Angiotensin-(1-7) attenuates lung fibrosis by way of Mas receptor in acute lung injury. *The Journal of Surgical Research*, 185(2), pp.740–7.
- Chen, Y.-H., Liu, J.-M., Hsu, R.-J., Hu, S.-C., Harn, H.-J., Chen, S.-P., et al., 2012. Angiotensin converting enzyme DD genotype is associated with acute coronary syndrome severity and sudden cardiac death in Taiwan: a case-control emergency room study. *BMC Cardiovascular Disorders*, 12, p.6.
- Cohn, J.N., Johnson, G., Ziesche, S., Cobb, F., Francis, G., Tristani, F., et al., 1991. A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. *The New England Journal of Medicine*, 325(5), pp.303–10.
- Collaboration, P.-T., 2013. Optimizing chronic disease management mega-analysis: economic evaluation. *Ontario Health Technology Assessment Series*, 13(13), pp.1–148.
- Collaborative, 1995. ISIS-4: a randomised factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58,050 patients with suspected acute myocardial infarction. ISIS-4 (Fourth International Study of Infarct Survival) Collaborative. *Lancet*, 345(8951), pp.669–85.
- Companioni Nápoles, O., Sautié Castellanos, M., Leal, L., Casavilla, R., Camacho, H., Ferrer, A., et al., 2007. ACE I/D polymorphism study in a Cuban hypertensive population. *Journal of Clinical Chemistry*, 378(1-2), pp.112–6.
- Cox, J.L., Chiasson, D.A., Gotlieb, A.I., 1991. Stranger in a strange land: the pathogenesis of saphenous vein graft stenosis with emphasis on structural and functional differences between veins and arteries. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 34(1), pp.45–68.
- Cuspidi, C., Muiesan, M.L., Valagussa, L., Salvetti, M., Di Biagio, C., Agabiti-Rosei, E., Magnani, B., Zanchetti, A., 2002. Comparative effects of candesartan and enalapril on left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension: the candesartan assessment in the treatment of cardiac hypertrophy (CATCH) study. *Journal of Hypertension*, 20(11), pp.2293–300.
- Dandona, P., Dhindsa, S., Ghanim, H., Chaudhuri, A., 2007. Angiotensin II and inflammation: the effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade. *Journal of Human Hypertension*, 21(1), pp.20–7.
- Dawber, T.R., Kannel, W.B., 1958. An epidemiologic study of heart disease: the Framingham study. *Nutrition Reviews*, 16(1), pp.1–4.
- Dawber, T.R., Kannel, W.B., 1966. The Framingham study. An epidemiological approach to coronary heart disease. *Circulation*, 34(4), pp.553–5.

- Van Dijk, M.A., Kroon, I., Kamper, A.M., Boomsma, F., Danser, A.H., Chang, P.C., 2000. The angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and responses to angiotensins and bradykinin in the human forearm. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 35(3), pp.484–90.
- Dzau, V.J., Bernstein, K., Celermajer, D., Cohen, J., Dahlöf, B., Deanfield, J., et al., 2001. The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. *The American Journal of Cardiology*, 88(9A), p.1L–20L.
- Eyries, M., Michaud, A., Deinum, J., Agrapart, M., Chomilier, J., Kramers, C., Soubrier, F., 2001. Increased shedding of angiotensin-converting enzyme by a mutation identified in the stalk region. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(8), pp.5525–32.
- Fagyas, M., Úri, K., Siket, I.M., Daragó, A., Boczán, J., Bányai, E., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A., 2014. New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) I: endogenous angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition. *PloS One*, 9(4), p.e87843.
- Fagyas, M., Úri, K., Siket, I.M., Fülöp, G.Á., Csató, V., Daragó, A., Boczán, J., Bányai, E., Szentkirályi, I.E., Maros, T.M., Szerafin, T., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A., 2014. New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) II: albumin suppresses angiotensin converting enzyme (ACE) activity in human. *PloS One*, 9(4), p.e87844.
- Favaloro, R.G., 1968. Saphenous vein autograft replacement of severe segmental coronary artery occlusion: operative technique. *The Annals of Thoracic Surgery*, 5(4), pp.334–9.
- Fedor, R., Asztalos, L., Locsey, L., Szabó, L., Mányiné, I.S., Fagyas, M., Lizanecz, E., Tóth, A., 2011. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme predicts left ventricular hypertrophy after renal transplantation. *Transplantation Proceedings*, 43(4), pp.1259–60.
- Feghhi, M., Nikzamir, A., Esteghamati, A., Farahi, F., Nakhjavani, M., Rashidi, A., 2008. The relationship between angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and proliferative retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 81(3), pp.e1–4.
- Ferdinand, K.C., 2003. Recommendations for the management of special populations: racial and ethnic populations. *American Journal of Hypertension*, 16(11 Pt 2), p.50S–54S.
- Ferguson, T.B., Hammill, B.G., Peterson, E.D., DeLong, E.R., Grover, F.L., 2002. A decade of change—risk profiles and outcomes for isolated coronary artery bypass grafting procedures, 1990-1999: a report from the STS National Database Committee and the Duke Clinical Research Institute. Society of Thoracic Surgeons. *The Annals of Thoracic Surgery*, 73(2), pp.480–9.

- Ferrario, C.M., 2011. ACE2: more of Ang-(1-7) or less Ang II? *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 20(1), pp.1–6.
- Ferreira, A.J., Shenoy, V., Qi, Y., Fraga-Silva, R.A., Santos, R.A.S., Katovich, M.J., Raizada, M.K., 2011. Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against hypertension-induced cardiac fibrosis involving extracellular signal-regulated kinases. *Experimental Physiology*, 96(3), pp.287–94.
- Fihn, S.D., Blankenship, J.C., Alexander, K.P., Bittl, J.A., Byrne, J.G., Fletcher, B.J., et al., 2014. 2014 ACC/AHA/AATS/PCNA/SCAI/STS Focused Update of the Guideline for the Diagnosis and Management of Patients With Stable Ischemic Heart Disease. *Journal of the American College of Cardiology*.
- Fox, K.M., 2003. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet*, 362(9386), pp.782–8.
- Fyhrquist, F., 1986. Clinical pharmacology of the ACE inhibitors. *Drugs*, 32 Suppl 5, pp.33–9.
- Garratt, K.N., Edwards, W.D., Kaufmann, U.P., Vlietstra, R.E., Holmes, D.R., 1991. Differential histopathology of primary atherosclerotic and restenotic lesions in coronary arteries and saphenous vein bypass grafts: analysis of tissue obtained from 73 patients by directional atherectomy. *Journal of the American College of Cardiology*, 17(2), pp.442–8.
- Globocnik-Petrovic, M., Hawlina, M., Peterlin, B., Petrovic, D., 2003. Insertion/deletion plasminogen activator inhibitor 1 and insertion/deletion angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms in diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Ophthalmologica*, 217(3), pp.219–24.
- Go, A.S., Mozaffarian, D., Roger, V.L., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Borden., et al., 2013. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 127(1), pp.e6–e245.
- Gomez, C., Berteina-Raboin, S., De Nanteuil, G., Guillaumet, G., 2013. Perindopril and ramipril phosphonate analogues as a new class of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Bioorganic és Medicinal Chemistry*, 21(22), pp.7216–21.
- Greenberg, B., Quinones, M.A., Koilpillai, C., Limacher, M., Shindler, D., Benedict, C., Shelton, B., 1995. Effects of long-term enalapril therapy on cardiac structure and function in patients with left ventricular dysfunction. Results of the SOLVD echocardiography substudy. *Circulation*, 91(10), pp.2573–81.
- Greenberg, R., Osman, G.H., O'Keefe, E.H., Antonaccio, M.J., 1979. The effects of captopril (SQ 14,225) on bradykinin-induced bronchoconstriction in the anesthetized guinea pig. *European Journal of Pharmacology*, 57(4), pp.287–94.

- Gross, F., 1968. Control of aldosterone secretion by the renin-angiotensin system and by corticotropin. *Advances in Internal Medicine*, 14, pp.281–339.
- Hamm, C.W., Bassand, J.-P., Agewall, S., Bax, J., Boersma, E., Bueno, H., et al., 2012. [ESC guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevati. *Giornale Italiano di Cardiologia*, 13(3), pp.171–228.
- Hara, M., Sakata, Y., Nakatani, D., Suna, S., Usami, M., Matsumoto, S., et al., 2014. Renin-angiotensin-aldosterone system polymorphisms and 5-year mortality in survivors of acute myocardial infarction: a report from the Osaka Acute Coronary Insufficiency Study. *International Heart Journal*, 55(3), pp.190–6.
- Hayashi, N., Yamamoto, K., Ohishi, M., Tatara, Y., Takeya, Y., Shiota, A., et al., 2010. The counterregulating role of ACE2 and ACE2-mediated angiotensin 1-7 signaling against angiotensin II stimulation in vascular cells. *Hypertension Research*, 33(11), pp.1182–5.
- Hoogwerf, B.J., Young, J.B., 2000. The HOPE study. Ramipril lowered cardiovascular risk, but vitamin E did not. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 67(4), pp.287–93.
- Howard, G., Downward, G., Bowie, D., 2001. Human serum albumin induced hypotension in the postoperative phase of cardiac surgery. *Anaesthesia and Intensive Care*, 29(6), pp.591–4.
- Jermendy, G., Ruggerenti, P., 2007. Preventing microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 23(2), pp.100–10.
- Jiang, T., Gao, L., Lu, J., Zhang, Y.-D., 2013. ACE2-Ang-(1-7)-Mas Axis in Brain: A Potential Target for Prevention and Treatment of Ischemic Stroke. *Current Neuropharmacology*, 11(2), pp.209–17.
- Johnston, C.I., Jackson, B., Cubela, R., Larmour, I., Arnold, L., 1986. Evaluation of angiotensin converting enzyme (ACE) in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of ACE inhibitors. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 8 Suppl 1, pp.S9–14.
- Joviliano, E.E., Dellalibera-Joviliano, R., Celotto, A.C., Capellini, V.K., Dalio, M.B., Picconato, C.E., Evora, P.R.B., 2011. Pharmacology of the human saphenous vein. *Current Vascular Pharmacology*, 9(4), pp.501–20.
- Kajantie, E., Rautanen, A., Kere, J., Andersson, S., Ylihärsilä, H., Osmond, C., Barker, D.J.P., Forsén, T., Eriksson, J., 2004. The effects of the ACE gene insertion/deletion polymorphism on glucose tolerance and insulin secretion in elderly people are modified by birth weight. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(11), pp.5738–41.

- Kannel, W.B., 2002. The Framingham Study: historical insight on the impact of cardiovascular risk factors in men versus women. *The Journal of Gender-Specific Medicine*, 5(2), pp.27–37.
- Keeley, E.C., Boura, J.A., Grines, C.L., 2003. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet*, 361(9351), pp.13–20.
- Kehoe, P.G., Russ, C., Mcllory, S., Williams, H., Holmans, P., Holmes, C., et al., 1999. Variation in DCP1, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease. *Nature Genetics*, 21(1), pp.71–2.
- Kim, F.Y., Marhefka, G., Ruggiero, N.J., Adams, S., Whellan, D.J., 2013. Saphenous vein graft disease: review of pathophysiology, prevention, and treatment. *Cardiology in Review*, 21(2), pp.101–9.
- Kjøller-Hansen, L., Steffensen, R., Grande, P., 2000. The Angiotensin-converting Enzyme Inhibition Post Revascularization Study (APRES). *Journal of the American College of Cardiology*, 35(4), pp.881–8.
- Klauser, R.J., Robinson, C.J., Marinkovic, D. V, Erdös, E.G., 1979. Inhibition of human peptidyl dipeptidase (angiotensin I converting enzyme: kininase II) by human serum albumin and its fragments. *Hypertension*, 1(3), pp.281–6.
- Kramers, C., Danilov, S.M., Deinum, J., Balyasnikova, I. V, Scharenborg, N., Looman, M., et al., 2001. Point mutation in the stalk of angiotensin-converting enzyme causes a dramatic increase in serum angiotensin-converting enzyme but no cardiovascular disease. *Circulation*, 104(11), pp.1236–40.
- Kuhn, E.W., Liakopoulos, O.J., Choi, Y.H., Wahlers, T., 2011. Current evidence for perioperative statins in cardiac surgery. *The Annals of Thoracic Surgery*, 92(1), pp.372–9.
- Kulik, A., Desai, N.R., Shrank, W.H., Antman, E.M., Glynn, R.J., Levin, R., et al., 2013. Full prescription coverage versus usual prescription coverage after coronary artery bypass graft surgery: analysis from the post-myocardial infarction free Rx event and economic evaluation (FREEE) randomized trial. *Circulation*, 128(11 Suppl 1), pp.S219–25.
- Lees, K.R., MacFadyen, R.J., Doig, J.K., Reid, J.L., 1993. Role of angiotensin in the extravascular system. *Journal of Human Hypertension*, 7 Suppl 2, pp.S7–12.
- Li, H., Zhao, D., Yang, Q., 2014. [Meta-analysis of the association between angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and susceptibility to children with Henoch-Schönlein purpura or Henoch-Schölein purpura nephritis]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 94(26), pp.2039–44.

- Lieberman, J., Sastre, A., 1986. An angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor in human serum. Increased sensitivity of the serum ACE assay for detecting active sarcoidosis. *Chest*, 90(6), pp.869–75.
- Lin, J.-J., Yueh, K.-C., Chang, D.-C., Lin, S.-Z., 2002. Association between genetic polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene and Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 199(1-2), pp.25–9.
- Linnebank, M., Kesper, K., Jeub, M., Urbach, H., Wüllner, U., Klockgether, T., Schmidt, S., 2003. Hereditary elevation of angiotensin converting enzyme suggesting neurosarcoidosis. *Neurology*, 61(12), pp.1819–20.
- Loforte, A., Marinelli, G., Musumeci, F., Folesani, G., Pilato, E., Martin Suarez, S., et al., 2014. Extracorporeal membrane oxygenation support in refractory cardiogenic shock: treatment strategies and analysis of risk factors. *Artificial Organs*, 38(7), pp.E129–41.
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., et al., Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380(9859), pp.2095–128.
- Lüders, S., Schrader, J., Berger, J., Unger, T., Zidek, W., Böhm, M., Middeke, M., Motz, W., Lübcke, C., Gansz, A., Brokamp, L., Schmieder, R.E., Trenkwalder, P., Haller, H., Dominiak, P., 2008. The PHARAO study: prevention of hypertension with the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril in patients with high-normal blood pressure: a prospective, randomized, controlled prevention trial of the German Hypertension League. *Journal of Hypertension*, 26(7), pp.1487–96.
- Maron, B.J., Towbin, J.A., Thiene, G., Antzelevitch, C., Corrado, D., Arnett, D., et al., 2006. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functio. *Circulation*, 113(14), pp.1807–16.
- De Martino, R.R., Eldrup-Jorgensen, J., Nolan, B.W., Stone, D.H., Adams, J., Bertges, D.J., et al., 2014. Perioperative management with antiplatelet and statin medication is associated with reduced mortality following vascular surgery. *Journal of Vascular Surgery*, 59(6), pp.1615–21, 1621.e1.
- Matsumoto, A., Iwashima, Y., Abiko, A., Morikawa, A., Sekiguchi, M., Eto, M., Makino, I., 2000. Detection of the association between a deletion polymorphism in the gene encoding angiotensin I-converting enzyme and advanced diabetic retinopathy. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 50(3), pp.195–202.
- McMurray, J.J. V, Adamopoulos, S., Anker, S.D., Auricchio, A., Böhm, M., Dickstein, K., et al., 2012. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic

- Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart. *European Journal of Heart Failure*, 14(8), pp.803–69.
- Miyazaki, M., Sakonjo, H., Takai, S., 1999. Anti-atherosclerotic effects of an angiotensin converting enzyme inhibitor and an angiotensin II antagonist in Cynomolgus monkeys fed a high-cholesterol diet. *British Journal of Pharmacology*, 128(3), pp.523–9.
- Montalescot, G., Sechtem, U., Achenbach, S., Andreotti, F., Arden, C., Budaj, A., et al., 2013. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal*, 34(38), pp.2949–3003.
- Motwani, J.G., Topol, E.J., 1998. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation*, 97(9), pp.916–31.
- Muller, B.R., 2002. Analysis of serum angiotensin-converting enzyme. *Annals of Clinical Biochemistry*, 39(Pt 5), pp.436–43.
- Murray, B.A., Walsh, D.J., FitzGerald, R.J., 2004. Modification of the furanacryloyl-L-phenylalanyl-glycylglycine assay for determination of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 59(2), pp.127–37.
- Nesterovitch, A.B., Hogarth, K.D., Adarichev, V.A., Vinokour, E.I., Schwartz, D.E., Solway, J., Danilov, S.M., 2009. Angiotensin I-converting enzyme mutation (Trp1197Stop) causes a dramatic increase in blood ACE. *PLoS One*, 4(12), p.e8282.
- Ng, D.P.K., Tai, B.C., Koh, D., Tan, K.W., Chia, K.S., 2005. Angiotensin-I converting enzyme insertion/deletion polymorphism and its association with diabetic nephropathy: a meta-analysis of studies reported between 1994 and 2004 and comprising 14,727 subjects. *Diabetologia*, 48(5), pp.1008–16.
- NI Miocardico, 1996. Six-month effects of early treatment with lisinopril and transdermal glyceryl trinitrate singly and together withdrawn six weeks after acute myocardial infarction: the GISSI-3 trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico. *Journal of the American College of Cardiology*, 27(2), pp.337–44.
- Nissen, S.E., Nicholls, S.J., Sipahi, I., Libby, P., Raichlen, J.S., Ballantyne, et al., 2006. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA*, 295(13), pp.1556–65.
- Niu, T., Chen, X., Xu, X., 2002. Angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and cardiovascular disease: therapeutic implications. *Drugs*, 62(7), pp.977–93.

- Okimoto, T., Imazu, M., Hayashi, Y., Gomyo, Y., Sekiguchi, Y., Yanagihara., et al., 2001. Quinapril with high affinity to tissue angiotensin-converting enzyme reduces restenosis after percutaneous transcatheter coronary intervention. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 15(4), pp.323–9.
- Ondetti, M.A., Rubin, B., Cushman, D.W., 1977. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science*, 196(4288), pp.441–4.
- Oosterga, M., Voors, A.A., Pinto, Y.M., Buikema, H., Grandjean, J.G., Kingma, J.H., Crijns, H.J., van Gilst, W.H., 2001. Effects of quinapril on clinical outcome after coronary artery bypass grafting (The QUO VADIS Study). QUinapril on Vascular Ace and Determinants of Ischemia. *The American Journal of Cardiology*, 87(5), pp.542–6.
- Oshima, T., Nakano, Y., Matsumoto, T., Ozono, R., Kambe, M., Ishioka, N., et al., 1997. [Evaluation of angiotensin I converting enzyme gene polymorphism in patients with essential hypertension and coronary artery disease]. *Rinsho byori. The Japanese Journal of Clinical Pathology*, 45(2), pp.115–21.
- Oudit, G.Y., Crackower, M.A., Backx, P.H., Penninger, J.M., 2003. The role of ACE2 in cardiovascular physiology. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 13(3), pp.93–101.
- Oudit, G.Y., Liu, G.C., Zhong, J., Basu, R., Chow, F.L., Zhou, J., Loibner, H., Janzek, E., Schuster, M., Penninger, J.M., Herzenberg, A.M., Kassiri, Z., Scholey, J.W., 2010. Human recombinant ACE2 reduces the progression of diabetic nephropathy. *Diabetes*, 59(2), pp.529–38.
- Paragh, G., Márk, L., Zámolyi, K., Pados, G., Ofner, P., 2007. Lipid-modifying therapy and attainment of cholesterol goals in Hungary: the return on expenditure achieved for lipid therapy (REALITY) study. *Clinical Drug Investigation*, 27(9), pp.647–60.
- Parang, P., Arora, R., 2009. Coronary vein graft disease: pathogenesis and prevention. *The Canadian Journal of Cardiology*, 25(2), pp.e57–62.
- Passos-Silva, D.G., Verano-Braga, T., Santos, R.A.S., 2013. Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. *Clinical Science*, 124(7), pp.443–56.
- Pereira, V.M., Reis, F.M., Santos, R.A.S., Cassali, G.D., Santos, S.H.S., Honorato-Sampaio, K., dos Reis, A.M., 2009. Gonadotropin stimulation increases the expression of angiotensin-(1--7) and MAS receptor in the rat ovary. *Reproductive Sciences*, 16(12), pp.1165–74.
- Pérez-Castrillón, J.L., Silva, J., Justo, I., Sanz, A., Martín-Luquero, M., Igea, R., et al., 2003. Effect of quinapril, quinapril-hydrochlorothiazide, and enalapril on the bone mass of hypertensive subjects: relationship with angiotensin converting enzyme polymorphisms. *American journal of hypertension*, 16(6), pp.453–9.

- Persu, A., Lambert, M., Deinum, J., Cossu, M., de Visscher, N., Irengé, L., et al., 2013. A novel splice-site mutation in angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene, c.3691+1G>A (IVS25+1G>A), causes a dramatic increase in circulating ACE through deletion of the transmembrane anchor. *PLoS One*, 8(4), p.e59537.
- Peter, I., Shearman, A.M., Zucker, D.R., Schmid, C.H., Demissie, S., Cupples., et al., 2005. Variation in estrogen-related genes and cross-sectional and longitudinal blood pressure in the Framingham Heart Study. *Journal of Hypertension*, 23(12), pp.2193–200.
- Puymirat, E., Battler, A., Birkhead, J., Bueno, H., Clemmensen, P., Cottin, Y., et al., 2013. Euro Heart Survey 2009 Snapshot: regional variations in presentation and management of patients with AMI in 47 countries. *European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care*, 2(4), pp.359–70.
- Rigat, B., Hubert, C., Alhenc-Gelas, F., Cambien, F., Corvol, P., Soubrier, F., 1990. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *The Journal of Clinical Investigation*, 86(4), pp.1343–6.
- Rigat, B., Hubert, C., Corvol, P., Soubrier, F., 1992. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Research*, 20(6), p.1433.
- Robles, N.R., Cerezo, I., Hernandez-Gallego, R., 2014. Renin-angiotensin system blocking drugs. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 19(1), pp.14–33.
- Rosito, G.A., D'Agostino, R.B., Massaro, J., Lipinska, I., Mittleman, M.A., Sutherland, P., et al., 2004. Association between obesity and a prothrombotic state: the Framingham Offspring Study. *Thrombosis and Haemostasis*, 91(4), pp.683–9.
- Ryan, J.W., Martin, L.C., Chung, A., Pena, G.A., 1979. Mammalian inhibitors of angiotensin converting enzyme (kininase II). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 120B, pp.599–606.
- Rydén, L., Grant, P.J., Anker, S.D., Berne, C., Cosentino, F., Danchin, N., et al., 2014. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD - Summary. *Diabetes és Vascular disease research*, 11(3), pp.133–73.
- Sayed-Tabatabaei, F.A., Houwing-Duistermaat, J.J., van Duijn, C.M., Witteman, J.C.M., 2003. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid artery wall thickness: a meta-analysis. *Stroke*, 34(7), pp.1634–9.
- Schieffer, B., Wirger, A., Meybrunn, M., Seitz, S., Holtz, J., Riede, U.N., Drexler, H., 1994. Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. *Circulation*, 89(5), pp.2273–82.

- Schulman, I.H., Raij, L., 2008. The angiotensin II type 2 receptor: what is its clinical significance? *Current Hypertension Reports*, 10(3), pp.188–93.
- Semmler, A., Stein, R.W., Caplan, L., Danilov, S.M., Klockgether, T., Linnebank, M., 2006. Hereditary hyper-ACE-emia due to the Pro1199Leu mutation of somatic ACE as a potential pitfall in diagnosis: a first family outside Europe. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44(9), pp.1088–9.
- Sharma, P., 1998. Meta-analysis of the ACE gene in ischaemic stroke. *Journal of neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 64(2), pp.227–30.
- Staessen, J.A., Wang, J.G., Ginocchio, G., Petrov, V., Saavedra, A.P., Soubrier, F., Vlietinck, R., Fagard, R., 1997. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. *Journal of Hypertension*, 15(12 Pt 2), pp.1579–92.
- Stamler, J., 1985. The marked decline in coronary heart disease mortality rates in the United States, 1968-1981; summary of findings and possible explanations. *Cardiology*, 72(1-2), pp.11–22.
- Taylor, J., 2012. Joint societies CVD Prevention Guidelines launched in May 2012. *European Heart Journal*, 33(13), p.1539.
- Tendera, M., Aboyans, V., Bartelink, M.-L., Baumgartner, I., Clément, D., Collet, J.-P., et al., 2011. ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: the Task Force on the Diagnosis and Treatm. *European Heart Journal*, 32(22), pp.2851–906.
- Than, A., Leow, M.K.-S., Chen, P., 2013. Control of adipogenesis by the autocrine interplays between angiotensin 1-7/Mas receptor and angiotensin II/AT1 receptor signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(22), pp.15520–31.
- Thevananther, S., Brecher, A.S., 1999. Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) binding protein from human serum with an ACE affinity column. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 77(3), pp.216–23.
- Tipnis, S.R., Hooper, N.M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., Turner, A.J., 2000. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(43), pp.33238–43.
- Tom, B., Garrelds, I.M., Scalbert, E., Stegmann, A.P.A., Boomsma, F., Saxena, P.R., Danser, A.H.J., 2003. ACE-versus chymase-dependent angiotensin II generation in human coronary arteries: a matter of efficiency? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(2), pp.251–6.

- Underwood, M.J., Coumbe, A., 1994. Histological changes in venous grafts. *Journal of Clinical Pathology*, 47(1), p.94.
- Unger, T., Ganten, D., Lang, R.E., Schölkens, B.A., 1985. Persistent tissue converting enzyme inhibition following chronic treatment with Hoe498 and MK421 in spontaneously hypertensive rats. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 7(1), pp.36–41.
- Úri, K., Fagyas, M., Mányiné Siket, I., Kertész, A., Csanádi, Z., Sándorfi, G., Clemens, M., Fedor, R., Papp, Z., Édes, I., Tóth, A., Lizanecz, E., 2014. New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) IV: circulating ACE2 as a biomarker of systolic dysfunction in human hypertension and heart failure. *PloS One*, 9(4), p.e87845.
- Velagaleti, R.S., Pencina, M.J., Murabito, J.M., Wang, T.J., Parikh, N.I., D’Agostino, R.B., et al., 2008. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation*, 118(20), pp.2057–62.
- Veldkamp, R.F., Valk, S.D., van Domburg, R.T., van Herwerden, L.A., Meeter, K., 2000. Mortality and repeat interventions up until 20 years after aorto-coronary bypass surgery with saphenous vein grafts. A follow-up study of 1041 patients. *European Heart Journal*, 21(9), pp.747–53.
- Vittorio, T.J., Ahuja, K., Kasper, M., Turalic, H., Tseng, C.-H., Jorde, U.P., Go, C., 2007. Comparison of high- versus low-tissue affinity ACE-inhibitor treatment on circulating aldosterone levels in patients with chronic heart failure. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System : JRAAS*, 8(4), pp.200–4.
- Wald, N.J., Law, M.R., 2003. A strategy to reduce cardiovascular disease by more than 80%. *BMJ (Clinical research ed.)*, 326(7404), p.1419.
- Warnica, J.W., Gilst, W. Van, Baillet, R., Johnstone, D., Block, P., et al., 2002. Ischemia Management with Accupril post bypass Graft via Inhibition of angiotensin coNverting enzyme (IMAGINE): a multicentre randomized trial - design and rationale. *The Canadian Journal of Cardiology*, 18(11), pp.1191–200.
- Weir, M.R., Dzau, V.J., 1999. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *American Journal of Hypertension*, 12(12 Pt 3), p.205S–213S.
- Wijns, W., Kolh, P., Danchin, N., Di Mario, C., Falk, V., Folliguet, T., et al., 2010. Guidelines on myocardial revascularization. *European Heart Journal*, 31(20), pp.2501–55.
- Yanagawa, B., Algarni, K.D., Singh, S.K., Deb, S., Vincent, J., Elituv, R., et al., 2013. Clinical, biochemical, and genetic predictors of coronary artery bypass graft failure. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*.

- Yang, H.Y., Erdös, E.G., Levin, Y., 1970. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 214(2), pp.374–6.
- Yvan-Charvet, L., Quignard-Boulangé, A., 2011. Role of adipose tissue renin-angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity. *Kidney International*, 79(2), pp.162–8.
- Zannad, F., 1993. Trandolapril. How does it differ from other angiotensin converting enzyme inhibitors? *Drugs*, 46 Suppl 2, pp.172–81; discussion 182.
- Zhang, K., Cheng, D., Yi, L., Shi, H., Zhen, G., 2014. Association between angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and susceptibility to cancer: a meta analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(9), pp.6291–300.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Tóth Attilának**, aki bölcs türelmével egyengette szárnypróbálgatásaimat a rögzös kutatói pályán. Köszönetem szeretném kifejezni **Prof. Dr. Édes Istvánnak**, a Kardiológiai Klinika intézetvezetőjének, hogy lehetővé tette számomra a klinikum átmeneti feladását a kutatás érdekében. Hálával tartozom **Prof. Dr. Papp Zoltánnak**, a Klinikai Fiziológiai Tanszék vezetőjének, aki megnyitotta előttem a kutatók világát. Elmondhatatlan hálával tartozom **Dr. Fagyas Miklósnak**, aki önzetlen, segítők munkájával lekötelezett. Remélem, gyümölcsöző együttműködésünk a jövőben is fennmarad. Mélységes tiszteletem illeti meg **Mányiné Siket Ivettát**, akire a szorgos hétköznapokban bármikor számíhattam, számíthatok, aki laboratóriumi gyakorlati ismereteivel bármikor segítségemre sietett. Nagy szeretettel gondolok kis csapatunkra: **Dr. Czikora Ágnesre**, **Dr. Rutkai Ibolyára**, **Dr. Beleznai Tímeára**, **Dr. Fehér Attilára**, akikkel állatkísérleteinket reggelente elindítottuk, illetve a Klinikai Fiziológiai Tanszék valamennyi dolgozójára. Hálával tartozom a **Szívsebészeti Klinika orvosainak**, akik kísérleteinkhez a mintákat rendszeresen biztosították, illetve biztosítják. Legvégül elmondhatom, hogy szerető **családom** támogatása nélkül ez a munka nem készülhetett volna el.



Nyilvántartási szám: DEENK/59/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Daragó Andrea
Neptun kód: EGOY54
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10037215

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Fagyas, M., Úri, K., Siket, M.I., **Daragó, A.**, Boczán, J., Bányai, E., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A.:
New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) III: Endogenous inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) provides protection against cardiovascular diseases.
PLoS One. 9 (4), 29 p., 2014.
IF:3.534 (2013)
2. **Daragó, A.**, Fagyas, M., Siket, M.I., Facskó, A., Megyesi, Z., Kalász, J., Galajda, Z., Szerafin, T., Hársfalvi, J., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A., Szentmiklósi, J.: Differences in Angiotensin Convertase Enzyme (ACE) Activity and Expression May Contribute to Shorter Event Free Period After Coronary Artery Bypass Graft Surgery.
Cardiovasc. Ther. 30 (3), 136-144, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00252.x>
IF:2.852





További Közlemények

3. Fagyas, M., Úri, K., Siket, M.I., **Daragó, A.**, Boczán, J., Bányai, E., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A.:
New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) I: Endogenous
angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition.
PLoS One. 9 (4), 29 p., 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087843>
IF:3.534 (2013)
4. Fagyas, M., Úri, K., Siket, M.I., Fülöp, G.Á., Csató, V., **Daragó, A.**, Boczán, J., Bányai, E.,
Szentkirályi, I.E., Maros, T.M., Szerafin, T., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A.: New perspectives in
the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) II: Albumin suppresses angiotensin
converting enzyme (ACE) activity in human.
PLoS One. 9 (4), 28 p., 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087844>
IF:3.534 (2013)
5. Czikora, Á., Lizanecz, E., Boczán, J., **Daragó, A.**, Papp, Z., Édes, I., Tóth, A.: Vascular
metabolism of anandamide to arachidonic acid affects myogenic constriction in response to
intraluminal pressure elevation.
Life Sci. 90 (11-12), 407-415, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2011.12.016>
IF:2.555
6. Domokos É., Kardos L., Bednársky I., Bene O., Bódi A., **Daragó A.**, Fülöp T., Homoródi N., Péter
A., Rácz I., Hegedűs I., Kertész A.B.: Az interventrikuláris szeptum mérése
echokardiográfiával: Mérési különbségek és klinikai következményeik.
Cardiol. Hung. 41, 15-20, 2011.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16,009

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
6,386**

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

Debrecen, 2015.03.13.

