

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Angiotenzin-konvertáló enzim: a gyógyszeres terápia labordiagnosztikát befolyásoló hatása és enzimaktivitás mérés vizeletben

Dr. Szabó Attila Ádám

Témavezető: Dr. Fagyas Miklós



**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2026**

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	1
1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
2. BEVEZETÉS	4
3. ELMÉLETI ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
3.1. A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer	5
3.2. Az angiotenzin-konvertáló enzim	7
3.3. A szarkoidózis	9
3.4. Az ACE mint diagnosztikai biomarker	11
3.5. ACE-gátló gyógyszerek	12
3.6. Endogén ACE-gátlás	13
4. CÉLKITŰZÉS	14
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	15
5.1. Vizsgálati populációk	15
5.2. Biológiai minták gyűjtése, kezelése	16
5.3. Szérum ACE-aktivitás meghatározás	16
5.4. A szérum ACE-gátlás mértékének meghatározása	17
5.5. Vizelet ACE-aktivitás meghatározás	17
5.6. A vizelet ACE-aktivitás-mérő esszé specificitásának meghatározása	18
5.7. Vizelet ACE-aktivitás-mérés immunodepléciót követően	19
5.8. A biológiai minták stabilitásának vizsgálata	19
5.9. A vizelet kreatinin koncentrációjának meghatározása	19
5.10. Etikai engedély	19
5.11. Statisztikai elemzés	20
6. EREDMÉNYEK	21
6.1. A gyógyszeres terápia labordiagnostikát befolyásoló hatása	21

6.1.1.	Az ACE-gátló interferencia objektív kimutatásának hígítás alapú módszertani megközelítése	21
6.1.2.	ACE-gátlót szedők aránya a diagnosztikai célú ACE-aktivitás-mérésen átesők körében.....	22
6.1.3.	Az ACE-gátló gyógyszerek hatása a szérum ACE-aktivitásra	23
6.1.4.	ACE-gátló terápia miatti fals negatív vizsgálati eredmények gyakorisága.....	25
6.1.5.	A betegdokumentáció átvizsgálásának tanulságai	27
6.2.	Enzimaktivitás-mérés vizeletben.....	29
6.2.1.	A vizelet endogén ACE-gátlók molekulatömegének meghatározása	29
6.2.2.	A hígítás hatása a vizelet ACE-aktivitásra és az enzim farmakológiai gátolhatósága.....	30
6.2.3.	A vizelet ACE-aktivitás-mérő módszer specificitásának vizsgálata.....	31
6.2.4.	A vizelet ACE természetes endogén inhibitorai	34
6.2.5.	A vizelet ACE-aktivitás stabilitása különböző tárolási körülmények között...	35
6.2.6.	A vizelet ACE-aktivitás szoros korrelációja a vizelet kreatinin koncentrációval	35
6.2.7.	Az ACE-gátló kezelés hatása a vizelet ACE-aktivitásra.....	36
7.	MEGBESZÉLÉS.....	38
8.	ÚJ EREDMÉNYEK	47
9.	ÖSSZEFOGLALÁS	48
10.	SUMMARY	49
11.	IRODALOMJEGYZÉK.....	50
11.1.	Hivatkozott közlemények jegyzéke	50
11.2.	Saját közlemények jegyzéke	63
12.	TÁRGYSZAVAK.....	66
13.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	67

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Abz	o-aminobenzoésav
ACE	angiotenzin-konvertáló enzim (angiotensin-converting enzyme)
ACE2	angiotenzin-konvertáló enzim 2 (angiotensin-converting enzyme 2)
ACEi	angiotenzin-konvertáló enzim gátló (angiotensin-converting enzyme-inhibitor)
ACE I/D	ACE inzerció/delécio polimorfizmus
Ang I	angiotenzin I
Ang II	angiotenzin II
AT ₁	angiotenzin II 1-es típusú receptor
AT ₂	angiotenzin II 2-es típusú receptor
B ₁	bradikinin 1-es típusú receptor
B ₂	bradikinin 2-es típusú receptor
CD143	cluster of differentiation 143, angiotenzin-konvertáló enzim sejtfelszíni marker
CKD	krónikus vesebetegség (chronic kidney disease)
Dnp	dinitrofenil
FAPGG	N-[3-(2-furil)akriloil]-L-fenilalanil-glicil-glicin
GFR	glomeruláris filtrációs ráta
GnRH	gonadotropin-felszabadító hormon (gonadotropin-releasing hormone)
HSA	humán szérumalbumin (human serum albumin)
IC ₅₀	félmaximális gátló koncentráció
LC-MS/MS	folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria
Mas	Mas receptor
NO	nitrogén-monoxid
PGI ₂	prosztaciklin
RAAS	renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (renin-angiotensin-aldosterone system)
TRIS	tris(hidroximetil)-aminometán
uACE	vizelet ACE (urinary ACE)
WASOG	World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders

2. BEVEZETÉS

A szarkoidózis ismeretlen etiológiájú, szisztémás granulomatózus gyulladásos betegség, amely heterogén klinikai megjelenése és változatos lefolyása miatt a mindennapi klinikai gyakorlatban gyakran jelent diagnosztikai kihívást (1). A diagnózis felállítása rendszerint a klinikai kép, a radiológiai eltérések és a szövettani lelet együttes értékelésén alapul. A biopszia betegeket megterhelő invazív jellege azonban jelentős igényt teremt olyan laboratóriumi biomarkerek iránt, amelyek támogatják a diagnosztikai döntéshozatalt és alkalmasak a betegség aktivitásának követésére (2).

A keringő angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) aktivitása granulomatózus folyamatok esetén, így szarkoidózisban is megemelkedhet. A klinikai gyakorlatban az ACE-aktivitás meghatározása a szarkoidózis diagnosztikájában legszélesebb körben alkalmazott biomarker (3). Az ACE azonban egyúttal a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) központi eleme és a kardiovaszkuláris betegségek kezelésének kiemelt terápiás célpontja is (4,5). Ennek következtében a szarkoidózis gyanújával vizsgált betegek egy része egyidejű angiotenzin-konvertáló enzim gátló (ACE-gátló) kezelésben részesülhet, ami közvetlenül befolyásolja az ACE-aktivitás értékek értelmezhetőségét (6,7). A probléma jelentőségét növeli, hogy a gyógyszeresedésre vonatkozó információ a mindennapi klinikai gyakorlatban számos esetben kizárólag a beteg önbevallásán alapul.

Az enzimaktivitás alapú biomarkerek alkalmazhatóságát ugyanakkor nemcsak exogén, hanem endogén gátló hatások is korlátozhatják. Szérumban az ACE aktivitását a humán szérumalbumin reverzibilis, hígításfüggő módon befolyásolja (8,9). A vizeletben ezzel analóg módon régen felfedezett, kismolekulájú endogén inhibitorok jelenléte gyakorlatilag elfedi a vizelet ACE (uACE) aktivitását (10). Az interferencia klinikai relevanciáját hangsúlyozza, hogy irodalmi adatok alapján az uACE-aktivitás potenciális biomarker lehet a proximális tubuláris epithel károsodásával járó kórállapotokban (11,12).

Az ACE tehát olyan diagnosztikai biomarker, amelynek interpretációját egyszerre befolyásolhatják exogén és endogén inhibitorok. Eddigi kutatómunkám során megkísértem olyan laboratóriumi módszerek kidolgozását, amelyek képesek ezen interferenciák objektív felismerésére vagy kiküszöbölésére, ezáltal támogatva a kapott eredmények helyes értelmezését és a klinikusi döntéshozatalt.

3. ELMÉLETI ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer a szervezet só- és vízháztartás homeosztázisának fenntartásáért és a vérnyomás szabályozásáért felelős egyik legfőbb neurohormonális rendszere (13,14). Első komponensét, a renint, Tiegerstedt és Bergman mutatta ki 1898-ban nyúl vesekéregből (15), ezzel megalapozva a későbbi kutatásokat. Az angiotenzin II-t Page és mtsai., valamint Braun-Menendez és mtsai. egymástól függetlenül azonosították 1940-ben (16,17). Ezt követően Simpson és mtsai. 1953-ban találtak rá az aldoszteronra (18), míg Skeggs és mtsai. 1954 és 1957 között közölték az angiotenzin I, az angiotenzin-konvertáló enzim és az angiotenzinogén felfedezését (19–21). A komponensek egymáshoz való funkcionális kapcsolódása az 1960-as évek közepére vált egyértelművé (22).

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer egy dinamikusan szabályozott enzimátikus kaszkád (23). Aktiválódása bekövetkezhet a csökkent keringési volumenhez kapcsolódóan kialakuló csökkent renális perfúzió (a vas afferens falában érzékelt nyomáscsökkenés), a macula densa által detektált alacsony nátrium-klorid koncentráció, valamint a fokozott szimpatikus tónus hatására létrejövő β_1 -adrenerg receptor aktiváció következtében (23,24).

A rendszer kiindulópontja a máj által folyamatosan termelt angiotenzinogén, amely egy nagy molekulatömegű, α_2 -globulin típusú plazmafehérje. Ennek proteolitikus hasítását a fentebbi ingerek hatására a juxtaglomeruláris apparátus granuláris sejtjei által szintetizált renin végzi, amely a keringésbe jutva az angiotenzinogén N-terminális végéből egy tíz aminosavból álló peptidet, az angiotenzin I-et (Ang I) szabadítja fel (25).

Az Ang I önmagában csekély biológiai aktivitással rendelkezik. A dekapeptidet a pulmonális keringés vaszkuláris endothel felszínén nagy mennyiségben expresszáldó angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) két aminosav lehasításával angiotenzin II-vé (Ang II) alakítja (25,26). Az Ang II a RAAS legfontosabb effektor molekulája, amely rövid felezési ideje ellenére kifejezett élettani hatásokat közvetít.

Hatásai elsősorban az AT_1 -típusú receptoron keresztül érvényesülnek. Ennek aktivációja vazokonstriktort vált ki, fokozza az aldoszteron és vazopresszin felszabadulását, növeli a nátrium- és vízretenciót, valamint proliferatív és profibrotikus jelátviteli utak aktiválásához vezet (27,28). Az AT_2 -receptor ezzel szemben ellentétes folyamatokat indít el, ideértve a vazodilatációt, a nitrogén-monoxid termelés fokozását és az antiproliferatív hatásokat

(29). A két receptor közötti funkcionális egyensúly meghatározó a kardiovaszkuláris homeosztázis fenntartásában.

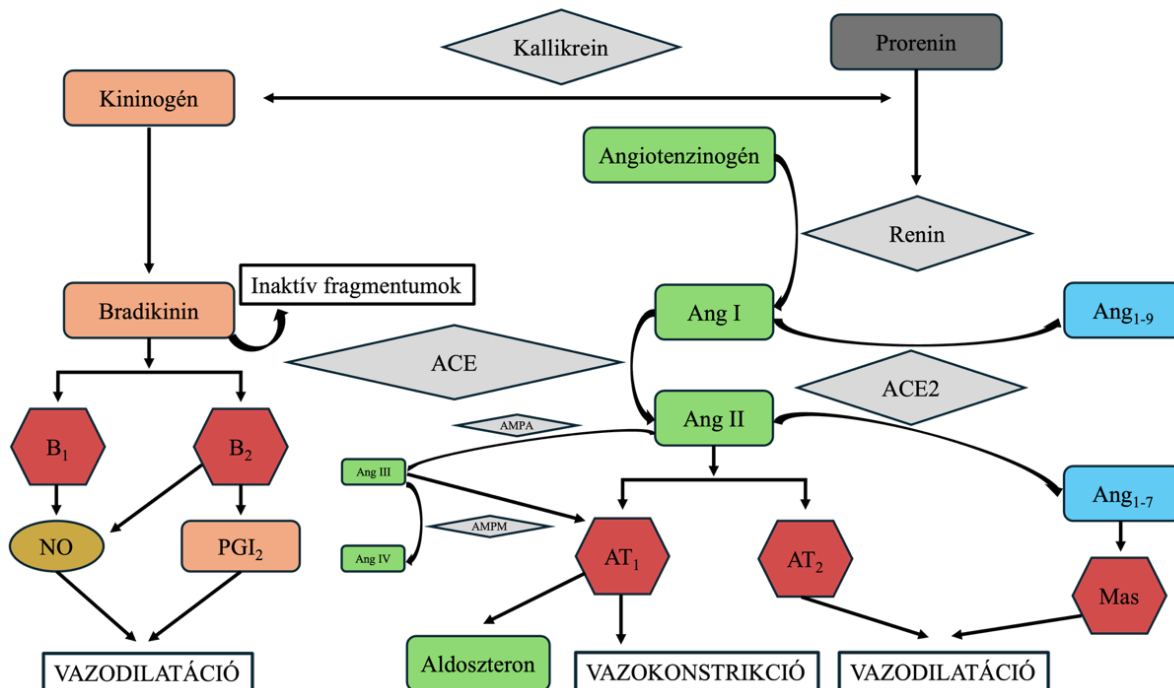
Az Ang II további enzimátikus hasítások útján katabolizálódik. Az aminopeptidáz A az Ang II-ből angiotenzin III-at képez, amely a fő effektor molekula hatásait még részben megtartja (30,31). Ezt követően az aminopeptidáz M angiotenzin IV-et generál, amely szerepe kevésbé domináns a klasszikus RAAS útvonalhoz képest (32).

A rendszer komplexitását tovább növeli az angiotenzin-konvertáló enzim 2 (ACE2) által meghatározott ellenregulációs tengely. Az ACE2 az Ang I és az Ang II hasítására is képes (33,34). Az Ang II katabolizálásával angiotenzin 1-7-et hoz létre, amely a Mas receptoron keresztül fejti ki hatásait (35). Az angiotenzin 1-7 - Mas tengely mérsékli az AT₁-receptor mediálta kedvezőtlen folyamatokat: vazoprotektív, antifibrotikus és antioxidáns mechanizmusokat aktivál (35,36). Ez a kiegyensúlyozó rendszer különösen jelentős kóros állapotokban, amikor a klasszikus ACE - Ang II - AT₁ útvonal túlsúlya alakul ki.

Összességében a RAAS nem egy lineáris hormonális útvonal, hanem egymással kölcsönhatásban álló, többirányú szabályozási hálózat, amelynek központi eleme az angiotenzin-konvertáló enzim (1. ábra).

Kinin - Kallikrein rendszer

Renin - Angiotenzin - Aldoszteron rendszer (RAAS)



1. ábra - Az ACE kulcsszereppel bír a renin-angiotenzin-aldoszteron és a kinin-kallikrein rendszerben.

Az ACE az inaktív angiotenzin I-ből a RAAS rendszer fő effektor molekuláját, az angiotenzin II-t hozza létre. A kinin-kallikrein rendszerben a bradikinin hasításával inaktív fragmentumokat képez. Az ACE-aktivitása a RAAS aktiválásán és a bradikinin inaktiválásán keresztül a vazokonstriktív tónus irányába tolja el az egyensúlyt (37). Ang: angiotenzin, ACE: angiotenzin-konvertáló enzim, ACE2: angiotenzin-konvertáló enzim 2, AMPA: Amino-peptidáz A, AMPM: Amino-peptidáz M, B₁/B₂: bradikinin receptor, NO: nitrogén-monoxid, PGI₂: prosztaciklin

3.2. Az angiotenzin-konvertáló enzim

Az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE; kinináz II; peptidil-dipeptidáz A; CD143; EC 3.4.15.1) egy cinkfüggő metallopeptidáz (38). Legismertebb élettani funkciója, az Ang I - Ang II konverzió mellett több bioaktív peptid metabolizmusában vesz részt. Szubsztrátja többek között a P-anyag, az amiloid-β peptid, a Met-enkefalin, a Leu-enkefalin, a gonadotropin-felszabadító hormon, a neurotensin és a bradikinin (39,40). A bradikinin lebontásán keresztül az ACE modulálja a kinin-kallikrein rendszer hatásait, csökkenti a vazodilatációt, illetve a nitrogén-monoxid termelés, valamint a prosztaciklin termelés mértékét (1. ábra) (41). E kettős (RAAS és kinin-kallikrein rendszert érintő) szerepkör megmagyarázza, hogy az ACE miért vált a kardiovaszkuláris és renális szabályozás egyik kiemelt kutatási fókuszává (42).

Az ACE-t kódoló 21 000 bp hosszúságú gén a 17-es kromoszóma hosszú karján helyezkedik el (17q23) (43). A 26 exonból és 25 intronból álló szakaszból két izoenzim expresszálódik, a tesztikuláris és a szomatikus ACE (44).

A tesztikuláris ACE kizárólag a herékben fejeződik ki. A 95-105 kDa molekulatömegű fehérje egyetlen aktív centrummal rendelkezik (45). Állatkísérletek bizonyítékai alapján kiemelt szereppel bír a reprodukció biztosításában (46).

A keringésben és szövetekben jelen lévő szomatikus ACE nagy molekulatömegű (150-180 kDa), nagymértékben glikozilált fehérje, amely a sejtfelszínhez egy rövid C-terminális intracelluláris szakaszon és egy hidrofób transzmembrán régió keresztül rögzül (47). A katalitikusan aktív globuláris rész a sejten kívüli térben helyezkedik el. A szomatikus ACE sajátossága, hogy két, funkcionálisan nem teljesen azonos katalitikus doménnel rendelkezik (N- és C-domén), ami evolúciósan génduplikációval magyarázható (43). Bár a két domén aktív centrumának kulcsmotívumai konzerváltak (HEMGH), a domének szubsztrátspecifitása és szabályozása eltér (40,48,49). Az Ang I hasítása a C domén aktív centrumon hatékonyabb, míg a bradikinin katabolizmusa mindkét aktív centrumon hasonló hatékonysággal történik (40). A két domén eltérő szabályozási tulajdonságai (a C-domén aktív centrum működése jobban függ a kloridionok jelenlététől, illetve kevésbé hőstabil) a gyógyszerhatások és a szöveti funkciók értelmezése szempontjából relevánsak (40).

A szomatikus ACE változatos szöveti eloszlást mutat. Nagy mennyiségben expresszálódik számos szerv vaszkuláris endotheljének felszínén (50,51), továbbá kimutatható a vese és a vékonybél hámsejtjeinek apikális membránján (43,52,53), valamint neuroepithelialis sejtekben (54) és monocitákban is (55). A vese vonatkozásában lényeges, hogy irodalmi adatok alapján az ACE a proximális tubulus kefeszegélyének membránfehérjei közé tartozik (56). A tubuláris lokalizáció összhangban állhat azokkal a felvetésekkel, amelyek szerint az ACE részt vehet a luminalis bradikinin-inaktivációban, és ezen keresztül hatással lehet a nátrium- és vízvisszaszívásra, illetve az aminosav és bikarbonát-reabszorpció szabályozására (26,57,58).

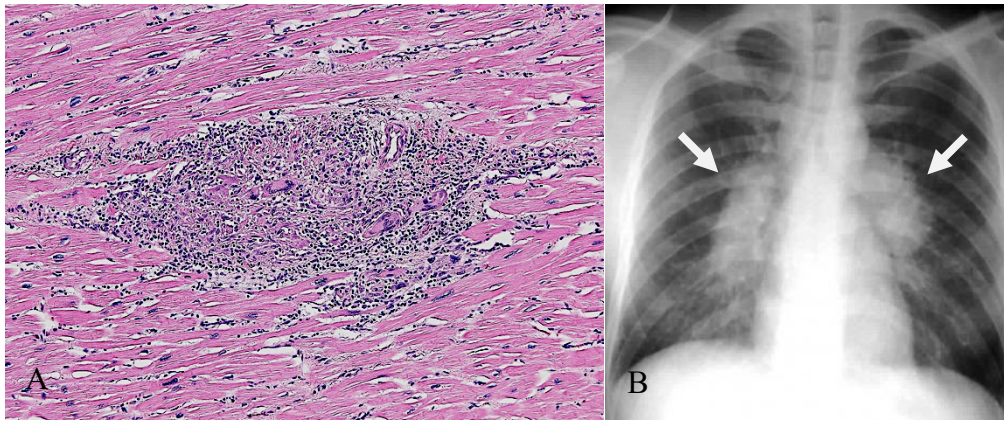
Az ACE a szervezetben a membránkötött forma mellett szolubilis formában is megtalálható. A membránhoz rögzült enzim extracelluláris részének proteolitikus hasítása (shedding) révén az ACE a keringésbe kerül (59,60). Hasonló mechanizmus feltételezhető a vizeletben jelen lévő ACE esetén is (61), azonban bizonyos körülmények között a filtrált plazma eredetű ACE megjelenése sem zárható ki teljes mértékben. A különböző források aránya vélhetően függ a vesefunkciótól és az epithel integritásától egyaránt.

A keringő ACE mennyisége és aktivitása jelentős egyének közötti variabilitást mutat. Ennek egyik legismertebb genetikai háttere az ACE inzerció/delécio (I/D) polimorfizmusa, amely egy nem kódoló, ismétlődő szekvencia jelenlétéhez vagy hiányához köthető az ACE gén intronikus régiójában (62). A D-allélel rendelkező egyének esetében magasabb, míg az I-allélel rendelkező egyének esetében alacsonyabb szérumszintű ACE koncentráció és aktivitás mutatható ki.

3.3. A szarkoidózis

A szarkoidózis ismeretlen etiológiájú, szisztémás gyulladásos betegség, amelyben el nem sajtosodó epithelioid sejt granulóma jelennek meg testszerte a különböző szövetekben (2.A ábra) (1). A kórkép előfordulása elsősorban fiatal- és középkorú felnőttekben gyakori, ugyanakkor az elmúlt évtizedekben eltolódás figyelhető meg a szarkoidózis idősebb életkorban történő diagnosztizálása irányába (63). A betegség lefolyása változatos. Egyes esetek spontán remisszióval zárulnak, míg más egyénekben krónikus, progresszív szervkárosodás jön létre (64).

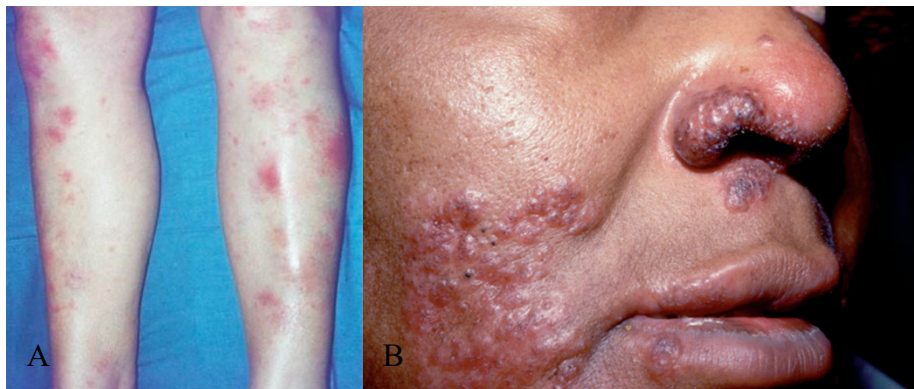
A szarkoidózis előfordulása földrajzi régiók és etnikai csoportok szerint jelentős variabilitást mutat (65). Európában a betegség prevalenciája hozzávetőlegesen 40-80/100 000 fő, ugyanakkor észak-európai populációkban lényegesen magasabb gyakoriságot írtak le (152-215/100 000 fő) (66). Nőkben és sötét bőrűekben gyakrabban előfordul (67). Az eltérő epidemiológiai mintázatok genetikai predispozíció és környezeti hatások együttes közreműködésére utalnak (68). A szarkoidózis leggyakrabban a tüdőt és a mellkasi nyirokcsomókat érinti (69). A pulmonális forma száraz köhögéssel, nehézlégzéssel és mellkasi diszkomforttal jár, a mellkasröntgen felvételen jellegzetes eltérésként jelentkezhet a bilaterális hiláris limfadenopátia (2.B ábra) (70).



2. ábra - A szarkoidózis jellegzetes szövettani és radiológiai megjelenése

A) *Epithelioid sejtes granulóma* **B)** *Bilaterális hiláris limfadenopátia* (71,72)

Extrapulmonalis érintettség kialakulhat a bőrben: erythema nodosum (3.A ábra), lupus pernio (3.B ábra), maculopapulosus léziók formájában; a szemben: uveitis, retina gyulladás formájában; a szívben: ingerületvezetési zavarok, aritmia formájában; a májban: májfunkciós zavarok, portális hipertenzió formájában; vagy az idegrendszerben is: meningitisz, arcidegbénulás, neuropátia, hipofízis elégtelenség formájában (2). A klinikai kép sokszínűsége miatt a betegség differenciáldiagnosztikai szempontból számos fertőzőes és gyulladásos kórképet utánozhat (73).



3. ábra - Jellegzetes bőrelváltozások szarkoidózisban.

A) *Erythema nodosum: a lábszár feszítő oldalán megjelenő fájdalmas csomók.* **B)** *Lupus pernio: Lilás elszíneződésű indurált csomók az arcon* (74–76).

A diagnózis felállítása komplex megközelítést igényel, amely a klinikai tünetek, radiológiai eltérések és szövettani leletek együttes értékelésén alapul (77). A definitív diagnózishoz rendszerint szükséges az el nem sajtosodó granulómák szövettani igazolása, különösen atípusos klinikai megjelenés vagy izolált pulmonális érintettség esetén (78,79). Mivel a biopszia a betegek számára megterhelő invazív beavatkozás (80), jelentős igény mutatkozik olyan laboratóriumi markerek iránt, amelyek támogatják a diagnosztikai döntéshozatalt és alkalmasak a betegség aktivitásának követésre.

3.4. Az ACE mint diagnosztikai biomarker

Az elmúlt évtizedekben számos biomarkerjelölt molekulát vizsgáltak különböző kutatócsoportok, azonban a nemzetközi szarkoidózis diagnosztikai irányelveket készítő World Association for Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) társaság napjainkig csak az angiotenzin-konvertáló enzim használatát támogatja a klinikai gyakorlatban is alkalmazható biológiai jelzőmolekulának (2,77). A granulómák epithelioid sejtjei ACE-t termelnek, amely bekerül a keringésbe. A szérum enzimaktivitásának emelkedése a granulomatömeg indirekt jelzőjének tekinthető. Ennek megfelelően az emelkedett ACE-aktivitás támogatja a diagnózist, míg az aktivitás csökkenése a kezelésre adott válasz és a betegség aktivitásának követésére használható fel (3,81–84).

Az ACE-aktivitás meghatározására több mérőmódszer áll rendelkezésre. A FAPGG (N-[3-(2-furil)akrilóil]-fenilalanil-glicil-glicin) kromogén szubsztrát hidrolízise során bekövetkező abszorbancia-változás spektrofotometriás módszerrel detektálható (85,86). Az esszé előnye az egyszerű kivitelezhetőség, azonban érzékenysége és specificitása korlátozott. Modernebb alternatívát jelent a - munkacsoportunk által is használt - fluoreszcens Abz-FRK(Dnp)P-OH szubsztrátot alkalmazó kinetikus esszé, amely nagyobb analitikai érzékenységet biztosít. A szubsztrát hidrolízise során a fluoreszcencia-jelintenzitás növekedése arányos az ACE-aktivitással.

A referencia-tartományok meghatározása során figyelembe kell venni az ACE gén inzerció/delécio polimorfizmusát. Így például munkacsoportunk felmérése alapján a - 35-szörös mintahígítás mellett megállapított - referencia-tartományok: 3,76-11,25 U/L (II), 5,22-11,59 U/L (ID) és 7,19-14,84 U/L (DD), míg genotípustól független tartományként a 4,85-13,79 U/L határozható meg (87).

Az ACE biomarker szerepe azonban más kórképek esetén is felmerült. Számos, a proximális tubuláris epithel károsodásával járó betegségben fokozott luminalis ACE

felszabadulást figyeltek meg (11,12). A tudomány mai állása szerint a vizelet ACE-aktivitás alkalmas biológiai jelzőmolekula lehet a vesét érintő egyes betegségekben.

Az ACE-aktivitás, mint biomarker klinikai alkalmazhatóságát ugyanakkor több tényező is korlátozza. A különböző mérési elvek eltérő analitikai érzékenysége, valamint a biológiai variabilitás mellett a mintamátrix összetétele és exogén vagy endogén interferáló anyagok jelenléte mind befolyásolhatja az eredmények értelmezhetőségét.

3.5. ACE-gátló gyógyszerek

Az ACE-gátlók a kardiovaszkuláris betegségek (hipertónia, krónikus szívelégtelenség, iszkémiás szívbetegség, stroke, stb.) kezelésének és a diabetes mellitushoz társuló renális szövődmények megelőzésének egyik alapvető gyógyszercsoportját képezik. Mind az Egyesült Államokban, mind Európában a leggyakrabban alkalmazott készítmények közé tartoznak (88–90). Hatásmechanizmusuk alapja, hogy a RAAS kulcsenzimének gátlásával csökkentik az Ang II képződését. Az Ang II-képződés csökkentésével mérséklődik a vazokonstrikció, az aldosteron-szekréció és a nátriumretenció, amely a vérnyomás csökkenéséhez vezet (91). A vérnyomáscsökkenés kardiovaszkuláris rizikócsökkentő hatása mellett a proliferatív és profibrotikus folyamatok mérséklődése is protektív hatást jelent a kezelt személyek esetében (92).

Az ACE-gátlók fejlesztése a teprotid nevű 9 aminosavból álló peptid felfedezéséhez vezethető vissza, amelyet a *Bothrops jararaca* vipera mérgéből izoláltak (93). Ennek mintájára fejlesztették ki az első szájon át adható hatóanyagot, a kaptopril (94). A későbbiekben több, kémiai szerkezetében eltérő gyógyszert törzskönyveztek, amelyek szulfhidril- (kaptopril, zofenopril), dikarboxilát- (lizinopril, ramipril, perindopril, enalapril) vagy foszfonátcsoportot (fozinopril) tartalmaznak. A legtöbb hatóanyag prodrug formájában kerül a szervezetbe, és metabolikus aktivációt követően fejt ki hatását (5). A gyógyszerek lipofilitása és szöveti affinitása eltérő, ami farmakodinámiás különbségeket eredményez (95,96).

Az ACE gátlása az Ang II képződésének csökkenésével párhuzamosan a bradikinin lebontását is mérsékli, ami predisponált egyénekben jellegzetes mellékhatások megjelenését eredményezheti. A bradikinin és egyéb gyulladásos mediátorok felhalmozódása tartós száraz köhögést és angioödémát válthat ki (97–99).

Bár nagyszámú klinikai vizsgálat igazolta az ACE-gátlók hatékonyságát különböző kardiovaszkuláris kórképek kezelésében és a kardiovaszkuláris események kockázatának

csökkentésében, a hosszú távú terápia eredményességét jelentősen befolyásolja a betegek adherenciája, amely a klinikai gyakorlatban továbbra is kihívást jelent (100,101).

Laboratóriumi diagnosztikai szempontból kiemelendő, hogy az ACE-gátlók szérumban ACE-aktivitást csökkentő hatásuk révén befolyásolják a diagnosztikai célból végzett ACE-aktivitás-mérés értelmezhetőségét (6,7). Mivel a szarkoidózis felismerése az utóbbi évtizedekben egyre inkább idősebb korosztályra tolódik, ahol a kardiovaszkuláris indikációból alkalmazott ACE-gátló kezelés gyakoribb (102), a gyógyszerhatás figyelembevétele elengedhetetlen a félrevezető laboratóriumi eredmények és hibás klinikai következtetések elkerüléséhez (7).

3.6. Endogén ACE-gátlás

Az enzimaktivitás alapú biomarkerek alkalmazhatóságának alapfeltétele, hogy a mért aktivitás az enzim tényleges katalitikus kapacitását tükrözze, a mintamátrix összetételéből eredő gátló hatások ne befolyásolják az eredményeket. Az ACE esetében azonban mind a szérumban, mind a vizeletben olyan endogén komponensek találhatók, amelyek az enzim aktivitását módosítják.

Szérumban az ACE aktivitását a humán szérumalbumin befolyásolja (8,9). A hatás koncentrációfüggő és hígítással fokozatosan megszűnik. Az albumin okozta reverzibilis gátlás 35-szörös hígítás mellett teljes mértékben kiküszöbölhető, ezért a mindennapi klinikai gyakorlatban ezen hígítás alkalmazása mellett javasolt a diagnosztikai célú ACE-aktivitás mérése (87).

A vizeletben jelen lévő, 10 kDa alatti molekulatömegű endogén inhibitorok létezését már az 1970-es évek végén leírták (10), azonban a kismolekulák azonosítására tett próbálkozások nem jártak sikerrel. Az eltávolításukra kidolgozott eljárások munka- és időigényesnek, valamint nehezen reprodukálhatónak bizonyultak, ami jelentősen korlátozta az enzimaktivitás alapú meghatározás klinikai alkalmazhatóságát (53,103).

4. CÉLKITŰZÉS

Az angiotenzin-konvertáló enzim központi szerepet tölt be a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer működésében, a szarkoidózis diagnosztikájában, valamint számos kórkép terápiájában. Az ACE-gátló gyógyszerek széles körű alkalmazása azonban jelentős interferencia forrása a szérum ACE-aktivitás-mérés során. Emellett a vizelet ACE-aktivitás-mérés klinikai hasznosítása - jóllehet ígéretes biomarkernek tűnik - endogén inhibitorok jelenlétéből fakadó interferencia miatt eddig technikai korlátokba ütközött. A zavaró hatások hátterének megértése, azonosítása és kiküszöbölése jelentős előrelépést jelenthetne a biomarkerek rutin diagnosztikában történő alkalmazhatóságában.

Kutatómunkám során ezért célul tűztem ki:

- A hagyományos, diagnosztikai célú szérum ACE-aktivitás-mérés vizsgálatát, hogy az alkalmas-e az ACE-gátló gyógyszerhatás felismerésére.
- A fluoreszcens kinetikus esszé módosítását, hogy az objektíven képes legyen kimutatni az ACE-gátló gyógyszerek hatását egyetlen szérummintából.
- Az ACE-gátló interferencia gyakoriságának meghatározását a szarkoidózis gyanúval vizsgált betegpopulációban.
- Egy megbízható és hatékony vizelet ACE-aktivitás-mérő módszer kidolgozását, amely kiküszöböli az endogén inhibitorok által okozott korábbi korlátokat.
- A vizeletben jelen lévő endogén inhibitorok azonosítását.
- A vizelet ACE-aktivitás-mérés preanalitikai és analitikai sajátosságainak vizsgálatát.
- A vizelet ACE-aktivitás-mérő módszer potenciális alkalmazhatóságának vizsgálatát diagnosztikai biomarkerként és az ACE-gátló terápia farmakológiai hatásának monitorozására.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Vizsgálati populációk

Kutatásainkba a Debreceni Egyetem Klinikai Központban kezelt személyek köréből, valamint tanszékünk munkatársai közül vontunk be egyéneket.

A gyógyszeres terápia labordiagnosztikát befolyásoló hatását a Klinikai Központban 2014. június 1. és 2021. december 31. között szarkoidózis kivizsgáláson és diagnosztikai célú szérums ACE-aktivitás-mérésen átesett, a kórházi informatikai rendszerben elérhető dokumentációval rendelkező 1823 beteg körében vizsgáltuk (1. táblázat).

	Vizsgálati csoport	Nők		Férfiak	
		Biokémiai ACE-gátló gyógyszerhatás		Biokémiai ACE-gátló gyógyszerhatás	
		Igen	Nem	Igen	Nem
n	1823	171	811	131	710
Életkor (évek)	46,6 (38,8 – 58,9)	60,0 (53,4 – 70,3)	46,8 (39,7 – 57,9)	55,4 ± 13,3	42,0 (35,9 – 52,1)
ACE-aktivitás (U/L)	10,39 (7,5 – 13,4)	4,36 (2,9 – 6,7)	10,89 (8,4 – 13,4)	4,56 (2,9 – 6,8)	11,77 (9,4 – 14,6)

1. táblázat - A diagnosztikai célú ACE-aktivitás-mérésen átesett egyének demográfiai adatai.

A vizelet enzimaktivitás-mérő módszer kifejlesztéséhez, optimalizálásához és az endogén vizelet ACE-inhibitorok azonosításához 5 munkatársunk szolgáltatott rendszeresen mintát. A vizelet enzimaktivitást vizsgáló, prospektív összehasonlító tanulmányunkban 33 ACE-gátlót szedő szív- és érrendszeri beteg alkotta a vizsgálati populációt, míg 20 ACE-gátlót nem szedő egyén a kontroll csoportot (2. táblázat).

	Kontroll csoport		Vizsgálati csoport	
	Nők	Férfiak	Nők	Férfiak
n	11	9	11	22
Életkor (évek)	49,42 ± 17,32	48,04 ± 18,42	67,60 ± 7,93	70,57 ± 10,39
BMI (kg/m ²)	25,64 (23,53 – 28,04)	28,15 ± 6,14	29,51 ± 5,61	29,80 ± 5,31
eGFR-EPI (mL/min/1,73m ²)	90,00 (85,00 – 90,00)	90,00 (86,50 – 90,00)	74,82 ± 19,70	81,00 (70,50 – 90,00)
Kardiovaszkuláris betegség (n, (%))	5 (45%)	4 (44%)	11 (100%)	21 (95%)
Magasvérnyomás (n, (%))	3 (27%)	2 (22%)	9 (82%)	19 (86%)
Diabetes mellitus (n, (%))	3 (27%)	1 (11%)	5 (45%)	12 (55%)
Veseelégtelenség (n, (%))	1 (9%)	0 (0%)	1 (9%)	0 (0%)
Dohányzás (n, (%))	3 (27%)	4 (44%)	3 (27%)	4 (18%)
perindopril	0 (0%)	0 (0%)	10 (91%)	17 (77%)
ACE-gátló típusa (n, (%)) ramipril	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (23%)
lizinopril	0 (0%)	0 (0%)	1 (9%)	0 (0%)

2. táblázat - A vizelet ACE-aktivitást vizsgáló prospektív tanulmányban részt vevők demográfiai adatai.

A részt vevő személyek járóbetegellátásuk során, vagy egyéni, kutatási célú konzultációjuk alkalmával tájékozott beleegyezésüket adták az orvosi vizsgálatához, a vér- vagy vizeletvételhez, valamint az ACE-aktivitás és vizelet kreatinin koncentráció meghatározásához.

A Debreceni Egyetemen használt orvosi (UDMed, ver. 5.46, University of Debrecen, Hungary) és laboratóriumi (GLIMS, ver. 8.11, CliniSys, Belgium) informatikai rendszerekben rögzített és tárolt adatok retrospektív módon kerültek feldolgozásra.

5.2. Biológiai minták gyűjtése, kezelése

A vérminták gyűjtését a járóbetegellátások alkalmával standard aszeptikus technikával végeztük. A natív vérminták koagulációját követően, 4 °C hőmérsékleten, 15 perces, 2000 g erősségű centrifugálással választottuk el a szérumot a sejtes elemektől. Az így nyert szérummintákat -20 °C-on tároltuk az ACE-aktivitás és ACE-gátlás mértékének meghatározásáig.

A reggeli első középsugar vizeletmintákat, valamint a nappali híg vizeletmintákat a vizsgálatok napján, standard vizeletmintavételi eljárások alkalmazásával gyűjtöttük. A mintákat 25 °C hőmérsékleten szállítottuk és centrifugáltuk (10 perc, 400 g). Valamennyi mérést üledékmentes, friss vizeletmintából végeztünk.

5.3. Szérum ACE-aktivitás meghatározás

A szérumminták ACE aktivitásának meghatározására kutatócsoportunk korábban kidolgozott fluoreszcens kinetikus módszerét használtuk (87). A módszer a szintetikusan előállított Abz-FRK-(Dnp)-P-OH szubsztrát (Peptid 2.0, Chantilly, USA) alkalmazásán alapul, amelyet a szérum ACE szelektíven képes hasítani. Az ACE hasításának hatására a quenched szubsztrát donor (Abz) és akceptor (Dnp) molekulái közötti energiaátadás megszűnik, a donor molekula gerjeszthetővé válik, relaxációja során fluoreszcens fényt emittál. A kibocsátott fluoreszcens fény intenzitás növekedése arányos a szérum ACE aktivitásával.

Az alkalmazott reakcióelegy a megfelelő mennyiségű szérumminta mellett 15 μ M Abz-FRK(Dnp)P-OH szubsztrátot, 50 mM NaCl-ot és 10 μ M ZnCl₂-ot tartalmazott 100 mM TRIS-HCl (pH 7,0) pufferben. A meghatározáshoz 96 lyukú fekete plate-et (kat. szám: 655-900, Greiner-Bio One International GmbH, Kremsmünster, Ausztria) használtunk. A fluoreszcencia jelintenzitás változását 1 perces mérési időközökkel 90 percig detektáltuk 37 °C-on ClarioStar plate reader készülékkel (BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Németország). A gerjesztési hullámhossz λ = 340 nm, az emissziós hullámhossz λ = 405 nm volt. A fluoreszcencia

jelintenzitás értékeket a 0 időpontban mért (minta színéből adódó, kiindulási) fluoreszcens jelintenzitásra és a mintát nem tartalmazó reagens vakra történő korrigálást követően az idő függvényében ábrázoltuk. A pontokra egyenest illesztettünk. Az ACE-aktivitás U/L-ben kifejezett értékét az alábbi összefüggés alapján számoltuk:

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

ahol az S az illesztett egyenes meredeksége, k az 1 µM szubsztrát standard körülmények közötti, 1 perc alatti teljes hidrolíziséből származó fluoreszcencia jelintenzitás növekedés mértéke és D a szérumminta hígításának mértéke.

5.4. A szérum ACE-gátlás mértékének meghatározása

Az ACE-gátlás mértékének meghatározása érdekében, az ACE-aktivitást a diagnosztikai célú mérések során alkalmazott 35-szörös szérumhígítás (87) mellett további hígításokon is megmértük. A vizsgált, ACE-gátlót nem tartalmazó és ACE-gátlót tartalmazó szérummintákból felező sorozathígításokat készítettünk.

A megfelelően pufferelt reakcióközeg biztosítása miatt a legkisebb alkalmazható hígítás 4-szeresnek adódott. Az ezen a hígításon mért legalacsonyabb ACE-aktivitás reprezentálta az in vitro meghatározható maximálisan gátolt állapotot.

A 400-szoros hígításnál nagyobb hígítások esetében a jel-zaj arány jelentős romlását tapasztaltuk, amely nagyfokú mérési bizonytalanságot eredményezett. A kísérletsorozat tapasztalatai alapján ezért a 4-szeres és 400-szoros hígításokat választottuk az esszéhez. A gátlás mértékét az alábbi képlet alapján definiáltuk:

$$ACE - \text{gátlás (\%)} = 100 - \left(100 \times \frac{ACE\text{-aktivitás}_{4\text{-szeres hígítás}}}{ACE\text{-aktivitás}_{400\text{-szoros hígítás}}} \right)$$

Az ACE-gátló gyógyszer jelenlétét igazoló gátlási határérték meghatározása céljából megvizsgáltuk a lokális populációban mérhető endogén ACE-gátlás eloszlását.

5.5. Vizelet ACE-aktivitás meghatározás

A vizelet ACE-aktivitást az Abz-FRK-(Dnp)-P-OH szubsztrátot (Peptid 2.0, Chantilly, USA) alkalmazó fluoreszcens kinetikus esszé (87) módosított, optimalizált protokollja szerint határoztuk meg. Minden kísérletben az adott mérésnek megfelelő mintahígításokat alkalmaztunk.

A végleges vizelet ACE-aktivitás-mérő esszé protokoll reakcióelegye 100 mM tris(hidroximetil)-aminometán-hidroklorid (TRIS) puffert (pH: 7,0), 15 µM szubsztrátot,

50 mM NaCl-t, 10 μ M ZnCl₂-t, valamint 64-szeres és 128-szoros hígítású vizeletmintát tartalmazott. Minden reakcióelegyhez egy 1 μ M lizinoprilt tartalmazó kontrollt (kat. szám: L6292-100 mg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) is alkalmaztunk. A fluoreszcens jelintenzitás változást 1 perces mérési időközönként, 90 percen keresztül rögzítettük, 37 °C-on, ClarioStar plate readerrel (BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Németország). Az adatelemzéshez a 20 és 80 perc közötti időtartam adatpontjait használtuk. Amennyiben a 64-szeres hígítás mellett mért aktivitás meghaladta a 128-szoros hígításnál mért értéket, a 64-szeres hígítás eredményeit vettük figyelembe a híg vizeletminták túlzott hígulásából eredő torzítás elkerülése érdekében.

A membránszűrési kísérletek során az endogén inhibitorokat Vivaspin 20 membránszűrő oszlopok alkalmazásával (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Németország) választottuk el a vizelet ACE-től. A natív vizeletmintákat (6 mL) desztillált vízzel 20 mL végső térfogatra hígítottuk. Az oszlopokat 4000 g relatív centrifugális erővel, 45 percen keresztül centrifugáltuk 25 °C-on. Ezt követően minden oszlopot kétszer mostunk 20 mL desztillált vízzel, azonos centrifugálási körülmények alkalmazásával. Az összegyűjtött 60 mL filtrátumot vákumcentrifugálással töményítettük vissza az eredeti 6 mL térfogatra. A retentátumot a membránról 6 mL 100 mM-os TRIS pufferben (pH: 7,0) nyertük vissza. Az összehasonlító mérések során mind a natív vizeletmintákat, mind a membrán tisztított ACE mintákat 4-szeres hígítás mellett vizsgáltuk.

Az endogén gátló ágensek azonosítását célzó kísérletekhez a potenciális inhibitorokat a gyártói előírásoknak megfelelően oldottuk fel (urea: kat. szám: U6504-1KG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; húgysav: kat. szám: U2625-25G, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; urobilinogén: kat. szám: 651-10, Lee Biosolutions, Maryland Heights, MO, USA).

5.6. A vizelet ACE-aktivitás-mérő esszé specificitásának meghatározása

A vizelet ACE-aktivitás-mérés specificitását ACE specifikus inhibitorokkal (lizinopril: kat. szám: L6292-100 mg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; kaptopril: kat. szám: C4042, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), valamint más proteázokra ható inhibitorokkal vizsgáltuk (amastatin-hidroklorid: kat. szám: SC-202051, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA; apstatin: kat. szám: BML-PI145-0001, Enzo Biochem Inc., Farmingdale, NY, USA; bestatin-hidroklorid: kat. szám: B8385, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; MLN-4760: kat. szám: 5.30616, Merck KGaA, Darmstadt, Németország; foszforamidon: kat. szám: R7385, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; szakubitrilát: kat. szám: HY-17620, MedChemExpress,

Monmouth Junction, NJ, USA; Z-prolil-prolinal: kat. szám: BML-PI112, Enzo Biochem Inc., Farmingdale, NY, USA).

5.7. Vizelet ACE-aktivitás-mérés immunodepléciót követően

Az immunodepléciós kísérletek során először 10 kDa pórusméretű membránszűrő oszlopok alkalmazásával eltávolítottuk az endogén inhibitorokat. A gátló ágens mentes retentátumot ezt követően ACE-specifikus ellenanyaggal (120 ng/mL végső koncentráció, kat. szám: 841365, a DY929 kit komponense, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), majd Protein G Sepharose 4 Fast Flow gyantával (10% végső gyöngytérfogat, kat. szám: 17-0618-001, Merck KGaA, Darmstadt, Németország) inkubáltuk. Az ellenanyaggal történő inkubáció 16 órán keresztül, szobahőmérsékleten zajlott, míg a gyantával történő inkubáció 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten, folyamatos rázatás mellett. Az ACE-depletált és kontroll vizeletminták aktivitását ezt követően 4-szeres hígítás mellett határoztuk meg.

5.8. A biológiai minták stabilitásának vizsgálata

A szérum ACE-aktivitás stabilitását az alkalmazott -20 °C-os tárolási körülmények között 123 mintán teszteltük, az első méréshez képest átlagosan 6 év 4 hónap elteltével (min: 5 év 1 hónap, max: 7 év 3 hónap).

A vizelet ACE-aktivitás stabilitását három független mérés alkalmával, három tárolási hőmérsékleten, 25 °C-on, 4 °C-on és -20 °C-on vizsgáltuk.

5.9. A vizelet kreatinin koncentrációjának meghatározása

A vizeletminták kreatinin koncentrációját Cobas Integra 400 plus klinikai kémiai automatán (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország), CREJ2 Creatinine Jaffé Gen.2 kazetták alkalmazásával (Ref.: 04810716190, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) határoztuk meg.

5.10. Etikai engedély

A vizsgálatokat és a klinikai adatok feldolgozását a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága (DE KK RKEB/IKEB: 5925-2021), valamint az Emberi Erőforrások Minisztériuma (15471-6/2023/EÜIG) jóváhagyta. A kutatások a Helsinki Nyilatkozat alapelveivel összhangban zajlottak.

5.11. Statisztikai elemzés

A statisztikai analízist a GraphPad Prism 9.0 szoftverrel (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) végeztük a következő próbák alkalmazásával: D'Agostino-Pearson próba (normalitás vizsgálatok), páros t-teszt (8.A,B), Mann-Whitney U-teszt (5.B, 15.), egyutas ANOVA Holm-Sidak féle összehasonlító teszttel (9.A,B,C, 10.A,B,C, 11.A-I, 13.A,B,C), Kruskal-Wallis teszt Dunn féle többszörös összehasonlító teszttel (12.A,B,C), Spearman korreláció analízis (14.B). A normál eloszlást mutató értékeket átlag ($\pm$ standard deviáció) formában, míg a nem normál eloszlást mutató értékeket medián (interkvartilis tartomány) formában tüntettük fel. Statisztikailag szignifikáns különbségnek a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

6. EREDMÉNYEK

6.1. A gyógyszeres terápia labordiagnosztikát befolyásoló hatása

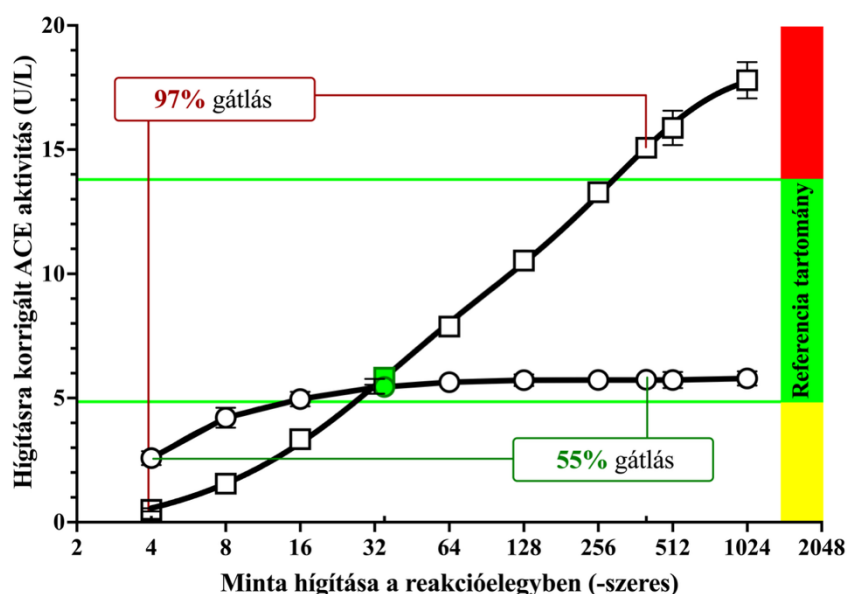
6.1.1. Az ACE-gátló interferencia objektív kimutatásának hígítás alapú módszertani megközelítése

A módszer alapját képezi, hogy a szérum ACE-aktivitás mért értékét szignifikánsan befolyásolja a mérés során alkalmazott mintahígítás mértéke, valamint bármilyen ACE-gátló gyógyszer jelenléte a vizsgált mintában (4. ábra).

A humán szérumalbumin reverzibilisen blokkolja az ACE működését, amely gátlás a mérés során a minta legalább 35-szörös hígításával megszüntethető (87). Harmincötszörösnél kisebb hígítási fok alkalmazása esetén, az albumin közvetítette fiziológiás gátlás következtében az ACE-aktivitás alulbecsült, míg a 35-szörös hígítást meghaladó tartományban a hígításra korrigált ACE-aktivitás állandóvá válik és megbízhatóan mérhető (körök, 4. ábra).

ACE-gátló gyógyszert tartalmazó szérumminták esetén az ACE-aktivitás további növekedése figyelhető meg a 35-szöröst meghaladó hígításokon (négyzetek, 4. ábra). A 35-szörös hígítás mellett mért ACE-aktivitás értékek gyakran nem tesznek különbséget ACE-gátlót szedő és nem szedő betegek között (zölddel kiemelt jelölések, 4. ábra), kiváltképp akkor, ha a mért értékek a referencia-tartományon belül helyezkednek el. A párhuzamosan 4-szeres és 400-szoros szérumhígítás mellett mért ACE-aktivitás értékekből (gátolt, illetve közel teljesen gátolatlan aktivitás) az ACE-gátlás mértéke pontosan meghatározható. Az arány információt szolgáltat az albumin közvetítette endogén inhibíció mértékéről ACE-gátlót nem szedő betegek esetében (a gátlás mértéke = 55 %, 4. ábra), valamint az ACE-gátló gyógyszerek hatásáról a kezelésben részesülő páciensek esetében (a gátlás mértéke = 97 %, 4. ábra).

Az ACE-gátló gyógyszer jelenlétét a szérummintában (a lokális populációban tapasztalt maximális endogén ACE-gátlás ~78 % mértéke alapján) az ACE gátlás 80%-ot elérő vagy meghaladó szintje jelzi (104).



4. ábra - Az ACE-gátló gyógyszerek hatása a szérumminta hígításával reverzibilisen csökkenthető.

Az ábrán egy ACE-gátlót szedő (négyzet) és egy ACE-gátlót nem szedő (kör) beteg szérumában megfigyelhető, hígításra korrigált ACE-aktivitás változásokat ábrázoltuk különböző szérumhígítások mellett. A laboratóriumi leleten feltüntetett, 35-szörös hígításon mért ACE-aktivitás értékekhez tartozó pontokat zöld színnel jelöltük. Minden pont három független mérés átlagát és szórását jelöli. Az ábrán feltüntettük a szérum ACE-aktivitás referencia-tartományát (35-szörös mintahígítás mellett mérve), valamint a két minta esetében megfigyelt ACE-gátlás mértékét is.

6.1.2. ACE-gátlót szedők aránya a diagnosztikai célú ACE-aktivitás-mérésen átesők körében

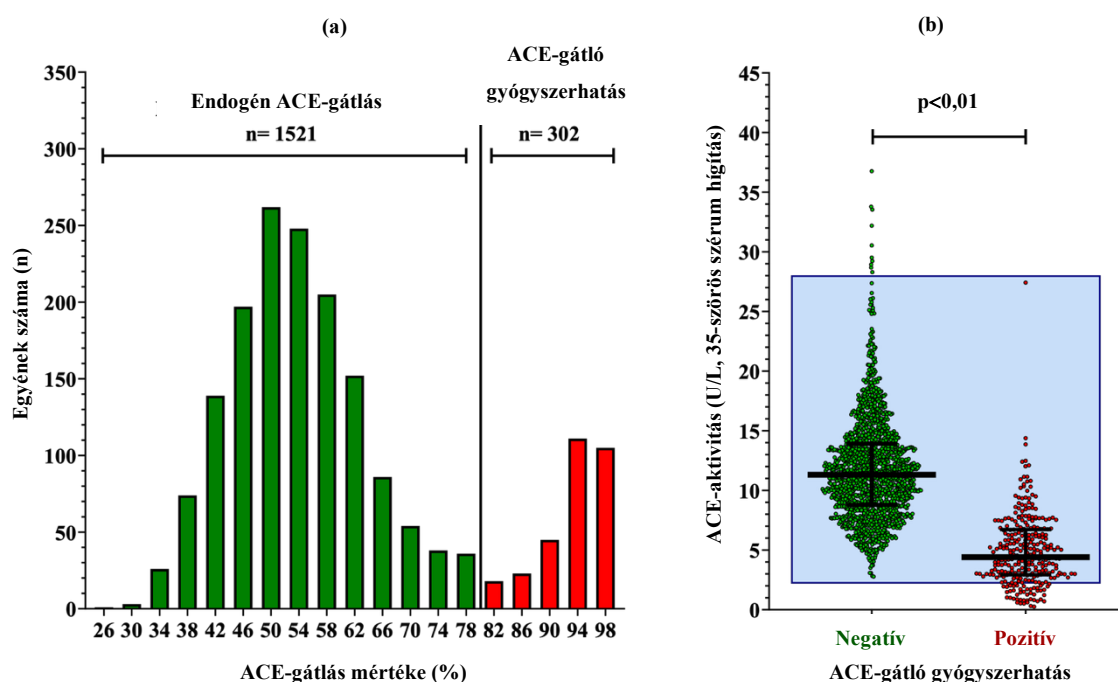
A szérum ACE-aktivitás három hígításon való meghatározásával szeretnénk volna igazolni, hogy az 1823 szarkoidózis gyanújával kivizsgált egyén a vérvétel időpontjában nem állt ACE-gátló kezelés alatt. Feltételeztük, hogy a klinikusok a mintavétel során kellő körültekintéssel jártak el, és a betegeket átállították angiotenzin II receptor blokkoló terápiára, vagy ideiglenesen felfüggesztették az ACE-gátló kezelésüket, mivel a vizsgálat célja a szarkoidózis gyanújának alátámasztása emelkedett szérum ACE-aktivitás kimutatásával.

A várakozásainkkal ellentétben azonban, minden hatodik vizsgálatba bevont beteg esetében (1823 páciens közül 302 esetében) biokémiai evidenciát találtunk ACE-gátló gyógyszerhatás jelenlétére a diagnosztikus ACE-aktivitás meghatározás időpontjában (5.A ábra - piros oszlopok).

6.1.3. Az ACE-gátló gyógyszerek hatása a szérum ACE-aktivitásra

Az ACE-gátló gyógyszerhatás szignifikánsan növelte az ACE-gátlás mértékét (94,9 % [91,6-96,7 %]) az endogén, albumin közvetítette ACE-gátláshoz képest (52,9 % [46,9-59,85 %]). Ennek következtében, a diagnosztikus, 35-szörös hígításon mért szérum ACE-aktivitás szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott a biokémiai ACE-gátló gyógyszerhatást mutató csoportban az ACE-gátló gyógyszerhatást nem mutató betegek körében mérthez képest (4,41 U/L [2,93-6,72 U/L] vs. 11,32 U/L [8,79-13,92 U/L]; $p<0,01$) (5.B ábra).

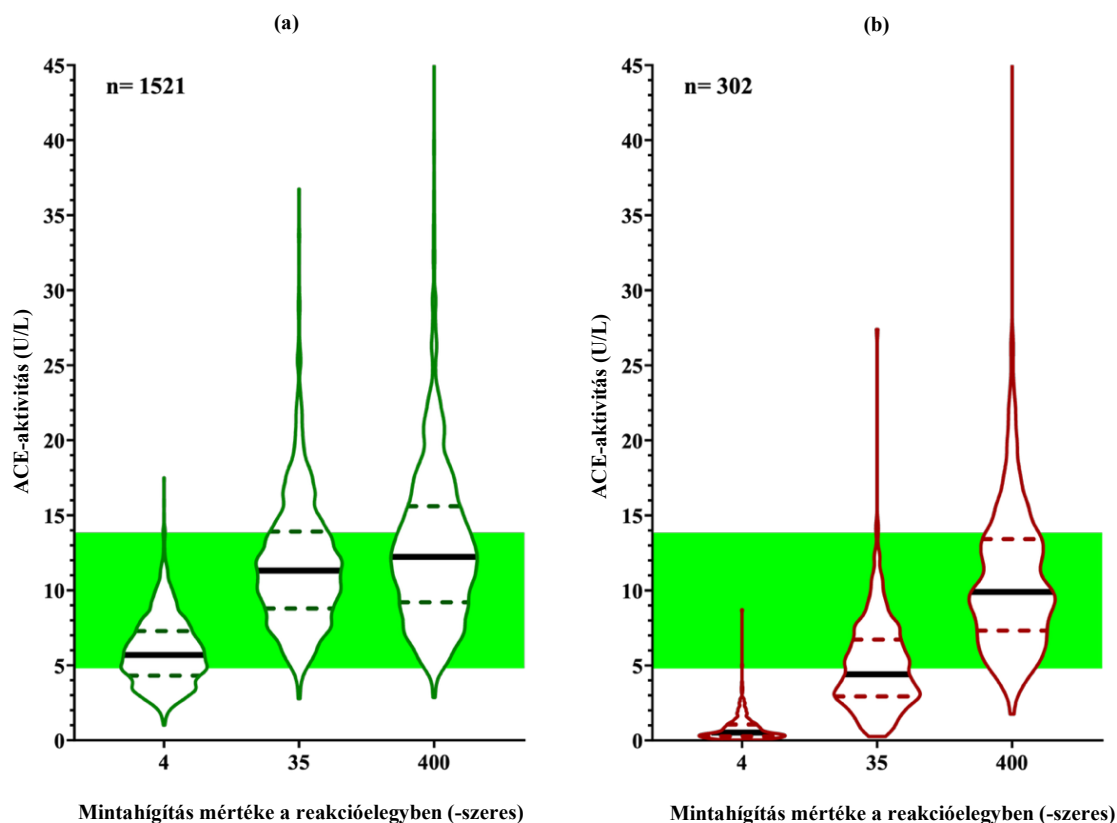
Egyértelműen kitűnt azonban, hogy egyetlen ACE-aktivitás érték alapján nem lehetett volna következtetni az ACE-gátló gyógyszer jelenlétére, mivel a biokémiai ACE-gátló gyógyszerhatást mutató betegek 77,5%-ának ($n=234$) ACE-aktivitás értékei átfedést mutattak (2,78-27,42 U/L) az ACE-gátló hatást nem mutató betegek értékeivel (5.B ábra - kék téglalap).



5. ábra - Az ACE-gátlás és az ACE-aktivitás megoszlása a vizsgált populációban

Az ACE-gátlás mértékének megoszlását ábrázoló hisztogram mutatja, hogy a mintavétel időpontjában minden hatodik beteg ACE-gátló gyógyszerhatás alatt állt (a), amely alacsony ACE-aktivitást eredményezett (b). A zöld oszlopok a természetes, endogén ACE-gátlással rendelkező betegek megoszlását, míg a piros oszlopok az ACE-gátló gyógyszerhatás következtében fokozott ACE-gátlást mutató betegek megoszlását szemléltetik (a). A (b) panelen minden egyes pont egy beteg ACE-aktivitás értékét, a kék színnel kiemelt terület pedig az átfedő aktivitástartományt jelöli. Az ACE-gátló gyógyszerhatást mutató és nem mutató betegek ACE aktivitásának mediánja és interkvartilis tartománya szintén feltüntetésre került az ábrán.

A reakcióelegyben alkalmazott szérumszűrés mértéke jelentős hatással van a mért ACE-aktivitásra. Ezen összefüggés az általunk vizsgált populációban is jól megfigyelhető volt (6. ábra). A 4-szeres szérumszűréshez viszonyítva, a 35-szörös szűrés mellett mért, szűrésre korrigált ACE-aktivitás szignifikánsan magasabbnak adódott az ACE-gátló gyógyszerhatást nem mutató csoportban (+99%; 5,68 U/L [4,31-7,29 U/L] vs. 11,32 U/L [8,79-13,92 U/L]), az albumin reverzibilis endogén gátló hatásának megszűnése következtében (6.A ábra). Míg a 400-szoros, további mintaszűrés elhanyagolható hatással bírt az ACE aktivitásra (+8%; 12,23 U/L [9,20-15,60 U/L]). Ezzel szemben, a biokémiai ACE-gátló gyógyszerhatást mutató minták esetében, a 400-szoros szűrés további, még jelentősebb ACE-aktivitás növekedést eredményezett (+125%). A 400-szoros szűrés mellett mért aktivitás - figyelembe véve az ACE-gátló gyógyszerhatást mutató egyének szérumában megfigyelhető, szűrésre korrigált ACE-aktivitás változásokat (4. ábra) - feltételezhetően megközelítette azt az értéket, amely ACE-gátló kezelés hiányában lett volna mérhető az adott betegeknél (6.B ábra).



6. ábra - Különböző hígításokon mért ACE-aktivitás biokémiailag igazolt gyógyszerhatást nem mutató és mutató betegek körében

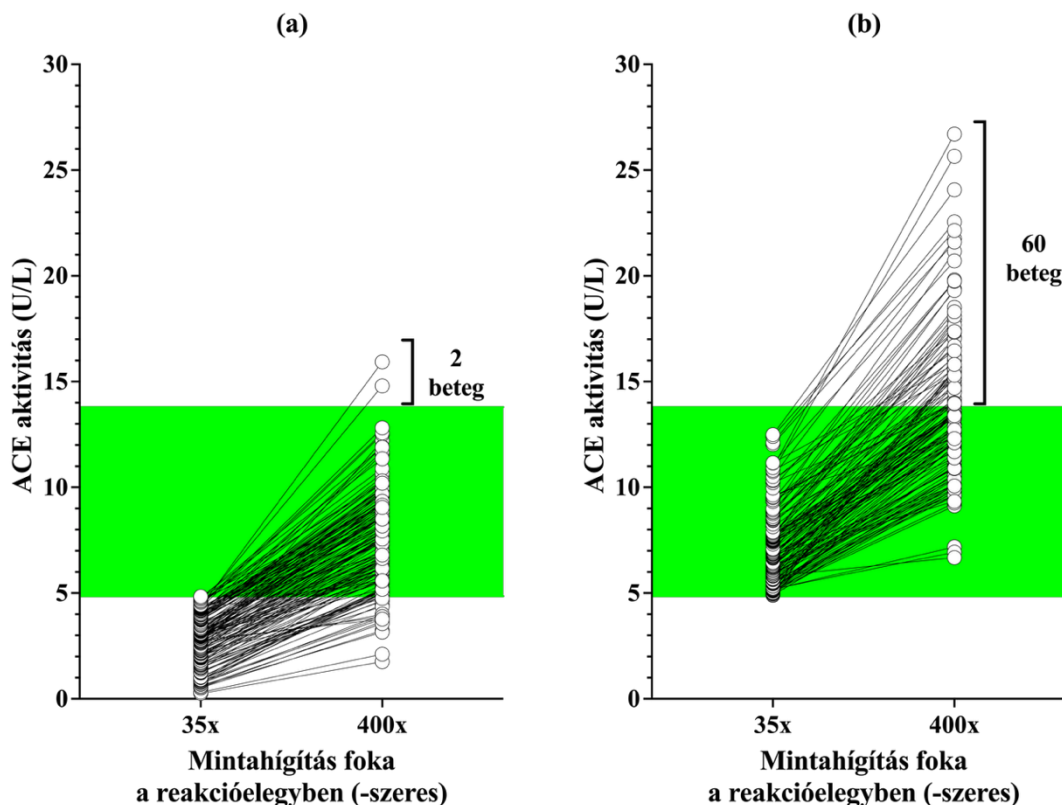
A violin plotok a klinikailag releváns hígítási értékeken (4-szeres, 35-szörös és 400-szoros hígítás) mért ACE-aktivitások megoszlását mutatják be biokémiailag igazolt ACE-gátló gyógyszerhatást nem mutató (a), és ACE-gátló gyógyszerhatást mutató betegek esetében (b). A fekete, folytonos vonalak az egyes csoportok mediánértékeit, míg a zöld szaggatott vonalak az interkvartilis tartományokat jelölik. A világos zölddel kiemelt terület a 35-szörös hígítás mellett mért ACE-aktivitás referencia-tartományát jelzi.

6.1.4. ACE-gátló terápia miatti fals negatív vizsgálati eredmények gyakorisága

Az ACE-aktivitás meghatározása akkor segíti a szarkoidózis diagnózisát, ha - a 35-szörös diagnosztikai hígításon végzett mérés során - a mért érték meghaladja a normál populációra vonatkozó referencia-tartományt. Megvizsgáltuk, hogy a populációnkban hány esetben fedte el ACE-gátló gyógyszerhasználat az emelkedett ACE-aktivitást. A meghatározáshoz a 400-szoros hígítás mellett mért ACE-aktivitás értékeket használtuk.

Azon 161 beteg közül, akiknél az ACE-aktivitás a diagnosztikus 35-szörös hígításon mérve a referencia-tartomány alá esett, kettő esetében kaptunk volna a referencia-tartomány fölötti értéket (7.A ábra). Míg azon 138 beteg közül, akiknél az ACE-aktivitás ezen a hígításon

mérve a normál tartományba esett, az eredmény 60 fő esetében haladta volna meg a referencia-tartomány felső határát (7.B ábra). Összességében, az ACE-aktivitás mérés legalább 62 további egyén esetében támogathatta volna a szarkoidózis diagnózisát, ha a betegek a mintavétel időpontjában nem álltak volna biokémiai ACE-gátló gyógyszerhatás alatt.



7. ábra - A biokémiailag igazolt ACE-gátló gyógyszerhatás szarkoidózis diagnosztikát befolyásoló hatása

Legalább 62 beteg esetében a szérum ACE-aktivitás a referencia-tartomány fölé emelkedett volna ACE-gátló gyógyszerhatás hiányában. Az egyes pontpárok egy-egy beteg ACE-aktivitás értékeit ábrázolják 35-szörös és 400-szoros hígításon mérve, azon betegek esetében, akiknél a 35-szörös hígításon mért ACE-aktivitás a referencia-tartomány alattiak mutatkozott (a), illetve azon betegek esetében, akiknél a 35-szörös hígításon mért érték a referencia-tartományon belül esett (b).

6.1.5. A betegdokumentáció átvizsgálásának tanulságai

A 302 biokémiailag igazolt ACE-gátló gyógyszerhatást mutató beteg kórlapjának részletes áttekintését követően megállapítottuk, hogy az életkoruk szignifikánsan magasabb az ACE-gátló gyógyszerhatást nem mutató betegekéhez képest, mind a nők ($60,5 \pm 11,7$ év vs. $48,2 \pm 14,0$ év; $p < 0,01$), mind a férfiak esetében ($55,4 \pm 13,3$ év vs. $44,3 \pm 15,1$ év; $p < 0,01$; 3. táblázat). Továbbá, a 302-ből mindössze 121 esetben került rögzítésre a betegek gyógyszeres kezelése a dokumentációban (minden esetben tartalmazva valamilyen ACE-gátló hatóanyagot), amely lehetővé tette volna az ellátó személyzet számára az ACE-gátló terápia felismerését. Habár a várakozásoknál alacsonyabb ACE-aktivitás eredmény tényét 50 esetben rögzítették, a háttérben álló ACE-gátló kezelést mindössze 3 esetben ismerték fel (3. táblázat).

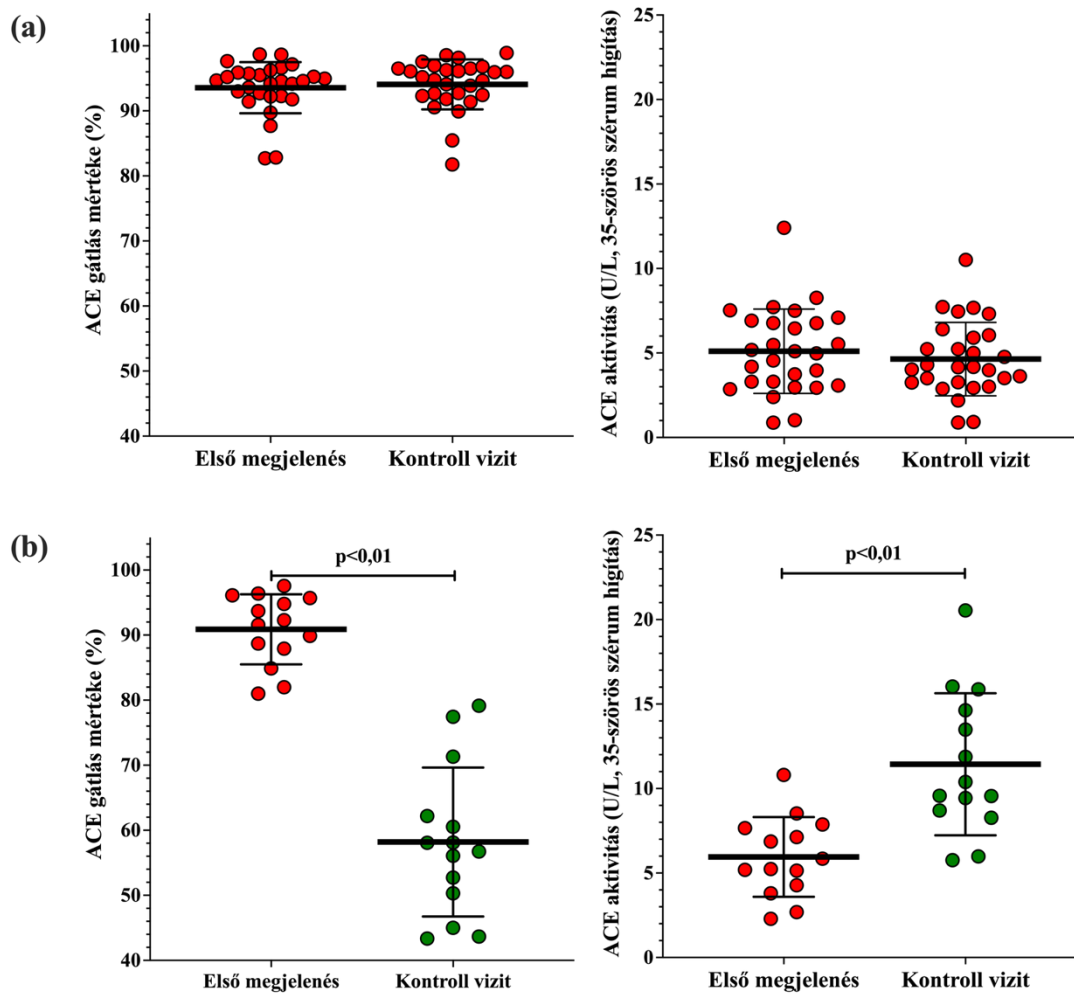
	Vizsgálati csoport	Nők		Férfiak	
		Biokémiai ACE-gátló gyógyszerhatás		Biokémiai ACE-gátló gyógyszerhatás	
		Igen	Nem	Igen	Nem
n	1823	171	811	131	710
Életkor (évek)	46,6 (38,8 – 58,9)	60,0 (53,4 – 70,3)	46,8 (39,7 – 57,9)	55,4 $\pm$ 13,3	42,0 (35,9 – 52,1)
ACE-aktivitás (U/L)	10,39 (7,5 – 13,4)	4,36 (2,9 – 6,7)	10,89 (8,4 – 13,4)	4,56 (2,9 – 6,8)	11,77 (9,4 – 14,6)
ACE-gátlás (%)	55,1 (47,1 – 66,7)	95,0 (91,8 – 96,7)	51,6 $\pm$ 10,6	94,8 (90,6 – 96,7)	53,9 $\pm$ 10,9

Feltüntetésre került a gyógyszer a betegdokumentációban?	Igen: 121	Nem: 181
ACE-gátló típusa (n, (%))	perindopril: 92 (76%)	
	ramipril: 16 (13%)	
	enalapril: 10 (8%)	
	lizinopril: 3 (3%)	
Az eredmény interpretálásra került a leleten?	Igen: 50	Nem: 252
Felismerésre került az ACE-gátló gyógyszer hatása?	Igen: 3	Nem: 299
Végeztek kontroll ACE-aktivitás mérést?	Igen: 43	Nem: 259
Volt kimutatható ACE-gátló hatás a kontroll mérés során?	Igen: 29	Nem: 14

3. táblázat - A betegdokumentáció áttekintésének eredményei

Azonosítottuk azon betegeket, akiknél az első mintavétel ACE-gátló kezelés alatt történt, majd a kezelőorvosuk ismételt ACE-aktivitás meghatározást kért (3. táblázat). A 43 beteg közül 29 esetében az ismételt mérésekre is ACE-gátló kezelés mellett került sor. Körükben az ACE-gátlás mértéke 80% felett maradt ($94,1 \pm 3,8\%$ vs. első megjelenéskor: $93,4 \pm 3,9\%$; $p > 0,05$), és az ACE-aktivitás nem változott érdemben a követés során ($4,62 \pm 2,1$ U/L vs. $5,16 \pm 2,5$ U/L; $p > 0,05$; 8.A ábra).

Ezzel szemben, 14 beteg esetében nem találtunk biokémiai bizonyítékot ACE-gátló hatás fennállására a kontrollvizsgálatok során (ACE-gátlás mértéke: $90,1 \pm 5,4\%$ vs. $58,2 \pm 11,5\%$ a második megjelenéskor; $p < 0,01$). Körükben a szérum ACE-aktivitás jelentős emelkedése volt megfigyelhető ($6,0 \pm 2,4$ U/L vs. $11,4 \pm 4,2$ U/L a második megjelenéskor; $p < 0,01$; 8.B ábra).



8. ábra - Megismételt aktivitás-mérések eredményei

Egyes betegek esetében az ACE-aktivitás meghatározás megismétlésre került. Azon betegeknél, akiknél az ACE-gátló terápia nem került felfüggesztésre, az ismételt ACE-aktivitás meghatározás során továbbra is magas ACE-gátlás ((a) panel bal oldala) és alacsony ACE-aktivitás ((a) panel jobb oldala) volt kimutatható. Az ACE-gátló kezelés megszakítása az ACE-gátlás mértékének szignifikáns csökkenéséhez ((b) panel bal oldala), valamint az ACE-aktivitás emelkedéséhez vezetett ((b) panel jobb oldala). A pontok az egyes betegek ACE-aktivitás értékeit jelölik. Az egyes csoportok átlagértékei és szórásai is feltüntetésre kerültek.

6.2. Enzimaktivitás-mérés vizeletben

6.2.1. A vizelet endogén ACE-gátlók molekulatömegének meghatározása

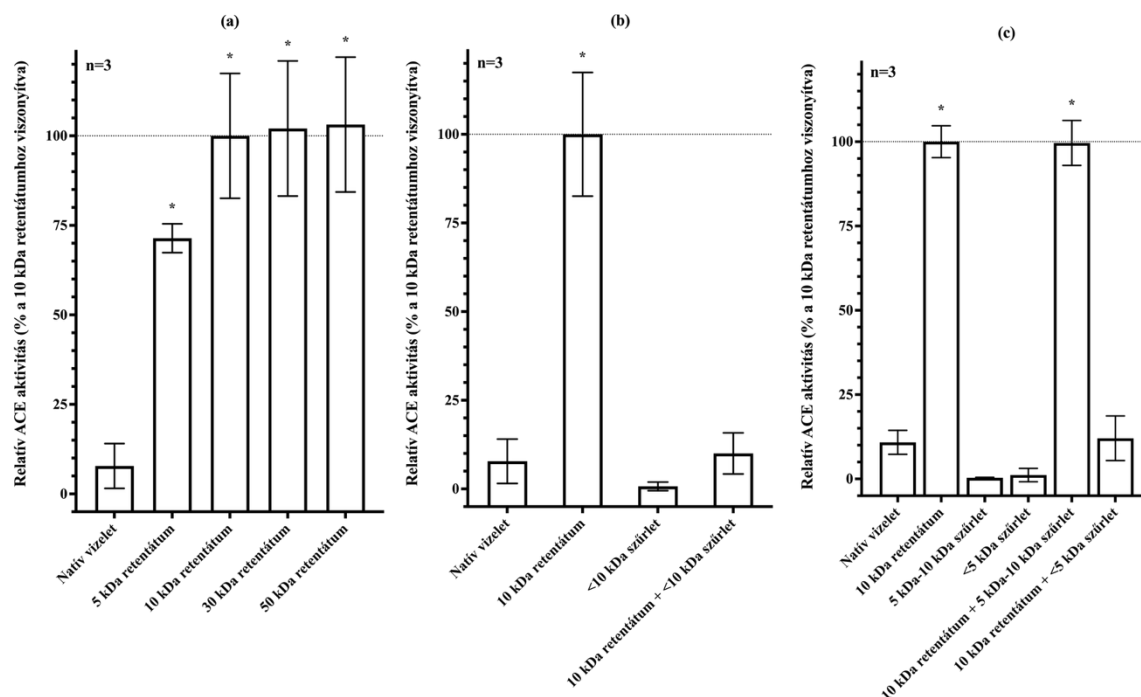
A vizeletmintákat 5, 10, 30 és 50 kDa pórusméretű membránszűrő oszlopok alkalmazásával filtráltuk, majd az endogén ACE-gátlók molekulatömegének becslése céljából meghatároztuk az egyes retentátumok ACE aktivitását.

A natív, nem szűrt vizeletben >92%-kal nagyobb ACE-gátlást figyeltünk meg a 10 kDa pórusméretű szűrőn visszamaradó frakcióhoz képest (ACE-aktivitás: $7,79 \pm 6,27\%$ vs. $100 \pm 17,43\%$; $p < 0,005$). Az 5 kDa pórusméretű membránszűrő alkalmazása jelentős, de nem teljes mértékű ACE-aktivitás növekedést eredményezett ($71,40 \pm 4,03\%$). Az endogén ACE-gátlók teljes elkülönítését a 10 kDa-os oszlop alkalmazásával tudtuk elérni, a 30 és 50 kDa-os szűrők használata mellett további ACE-aktivitás növekedés nem volt megfigyelhető ($100,00 \pm 17,43\%$, $102,10 \pm 18,87\%$ és $103,10 \pm 18,85\%$; 9.A ábra).

Az endogén vizelet ACE-gátlók sikeres eltávolítását a filtrátumok visszaadásával ellenőriztük (9.B ábra). Tíz kilodalton pórusméretű membránszűrő alkalmazása mellett a vizelet ACE-aktivitás a retentátumban több mint tízszeresére nőtt, míg a filtrátumban számottevő aktivitás nem volt kimutatható. A <10 kDa-os filtrátum visszakeverése a 10 kDa-os retentátumhoz az ACE-aktivitás jelentős csökkenéséhez vezetett, az eredmény megközelítette a natív vizeletben mért aktivitást ($10,00 \pm 5,80\%$ vs. $7,79 \pm 6,27\%$).

A kísérleti eredmények azt sugallták, hogy az endogén inhibitorok a <5 kDa, illetve az 5-10 kDa közötti molekulatömeg tartományokban lehetnek jelen. Az 5-10 kDa közötti tartományban esetlegesen előforduló vizelet ACE-gátlót szekvenciális membránszűréssel, a <10 kDa-os vizeletfrakció <5 kDa-os és 5-10 kDa-os alfrakciókra bontásával vizsgáltuk. A natív vizeletet először egy 10 kDa-os membránszűrőn filtráltuk, majd az így kapott <10 kDa-os filtrátumot egy 5 kDa-os membránszűrő oszlop alkalmazásával tovább frakcionáltuk. A folyamat eredményeként három komponens keletkezett: a vizelet ACE-t tartalmazó 10 kDa-os retentátum, az 5-10 kDa-os vizelet alfrakciónak megfelelő 5 kDa-os oszlop retentátum, valamint a <5 kDa-os filtrátum. Az ACE-aktivitást mindhárom vizelet komponensben, valamint az alfrakciók 10 kDa-os retentátumhoz visszakevert elegyeiben is meghatároztuk. Sem a <5 kDa-os, sem az 5-10 kDa-os alfrakció nem mutatott ACE-aktivitást. A <5 kDa-os filtrátum 10 kDa-os retentátumhoz keverése jelentős ACE-aktivitás csökkenést eredményezett, közel reprodukálva a natív vizeletben megfigyelt gátló hatást ($12,06 \pm 6,62\%$ vs. $10,84 \pm 3,55\%$). Ezzel szemben az 5-10 kDa közötti alfrakció visszaadása nem befolyásolta az ACE-aktivitást

($99,62 \pm 6,67\%$ vs. $100,00 \pm 4,73\%$). Ezen eredmények nem támogatják endogén ACE-gátló jelenlétét az 5-10 kDa molekulatömeg tartományban (9.C ábra).



9. ábra - Az endogén vizelet ACE-inhibitorok elválasztása molekulatömeg alapú membránszűréssel és a szűrlet visszaadásának hatása az ACE-aktivitásra

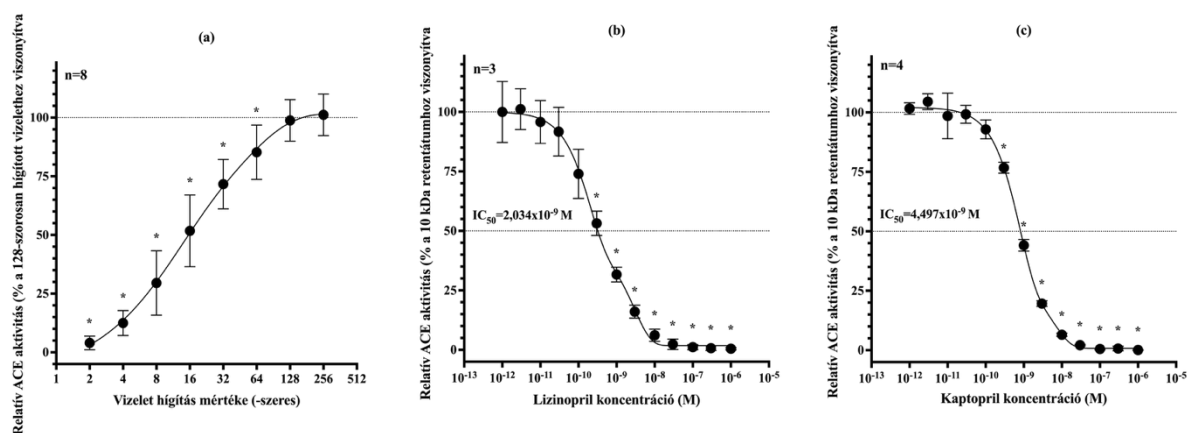
Az (a) panel az endogén vizelet ACE-gátlók molekulatömeg alapú membránszűréssel végzett elválasztásának eredményét szemlélteti. A >150 kDa molekulatömegű vizelet ACE aktivitásának meghatározása natív vizeletben, valamint 5, 10, 30 és 50 kDa pórusméretű membránszűrők alkalmazásával nyert retentátumokban történt. A <10 kDa-os filtrátum visszaadása a vizelet ACE-aktivitás gátlását okozta (b). Az 5-10 kDa molekulatömeg tartományba eső endogén inhibitor látszólagos jelenléte kizárólag módszertani okokra volt visszavezethető (c). Az oszlopok három független kísérlet átlagát és szórását ábrázolják. Az ACE-aktivitás értékeket a 10 kDa-os retentátum aktivitásához viszonyítottuk. A natív mintáktól szignifikánsan eltérő ACE-aktivitás értékeket csillag (*) jelöli.

6.2.2. A hígítás hatása a vizelet ACE-aktivitásra és az enzim farmakológiai gátolhatósága

Az inhibitorok membránszűréssel való eltávolításával igazoltuk, hogy a vizeletben jelen lévő endogén ACE-gátlás reverzibilis. A szűrésnél egyszerűbb alternatívát keresve megvizsgáltuk, hogy a gátló hatás megszüntethető-e a vizelet hígítása által, csökkentve az inhibitorok lokális koncentrációját. A natív vizeletből sorozathígításokat készítettünk, és

minden hígítási fokon meghatároztuk az ACE-aktivitást. A reakcióelegyben alkalmazott vizelet hígítás mértéke szignifikánsan befolyásolta a mért ACE-aktivitást. A hígításra korrigált ACE-aktivitás fokozatos növekedését figyeltük meg egészen 128-szoros hígításig, amely felett reziduális endogén gátlás már nem volt kimutatható (10.A ábra). A további hígítás elhanyagolható hatással járt, 256-szoros hígításnál mindössze +2,34%-os aktivitás változást észleltünk.

A vizelet ACE-aktivitást a lizinopril ($IC_{50} = 2,034 \times 10^{-9}$ M; 10.B ábra) és a kaptopril ($IC_{50} = 4,497 \times 10^{-9}$ M) teljes mértékben gátolta (10.C ábra).



10. ábra - Vizelet ACE-aktivitás sorozathígított vizelet mintákban és ACE-gátló gyógyszerek koncentráció-hatás görbéi

A hígításra korrigált vizelet ACE-aktivitást sorozathígított vizelet mintákban mértük (2-szerestől 256-szoros hígításig) (a). Százhuszonnyolcszoros hígításig az aktivitás szignifikáns növekedése volt megfigyelhető, efelett további változás nem jelentkezett. A 128-szoros hígításon mért értékektől szignifikánsan eltérő ACE-aktivitásokat csillag (*) jelöli. A vizelet ACE-aktivitás ACE-gátló gyógyszerekkel, lizinoprillel (b) és kaptoprillel (c) teljes mértékben gátolhatónak bizonyult. A lizinopril, illetve a kaptopril vizelet ACE-aktivitásra vonatkozó IC_{50} értéke 2,034 nM-nak, illetve 4,497 nM-nak adódott. Minden pont legalább három független mérés átlagát és szórását reprezentálja.

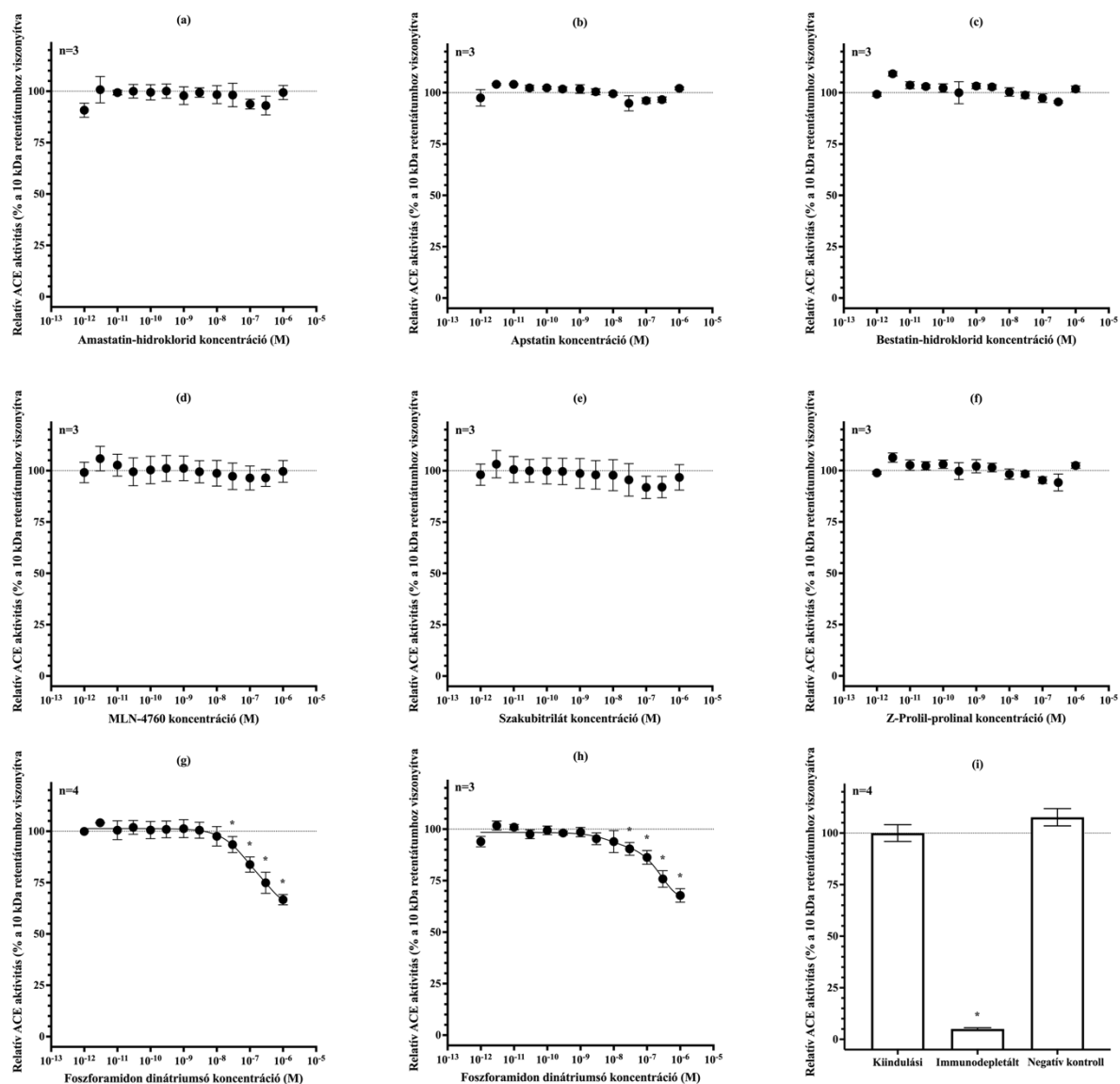
6.2.3. A vizelet ACE-aktivitás-mérő módszer specifitásának vizsgálata

A kidolgozott vizelet ACE-aktivitás-mérő módszer specifitását számos különböző peptidáz inhibitor alkalmazásával teszteltük. Az aminopeptidáz A és N gátlójaként ismert amastatin-hidroklorid nem befolyásolta a mért aktivitást (11.A ábra). Hasonlóképpen, az aminopeptidáz P-t gátló apstatin, illetve az aminopeptidáz B és N enzimekre ható bestatin-hidroklorid nem okoztak változást a vizelet ACE-aktivitásban (11.B,C ábra). Az ACE2

szelektív MLN-4760 inhibitor szintén nem volt hatással a mérésre (11.D ábra). A klinikumban alkalmazott neprilizin-gátló szakubitrilát nem csökkentette a vizelet ACE-aktivitást (11.E ábra), valamint a prolil-endoropeptidáz gátló Z-prolil-prolinal esetében sem volt kimutatható hatás (11.F ábra).

Ugyanakkor a foszforamidon dinátriumsó - egy szakubitriláthoz hasonló, de az ACE-t is gátolni képes másik neprilizin-gátló - 1 μM koncentrációban megközelítőleg 35%-kal csökkentette a vizelet ACE-aktivitást (11.G ábra). A foszforamidon hasonló mértékű gátló hatást fejtett ki a szérum ACE-aktivitásra is (11.H ábra).

Végül elvégeztük a vizelet ACE immunodeplécióját egy kereskedelmi forgalomban kapható ACE-specifikus ellenanyaggal. Az immunodepléciót követően a vizelet ACE-aktivitás a kiindulási érték $5,0 \pm 0,6\%$ -ára csökkent, míg az antitestet nem, kizárólag Protein G Sepharose gyantát tartalmazó negatív kontroll megőrizte teljes aktivitását ($107,7 \pm 4,2\%$; 11.I ábra).



11. ábra - Peptidázgátlók hatása a vizelet ACE-aktivitásra

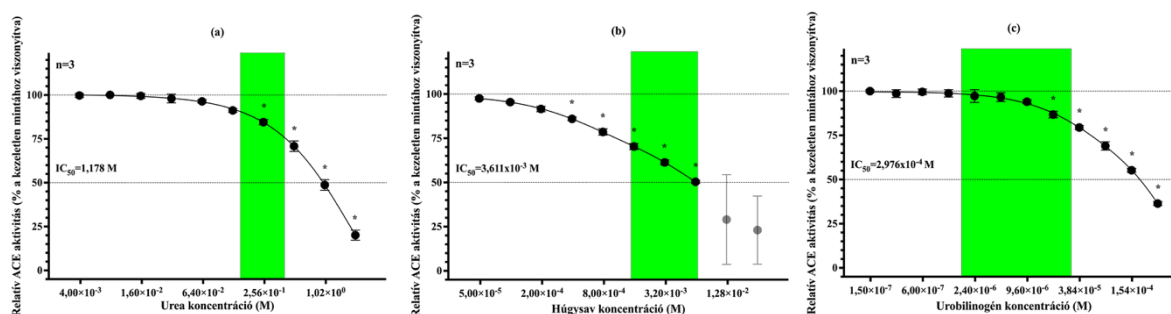
A vizelet ACE-aktivitást különböző peptidázgátlók jelenlétében határoztuk meg: amastatin-hidroklorid (aminopeptidáz A és N gátló) (a), apstatin (Xaa-Pro aminopeptidáz gátló) (b), bestatin-hidroklorid (aminopeptidáz B és N gátló) (c), MLN-4760 (ACE2-gátló) (d), szakubitrilat (neprilizin-gátló) (e), Z-prolil-prolinal (prolil endopeptidáz gátló) (f), valamint foszforamidon dinátriúmsó (neprilizin-gátló) (g). A foszforamidon dinátriúmsó szérum ACE-aktivitásra gyakorolt hatását a (h) panel szemlélteti. Minden pont legalább három független mérés átlagát és szórását ábrázolja, az aktivitásértékek a kiindulási, inhibitor nem tartalmazó 10 kDa-os retentátum aktivitásának százalékában kerültek kifejezésre. A gátlószert nem tartalmazó mintáktól szignifikánsan eltérő vizelet ACE-aktivitás értékeket csillag (*) jelöli. Az (i) panel az immunodepleciót követően fennmaradó vizelet ACE-aktivitást mutatja be a

kiindulási mintához, illetve a csak Protein G Sepharose gyantát (ellenanyag nélkül) tartalmazó negatív kontrollhoz viszonyítva. Az oszlopok négy független mérés átlagát és szórását ábrázolják, a kiindulási mintához képest szignifikáns eltérést csillag (*) jelzi.

6.2.4. A vizelet ACE természetes endogén inhibitorai

A vizelet ACE fiziológias endogén inhibitoraiként az ureát (60,06 g/mol; 12.A ábra), a húgysavat (168,11 g/mol; 12.B ábra) és az urobilinogént (592,7 g/mol; 12.C ábra) azonosítottuk. A három kis molekula gátló hatását tisztított vizelet ACE-n vizsgáltuk. Az urea, referencia-tartományán belül, a vizelet ACE-aktivitás 10-25%-os gátlásáért volt felelős, míg magasabb koncentrációk mellett kifejezettebb hatást mutatott ($IC_{50} = 1,178 \text{ M}$). A húgysav a fiziológias tartományban 30-50%-os gátláshoz járult hozzá, míg magasabb koncentrációk esetén közel teljes gátlást eredményezett ($IC_{50} = 3,611 \times 10^{-3} \text{ M}$). Az urobilinogén normál körülmények között 3-20%-kal csökkentette az ACE-aktivitást, azonban hiperurobilinogén állapotokban kifejezett gátló potenciált mutatott ($IC_{50} = 2,976 \times 10^{-4} \text{ M}$).

Patológias körülmények között ezen molekulák bármelyike önmagában is elegendő lehet a vizelet ACE-aktivitás felfüggesztéséhez.

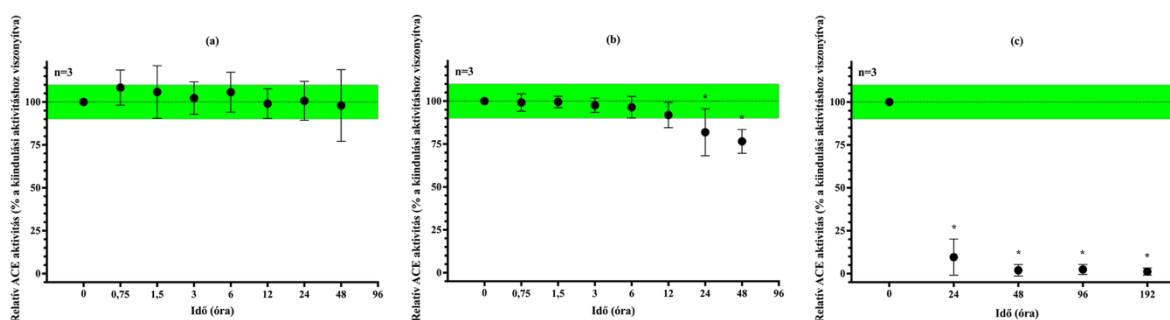


12. ábra - Az urea, a húgysav és az urobilinogén hatása a vizelet ACE-ra

Az ACE-aktivitást tisztított vizeletminták alkalmazásával (30 kDa-os retentátum) határoztuk meg, amelyekhez urea (a), húgysav (b) és urobilinogén (c) sorozathígításokat adtuk. Minden jelölés három független mérés átlagát és szórását reprezentálja. Az egyes vegyületekhez tartozó IC_{50} értékek feltüntetésre kerültek. A zölddel jelölt tartomány az adott molekulák vizeletben előforduló fiziológias koncentrációtartományát jelzi. Mérési korlátok miatt a szürke színnel ábrázolt pontok kizárólag szemléltető célokat szolgálnak. A kiindulási értéktől szignifikánsan eltérő eredményeket csillag (*) jelöli.

6.2.5. A vizelet ACE-aktivitás stabilitása különböző tárolási körülmények között

A vizelet ACE-aktivitás-mérés diagnosztikus alkalmazhatóságának értékelése céljából megvizsgáltuk az analit stabilitását három különböző tárolási hőmérsékleten. A vizelet ACE-aktivitás 25 °C-on tartósítószer alkalmazása nélkül is több mint egy napon keresztül stabil maradt (13.A ábra). A mintákat 4 °C-on, hűtőszekrényben tárolva, legalább 12 órán keresztül nem volt kimutatható statisztikailag szignifikáns ACE-aktivitás változás. Ugyanakkor egy nap elteltével megközelítőleg 20 %-os csökkenést tapasztaltunk (13.B ábra). A fagyasztás, a szérumminták esetén tapasztaltakkal ellentétben (kiindulási ACE-aktivitás: $9,0 \pm 4,0$ U/L, kiolvasztás utáni ACE-aktivitás: $9,8 \pm 4,2$ U/L), a vizelet ACE-aktivitás teljes elvesztéséhez vezetett (13.C ábra).



13. ábra - A tárolási hőmérséklet vizelet ACE-ra gyakorolt hatása

A tárolási hőmérséklet vizelet ACE-aktivitásra gyakorolt hatását +25 °C-on (a), +4 °C-on (b) és -20 °C-on (c) határoztuk meg. Minden jelölés három független mérés átlagát és szórását ábrázolja. A kiindulási értéktől szignifikánsan eltérő eredményeket csillag (*) jelöli.

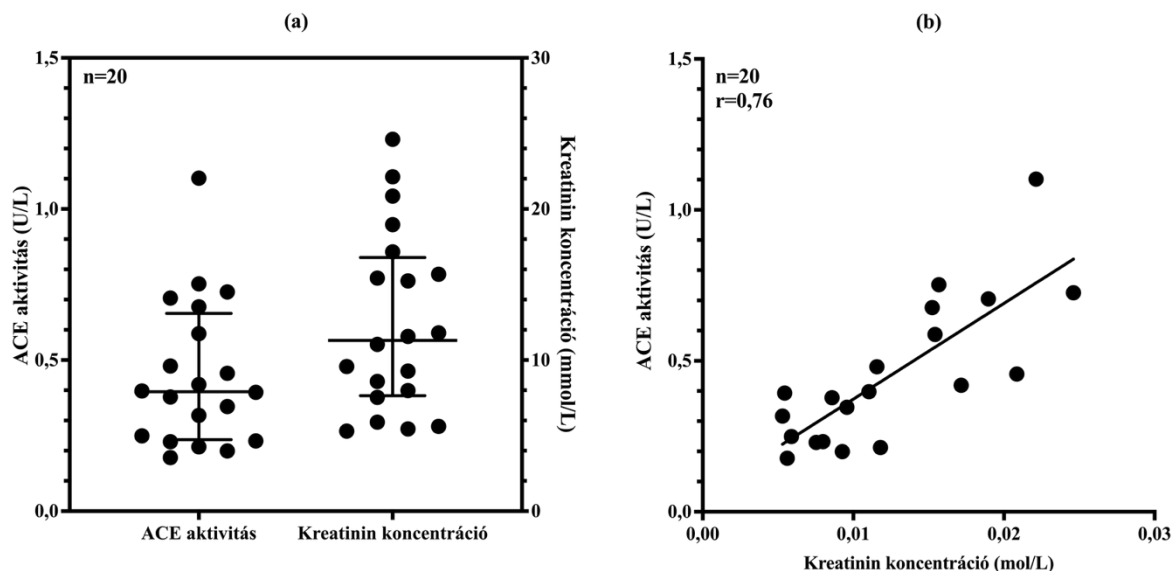
6.2.6. A vizelet ACE-aktivitás szoros korrelációja a vizelet kreatinin koncentrációval

A hígításon alapuló vizelet ACE-aktivitás-mérő módszerrel megmértük az enzim-aktivitást 20 ACE-gátlót nem szedő személy vizeletmintájában. Az eredmények 0,18 és 1,10 U/L közé esve közel egy nagyságrendnyi eltérést mutattak (14.A ábra).

A vizeletminták vizuális értékelése során jelentős különbségeket figyeltünk meg azok színintenzitásában, amely megfigyelés a minták koncentráltóságának változatosságára engedett minket következtetni. Ezen különbségek figyelembevétele érdekében meghatároztuk a vizeletminták kreatinin koncentrációját, amely az ACE-aktivitáshoz hasonló széles tartományban változott (5,9-24,6 mmol/L).

A vizelet ACE-aktivitás és kreatinin koncentráció között szoros, pozitív korrelációt tudtunk kimutatni (Spearman $r=0,76$; $p<0,0001$; 14.B ábra), amely a minták koncentráltóságának

meghatározó szerepére utal a mért ACE-aktivitás alakulásában. Eredményeink alapján vizelet ACE-aktivitás-méréskor, a hígulásból fakadó hatások korrigálása és a minták közötti pontosabb összehasonlíthatóság érdekében, a minta kreatinin koncentrációjára történő normalizálás javasolt.

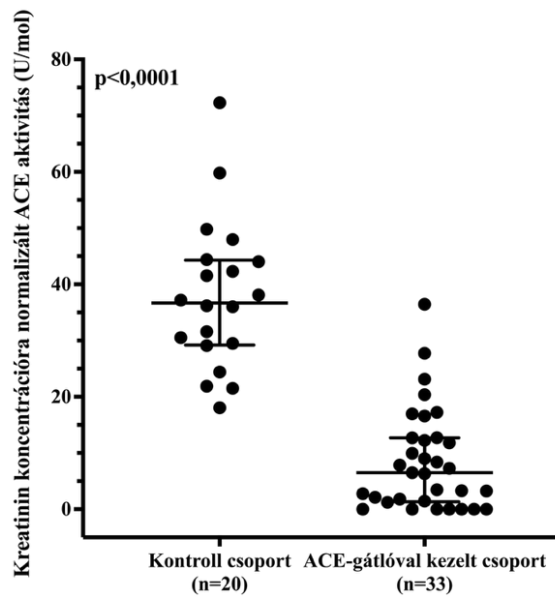


14. ábra - A vizelet ACE-aktivitás függ a vizelet töménységétől

Az (a) panel a vizelet ACE-aktivitás és a kreatinin koncentráció megoszlását mutatja ACE-gátlót nem szedő egyének körében, a mediánértékek és az interkvartilis tartományok feltüntetésével. A (b) panel a vizelet ACE-aktivitás és a kreatinin koncentráció közötti korrelációt szemlélteti. Minden egyes pont egy-egy egyéni mérési adatot reprezentál.

6.2.7. Az ACE-gátló kezelés hatása a vizelet ACE-aktivitásra

Ismert, hogy az ACE-gátló terápia jelentősen csökkenti a szérum ACE aktivitását. Meg kívántuk vizsgálni az ACE-gátló kezelés vizelet ACE-aktivitásra gyakorolt hatását. Ennek érdekében 33 ACE-gátlót szedő beteg vizeletmintáját elemeztük. A kreatinin koncentrációra vonatkoztatott vizelet ACE-aktivitás szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott az ACE-gátlóval kezelt betegek körében (n=33) a gyógyszert nem szedő kontroll csoportban mérthez képest (n=20) (6,492 U/mol [1,327-12,700] vs. 36,690 U/mol [29,200-44,300]; $p < 0,0001$; 15. ábra). Eredményeink azt sejtetik, hogy a vizelet ACE-aktivitás/kreatinin koncentráció hányados megbízható indikátorként szolgálhat az ACE-gátló gyógyszereszedés kimutatására, és segítséget nyújthat a mindennapok során a nem megfelelő vagy hiányos terápiás adherencia azonosításában.



15. ábra - Az ACE-gátlót szedő betegek vizeletében mérhető kreatinin koncentrációra normalizált ACE-aktivitás szignifikánsan alacsonyabb

Az ábrán a kreatinin koncentrációra normalizált vizelet ACE-aktivitás ACE-gátló kezelésben nem részesülő ($n = 20$), illetve ACE-gátló terápiában részesülő betegek ($n = 33$) esetében kerül bemutatásra. Minden pont egy-egy egyéni értéket jelöl. Az egyes csoportok mediánjai és interkvartilis tartományai feltüntetésre kerültek. A csoportok közötti szignifikáns különbséget a p -érték jelzi.

7. MEGBESZÉLÉS

Az angiotenzin-konvertáló enzim fiziológiás szerepének, diagnosztikai alkalmazhatóságának és terápiás célpontként betöltött jelentőségének kutatása közel hetven esztendőre nyúlik vissza. Ez idő alatt számos, a klinikai gyakorlatot alapvetően meghatározó felfedezés látott napvilágot a területen. Az enzim aktivitását gátló gyógyszerek számos kardiovaszkuláris betegségben szenvedő személy számára biztosítottak további, egészségben eltöltött éveket (105), illetve szérum aktivitásának mérése megannyi egyén szarkoidózis diagnózisának megállapítását segítette elő (2). A laboratóriumi diagnosztika területén azonban, mind preanalitikai, mind analitikai területen, számos megválaszolni szükséges, nyitott kérdés maradt a mai napig, amely kérdések figyelmen kívül hagyása klinikailag releváns félreértelmezések és potenciális megbízhatósági kérdések alapjául szolgálhat.

Kutatásaink eredményei jobb megértést és választ szolgáltatnak néhány fennálló kérdésre. Rámutatnak a laboratóriumi medicina központi szerepére a RAAS rendszerhez fűződő diagnosztikai és terápiás területeken azáltal, hogy két biológiai közegben is alkalmazható, több célra adaptálható, költséghatékony megközelítést ajánlanak a helyes interpretáció és döntéshozatal támogatására. Igazolják az aktivitásmérésekkel interferáló tényezők jelenlétét a mindennapi gyakorlatban, és több kórkép, valamint gyanú esetén szupportív megoldásként egészítik ki a klinikusok számára hagyományosan rendelkezésre álló eszközöket.

A szarkoidózis diagnosztikája a klinikai gyakorlatban gyakran jelent kihívást az ellátó egészségügyi csapatok számára, amit tovább nehezít, hogy a WASOG nemzetközi irányelvei jelenleg egyedül az angiotenzin-konvertáló enzimet jelölik meg alkalmazható biomarkerként a betegség diagnosztizálására és utánkövetésére (2,77). Ezzel párhuzamosan, az ACE-aktivitás csökkentése központi terápiás cél a kardiovaszkuláris betegségek kezelésében, így az ACE-gátlók világszerte a leggyakrabban alkalmazott gyógyszer csoportok közé tartoznak (88–90). Az ACE-gátló kezelés következtében kialakuló, fals normális vagy fals alacsony ACE-aktivitás szarkoidózis gyanúja esetén félrevezető lehet a klinikusok számára. Késleltetheti a diagnózist, és további felesleges vizsgálatokat indukálhat. Ennek megelőzése érdekében, elengedhetetlen a betegnél fennálló ACE-gátló kezelés ismerete, valamint az ACE-aktivitás mért értékének körültekintő értelmezése. A klinikai gyakorlatban azonban az ACE-gátló használatra vonatkozó információk elsődleges forrását továbbra is a betegek - gyakran megbízhatatlan - önbevallása jelenti.

A reverzibilis enzim inhibitorok biológiai mintákban kifejtett hatásának vizsgálatára egyszerű és jól alkalmazható módszer az enzimaktivitás meghatározása különböző mintahígítások mellett. A minta fokozatos hígításával a reverzibilis inhibitor koncentrációja csökken a reakcióelegyben, ami az inhibitor hatásának fokozatos megszűnéséhez vezet. Optimális esetben, megfelelő mértékű hígítással olyan állapot érhető el, mintha a beteg nem részesülne a gyógyszeres kezelésben, így az enzim gátlásmentes aktivitása objektíven meghatározható a terápia megszakítása nélkül.

Az ACE-gátló gyógyszerek reverzibilis enzim inhibitorok, így ezt a megközelítést alkalmaztuk mérőmódszerünk kidolgozása során. A kész esszé alkalmazásával, ezt követően megvizsgáltuk, hogy a Debreceni Egyetemen az elmúlt években szarkoidózis gyanújával vizsgált több mint 1800 beteg esetében történt-e ACE-aktivitás meghatározás egyidejű ACE-gátló kezelés fennállása mellett. Meglepő módon, méréseink arra utaltak, hogy minden hatodik beteg ACE-gátló gyógyszerhatás alatt állt a mintavétel időpontjában, így esetükben a hagyományos laboratóriumi ACE-aktivitás-mérő vizsgálattal fals alacsony ACE-aktivitás értékek kerültek megállapításra.

Habár a referencia-tartományt nem meghaladó, vagy kifejezetten az alatti ACE-aktivitás értékek figyelmeztető jelként szolgálhatnak az inadekvát mintavételi körülményekre ezen betegcsoportban, eredményeink arra utalnak, hogy az ellátók nem minden esetben fordítottak kellő figyelmet az ACE-gátlók ACE-aktivitást csökkentő hatására. Azonosítottunk olyan betegeket is, akiknél az ACE-aktivitás meghatározását ismételten elrendelték annak ellenére, hogy az ACE-gátló kezelést nem függesztették fel. Ennek egyik lehetséges magyarázata lehet, hogy egyes betegek nem tudták pontosan felsorolni az általuk szedett gyógyszereket, így a kezelőorvos nem volt tisztában azzal, hogy páciense a laboratóriumi eredményeket befolyásoló terápia alatt áll. Mindezen eredmények egy objektív laboratóriumi teszt szükségességét támasztják alá, amely egyetlen vérminta alapján, a klinikai gyógyszerelési adatok ismerete nélkül is lehetővé teszi a laboratóriumban dolgozók számára a mért értékek helyes értelmezését. A laboratóriumi szakemberek pedig, az objektív adatok birtokában visszajelzést adhatnak az kezelőorvos számára az ACE-gátló interferencia fennállásáról és annak elkerülési lehetőségeiről, csökkentve ezáltal a felesleges vizsgálatok számát, az egészségügyi személyzet túlterhelését és a betegek frusztrációját.

Azokban az esetekben, ahol a mérési eredmények az interferenciát alátámasztják, a betegek ACE-aktivitás értékeinek közlése kizárólag tájékoztató jelleggel, interpretatív megjegyzéssel ellátva javasolt. A megjegyzésben a laboratóriumi szakembereknek fel kell

hívniuk az ellátó orvos figyelmét arra, hogy a minta nagy valószínűséggel ACE-gátló gyógyszert tartalmaz, amely szignifikánsan csökkenti az ACE-aktivitást. A gyógyszeres kezelés módosításáról azonban a beteget ismerő kezelőorvosnak kell döntenie a következő ACE-aktivitás meghatározás előtt, mivel az ACE-gátlók akár rövid idejű megvonása is növelheti az egyén kardiovaszkuláris kockázatát, például a vérnyomás hirtelen emelkedése révén. Ugyanakkor hangsúlyozandó, hogy a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer más elemeire ható gyógyszerek - például az angiotenzin II receptor blokkolók - nem befolyásolják a szérum ACE-aktivitást, így nem interferálnak az ACE-aktivitás mérésével.

Eredményeink megerősítik - nem elsőként az irodalomban -, hogy populációs szinten az ACE-gátlót szedő betegek átlagos ACE-aktivitása alacsonyabb, mint az ilyen kezelésben nem részesülő egyéneké (106–110). Ugyanakkor megfigyeléseink arra is rávilágítanak, hogy egyéni szinten jelentős átfedés tapasztalható az ACE-gátlót szedő és nem szedő betegek ACE-aktivitás értékei között. A vizsgált személyek 77,5%-ának ACE-aktivitása azonos tartományba (2,78-27,42 U/L) esett az ACE-gátló gyógyszerhatás jelenlététől függetlenül. Ennek következtében, a hagyományos esszé alkalmazásával gyakorlatilag lehetetlen annak megállapítása, hogy a referencia-tartományon belüli ACE-aktivitású minták közül melyek származnak olyan betegektől, akik egyébként magas ACE-aktivitással rendelkeznének, de ACE-gátló kezelésben részesülnek. Az ACE-gátló gyógyszerek kimutatása szérumból többnyire költséges és műszerigényes módszerekkel, például tömegspektrometriával történik. A forgalomban lévő ACE-gátlók nagy száma miatt egyedi módszerek, kalibrátorok és kontrollok lennének szükségesek, ami rutinszerű alkalmazásukat gyakorlatilag kivitelezhetetlenné teszi. Ezzel szemben az általunk kidolgozott módszer bármely ACE-gátló készítmény esetén alkalmazható, függetlenül a bevétel időpontjától, mivel nem magát a molekulát azonosítja, hanem annak hatását méri (111,112). A meghatározás továbbra is ACE-aktivitás mérésen alapul, így a módszer könnyen bevezethető bármely laboratóriumban, ahol ACE-aktivitás meghatározása rutinszerűen történik (113), új műszerek beszerzése vagy új analitikai eljárások bevezetése nélkül.

Vizsgálatunkban az ACE-gátlás mértékére vonatkozó határértéket 80%-ban határoztuk meg, amely felett ACE-gátló kezelés fennállása valószínűsíthető. A határérték meghatározását a helyi populációban megfigyelt endogén ACE-gátlás mértéke alapján végeztük, amely egyetlen egyén esetében sem haladta meg a 80%-ot (maximálisan 78%). Az endogén ACE-gátlás mértéke ugyanakkor populációnként eltérhet, ezért a módszer laboratóriumi applikálása

esetén, a megadott határérték alkalmazása előtt, célszerű a helyi, ACE-gátló kezelést nem kapó populációban az endogén gátlás szintjét meghatározni.

Az ACE-gátlók szarkoidózis diagnosztikában betöltött interferáló szerepére korábbi közlemények is felhívták a figyelmet. Egy belgiumi vizsgálat körülbelül 10%-os arányt talált (114), míg egy iowai retrospektív tanulmány szerint a betegek mintegy 8%-ánál folyt ACE gátló kezelés az ACE-aktivitás meghatározásának idejében (7). Megjegyzendő azonban, hogy ezek a vizsgálatok kizárólag az orvosi dokumentációban rögzített adatokra és extrém alacsony ACE-aktivitás értékekre tudtak támaszkodni, nem minden betegnél történt gyógyszer szint meghatározás. Kutatásunk erőssége a teljes vizsgált populáció biokémiai elemzése. A talált mintegy 17%-os arány így még jobban tükrözi a probléma valós nagyságrendjét. Továbbá, kidolgozott esszénkkel egy egyszerűen bevezethető, rutinszerűen alkalmazható módszert javasunk az ACE-gátlót szedő betegek azonosítására.

A vénás vérvétellel szemben, a vizelet nem invazív módon, speciális képzés vagy eszközök nélkül gyűjthető, könnyen hozzáférhető biológiai minta. Irodalmi adatok támasztották alá a vizelet ACE-aktivitás-mérés potenciális klinikai alkalmazhatóságát, azonban történelmileg az uACE-aktivitás meghatározása egyszerű és széles körben hozzáférhető technikákkal nem volt kivitelezhető. A szarkoidózis diagnosztikában alkalmazott ACE-aktivitás-mérő módszer fejlesztése során szerzett tapasztalatainkat felhasználva, olyan megbízható és reprodukálható módszer kidolgozását tűztük ki célul, amely lehetővé teszi az uACE-aktivitás mérését az endogén gátló tényezők hatásától mentesen. E megközelítés célja az analit széles körű kutatásának és jövőbeli gyakorlati alkalmazásának elősegítése volt. Az endogén inhibitorok jelenlétének áthidalására egy hígításon alapuló mérési eljárást fejlesztettünk ki egy korszerű fluoreszcens szubsztrát alkalmazásával, amely pontos, kvantitatív uACE-aktivitás meghatározást tesz lehetővé. Tekintettel arra, hogy a legtöbb ACE-gátló elsősorban a vesén keresztül ürül (5,115), azt is vizsgáltuk, hogy ez a módszer alkalmas-e a farmakológiai ACE-gátlás tükrözésére, és ezáltal a vizelet, mint praktikus mátrix, használható-e terápiás monitorozás céljára.

Bár az uACE-aktivitását gátló endogén tényezők jelenléte korábban is ismert volt (10), azok azonosítására nem került sor. Vizsgálatunkban igazoltuk, hogy fiziológiás körülmények között az uACE-aktivitása szinte teljes mértékben gátolt, és az urea, a húgysav, valamint az urobilinogén az uACE fő endogén inhibitorainak tekinthetők. Az urea az aminosav anyagcsere végterméke, jellemzően nagy koncentrációban van jelen a vizeletben. Figyelembe vétele a klinikai kép értékelése során egyre nagyobb jelentőséggel bír a magas fehérjetartalmú, ketogén

és paleolit étrendek terjedésével (116). Továbbá, az urea gátló hatása különösen idős egyénekben lehet releváns, ahol a fokozott urea kiválasztás homeosztatikus mechanizmusként járulhat hozzá a bradikinin lebontásának csökkentéséhez, ezáltal elősegítve a natriuresist és a vízkiválasztást. A húgysav a purin nukleotidok lebontási terméke. A modern táplálkozási szokások és bizonyos gyógyszerek hatására gyakorta emelkedett szérumszintet mutat. Mindkét eset fennállása hyperuricosuriához vezethet, tovább fokozva a vegyület gátló hatását (117). Az urobilinogén a bilirubin lebontásának mellékterméke. Különösen májbetegségben, vagy hemolitikus anémiában szenvedő betegek esetében kerülhet a középpontba, mivel ezen kóros állapotokban gátló potenciálja kifejezetten jelentőssé válik (118). E három alacsony molekulatömegű vegyület együttesen a fiziológiás uACE-gátlás akár 90%-áért lehet felelős, kóros körülmények között pedig ennél is nagyobb mértékű hatás várható.

Kiemelendő, hogy mindhárom molekula reverzibilis inhibitorként viselkedik, és az ACE-aktivitásra gyakorolt gátló hatásuk a minta hígításával megszüntethető. A jelenség analóg a szérumszint ACE albumin által közvetített reverzibilis gátlásával (8,9). Eredményeink azt mutatják, hogy 128-szoros hígítás mellett az uACE-aktivitás már nem áll az endogén inhibitorok gátló hatása alatt. Ezen hígítás gyakorlatilag a gátlásmentes állapotnak feleltethető meg. Ez a megfigyelés tette lehetővé az egyszerű, fluoreszcencia alapú mérési eljárásunk alkalmazását, amely szükségtelenné teszi a munka- és költségigényes membránszűrési lépéseket. A kontrollreakciókban alkalmazott 1 μ M lizinopril - az ACE-aktivitás teljes gátlásával - biztosítja a módszerünk specificitását. Kiemelendő azonban, hogy amennyiben az eredeti vizeletminta eleve erősen híg (például napközbeni minták, kreatinin koncentráció <2,5 mmol/L), az optimális mérési pont alacsonyabb hígítás mellett, például 64-szeres hígításon jelentkezhet. Ennek következtében, a 128-szoros hígításon mért alacsony, vagy ki nem mutatható uACE-aktivitás esetén, célszerű a mérést 64-szeres hígításon megismételni. Így a túlzott hígításból eredő alábecslés elkerülhető. A kidolgozott eljárás - a szarkoidózis diagnosztikában alkalmazott esszéhez hasonlóan - bármely olyan klinikai laboratóriumban könnyen, további műszerek beszerzése nélkül bevezethető, ahol ACE-aktivitásmérés rutinszerűen történik.

A módszer klinikai alkalmazhatóságának igazolására megvizsgáltuk az uACE-aktivitás stabilitását különböző tárolási körülmények mellett. Eredményeink rámutattak, hogy az ACE-aktivitás szobahőmérsékleten és 4 °C-on a rutin laboratóriumokban szokásos munkaidőt meghaladó időtartamig stabil marad, bár 24 óra elteltével 4 °C-on körülbelül 20%-os csökkenés volt megfigyelhető. Megjegyzendő, hogy a szérummintákkal ellentétben, amelyek fagyasztás-

felolvasztást követően is megőrzik enzimaktivitásukat, az uACE rendkívül érzékeny a fagyasztásra. Egyetlen fagyasztás-felolvasztási ciklus is az ACE-aktivitás teljes elvesztéséhez vezetett, amely kizárja a hosszú távú tárolás lehetőségét. Ezen kifejezett instabilitás valószínűleg a szérum ACE-től eltérő szerkezeti sajátosságokra vezethető vissza, különösen az N-terminális aktív centrum közelében korábban leírt eltérő glikozilációs/szialisációs mintázatokra (53). Emellett a vizelet alacsony fehérjekoncentrációja is hozzájárulhat az instabilitáshoz. Ezen eredmények rámutatnak a standardizált preanalitikai körülmények fontosságára az uACE-aktivitás megbízható mérésének biztosítása érdekében. Az enzimaktivitás megőrzése céljából, javasolt a vizeletmintákat 25 °C-on tárolni, és lehetőség szerint a gyűjtés napján analizálni.

Az uACE-aktivitás szoros korrelációt mutatott a vizelet kreatinin koncentrációjával. A kreatinin koncentráció egyidejű meghatározása és az ACE-aktivitás kreatininre történő normalizálása hatékonyan küszöböli ki a vizelet töménységének variabilitását, lehetővé téve ezáltal a minták közötti pontosabb és megbízhatóbb összehasonlítást. Ez a megközelítés összhangban áll más vizelet biomarkerek értékelésénél alkalmazott gyakorlattal, mint például az albumin/kreatinin hányados használatával, ahol a kreatininre normalizálás kompenzálja a hígulási hatásokat (119). Ugyanakkor a kreatininre történő normalizálásnak jelentős korlátai lehetnek krónikus vesebetegség (CKD) és tubuláris epithelialis károsodás esetén. CKD-ban a csökkent glomeruláris filtrációs ráta (GFR) rendszerint alacsonyabb vizelet kreatinin koncentrációval jár együtt a csökkent filtráció, a csökkent izomtömeg és a károsodott tubuláris funkció következtében (120). Hasonlóan, akut és krónikus tubuláris károsodás esetén a kreatinin szekréciójának zavara és a koncentrálóképeség csökkenése alacsonyabb vizelet kreatinin szinteket eredményezhet. Ezek a kóros változások csökkenthetik a kreatininre történő normalizálás megbízhatóságát, és híg minták esetén az analit kiválasztásának túlbecsléséhez vezethetnek (121). Ennek megfelelően, előrehaladott CKD-ban és/vagy jelentős tubuláris diszfunkció esetén a kreatininre normalizált uACE-aktivitás értékei fokozott körültekintéssel értelmezendők. Célzott klinikai vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy ezen körülmények között milyen mértékben és milyen korlátok mellett alkalmazható megbízhatóan a kreatinin alapú normalizálás.

Bár az ACE-gátlók - a szarkoidózis diagnosztika interferenciáit taglaló részben leírtak szerint - világszerte a leggyakrabban alkalmazott gyógyszercsoportok közé tartoznak (88–90), a terápiás stratégia és az adagolás optimalizálása jelentős klinikai kihívást jelent, amelyet a gyakorta nem megfelelő beteg együttműködés tovább nehezít (100,101). A

folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria (LC-MS/MS) alkalmazása (122,123) a szérum és vizelet ACE-gátló koncentráció pontos meghatározására a korábban részletezett okokból nem megoldott. A mindennapi klinikai gyakorlatban így a terápia hatékonyságának megítélésére a betegek önbevallását és a vérnyomásmérést alkalmazzák. Azonban az ily módon történő megítélés is torzulhat társbetegségek, fehérképeny-hipertónia, több antihipertenzívum egyidejű alkalmazása, illetve az ACE-gátlók nem vérnyomáscsökkentő indikációban (például vesebetegségben vagy miokardiális infarktust követően) történő használata miatt. Bár az uACE tercier szerkezete kisebb eltéréseket mutat (53), enzimatisz tulajdonságai - beleértve a lizinopril és kaptopril általi gátolhatóságot ($IC_{50} = 2,03 \times 10^{-9}$ M, illetve $IC_{50} = 4,54 \times 10^{-9}$ M) - szoros párhuzamot mutatnak a keringő ACE jellemzőivel (124). Ezek a hasonlóságok alátámasztják az uACE alkalmazhatóságát a szisztémás ACE-aktivitás megbízható helyettesítő markereként a terápiás monitorozásban.

Módszerünket egy 20 kezeletlen egyénből és 33 ACE-gátló terápiában részesülő betegből álló kohorszban alkalmazva igazoltuk, hogy az uACE-aktivitás/kreatinin hányados szignifikánsan alacsonyabb a kezelt betegek körében. A kezelt csoporton belül megfigyelt kieső értékek feltehetően a mintavételt megelőzően kihagyott gyógyszeradagokra utalnak, ami tovább erősíti a módszer adherencia ellenőrzésben rejlő potenciálját. Bár az abszolút ACE-aktivitás is különbséget mutatott a csoportok között, a hígulási variabilitással szembeni ellenálló képessége miatt a kreatininre normalizált hányados alkalmazása javasolt.

Fontos azonban szem előtt tartani, hogy egyes ACE-gátlók részben hepatikus eliminációval ürülnek a szervezetből (például fosinopril, trandolapril). Ilyen esetekben az uACE-aktivitáson alapuló terápia hatékonyság értékelés fokozott óvatosságot igényel, különösen vesekárosodásban szenvedő betegeknél, akiknél a hepatikus clearance kompenzatórikusan fokozódhat.

A kifejlesztett egyszerű és jól reprodukálható módszer lényeges klinikai implikációkkal bírhat. Lehetővé teheti az ACE-gátló terápia adherenciájának rutinszerű monitorozását ambuláns környezetben, objektív eszközt biztosítva a klinikusok számára a nem együttműködő betegek azonosítására és a célzott beavatkozási lépések megtervezésére. Ez különösen releváns lehet krónikus kardiovaszkuláris betegségekben, mint a hipertónia vagy a szívelégtelenség, ahol a hosszú távú ACE-gátló kezelés esszenciális az optimális betegség kontroll eléréséhez.

A módszer robusztus, interferenciamentes jellege ugyanakkor új diagnosztikai perspektívákat is nyithat az adherencia monitorozáson túl. Mivel az uACE-aktivitás egyszerre tükrözi az enzimatisz tulajdonságokat és a renális kiválasztási mechanizmusokat, a módszer

potenciális biomarkerként szolgálhat tubuláris vesekárosodás (11,12), vesegyulladás és vese szarkoidózis (125) diagnosztizálásában, vagy lokális RAAS folyamatok vizsgálatában. Hosszú távon ezen alkalmazások jelenthetik eredményeink klinikailag legjelentősebb felhasználási területeit.

Kutatásaink eredményeként kifejlesztésre került két, mindennapi klinikai alkalmazásra kész, azonos elvek mentén működő biokémiai esszé, amelyek az angiotenzin-konvertáló enzim sokszínű fiziológiás szerepén, pathológiák fennállása esetén történő aktivitás változásán és iatrogén befolyásolhatóságán alapulnak. A kifejlesztésig vezető út során rámutattunk több, mérést és eredmény értelmezést befolyásoló preanalitikai tényezőre, analitikát befolyásoló interferenciára és interpretatív posztanalitikai hiányosságra, lehetőségre. Igazoltuk a laboratóriumi medicina központi szerepét a RAAS rendszerhez fűződő diagnosztikai és terápiás területeken, valamint esszéinkkel a klinikusi döntéshozást több területen közvetlenül támogató laboratóriumi eszközöket hoztunk létre.

Elért eredményeink megfelelő kontextusba helyezéséhez végül elengedhetetlen a felmerülő korlátok áttekintése. Ezek ismerete elejét veszi a betegbiztonságot veszélyeztető alkalmazásoknak és kiindulópontot jelent a téma további kutatásához.

A szarkoidózis diagnosztikában alkalmazott esszé esetében a szérumminta minősége nem elhanyagolható tényező. A minta hemolízise a bazális ACE-aktivitás alábecsléséhez vezet (87), és mesterségesen növeli a mért gátlás mértékét. Ennek kiküszöbölésére valamennyi szérumminta kvalitatív módon történő elemzése javasolt szérumindexek alkalmazásával (87). Jelentős interferencia esetén az ACE-aktivitás meghatározás elutasítása indokolt. Vizsgálatunk során ezen elvek mentén eljárva, hemolizált minták nem kerültek bevonásra. Továbbá a szabad szulfhidrilcsoportot tartalmazó ACE-gátlók (például a kaptopril) esetében elhúzódó tárolás (hetek, hónapok) során a gyógyszer dimerizációja és a szulfhidrilcsoport oxidációja várható, ami az ACE-gátló hatás elvesztéséhez vezethet (126,127). Ennek következtében az ilyen típusú ACE-gátlókat tartalmazó minták esetében in vitro a gátlás mértékének lassú csökkenésével lehet számolni. Az általunk vizsgált betegpopulációban egyetlen személy sem volt ilyen típusú terápián, ám más betegcsoportok esetén indokolt a jelenséggel számolni.

Az ACE inszerció/delécio (ACE I/D) polimorfizmus ismerten az egyének közötti, fiziológiás körülmények között mért szérum ACE-aktivitás variabilitásának mintegy 60%-áért felelős (87). Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy ez a polimorfizmus a vese ACE fehérje-expresszióját is befolyásolja (128), azonban az uACE-aktivításra gyakorolt hatását eddig nem tanulmányozták részletesen. Egészséges egyénekből álló kohorszunkban jelentős variabilitást

figyeltünk meg az uACE-aktivításban (0,15–1,10 U/L tartományban), ami részben az I/D genotípus különbségeivel is magyarázható lehet. Ennek alapján a későbbiekben az uACE-aktivitás referencia-tartományainak meghatározásakor megfontolandó a beteg I/D genotípusának figyelembevétele, hasonlóan a szérum ACE-aktivitás értelmezésében alkalmazott gyakorlathoz (87).

Az uACE-aktivitást számos zavaró tényező befolyásolja (étrendi hatások, életkor, vesefunkció, vizelethígulás, endogén inhibitorok), amelyek korlátozzák megbízhatóságát önálló ACE-gátló adherencia biomarkerként. Alkalmazása kizárólagosság helyett - más biomarkerekhez hasonlóan - kontextusba helyezve, az anamnézis, a fizikális vizsgálat és más laboratóriumi eredmények figyelembevételével ajánlott.

Az uACE pontos celluláris eredete nem tisztázott. Bár a proximális tubulusból történő leválás valószínűsíthető, plazmaeredetű ACE is hozzájárulhat, különösen kóros állapotokban. Ennek tisztázásához további vizsgálatokra, így plazma-vizelet korrelációs elemzésekre és részletes biokémiai karakterizálásra van szükség.

Az uACE-aktivitás fagyasztás során elveszik, ami további biokémiai vizsgálatokat tesz szükségessé, és korlátozhatja a módszer szélesebb körű kutatási alkalmazhatóságát.

Végül a viszonylag kis esetszám hangsúlyozza nagyobb, célzott vizsgálatok szükségességét az uACE-aktivitás fiziológiás referencia-tartományainak meghatározásához, valamint diagnosztikai értékének feltárásához különböző kórállapotokban.

8. ÚJ EREDMÉNYEK

A PhD értekezésemben, illetve az annak alapjául szolgáló közleményekben új eredményekként mutattuk ki, hogy:

1. A hagyományos, diagnosztikai célból alkalmazott, 35-szörös hígításon mért szérumban ACE-aktivitás önmagában nem alkalmas az ACE-gátló gyógyszerhatás megbízható felismerésére, mivel az ACE-gátlót szedő és nem szedő betegek aktivitásértékei jelentősen átfednek. Ezzel szemben a 4-szeres és 400-szoros hígítású mintákból számított ACE-gátlási arány egyetlen szérummintából, klinikai gyógyszerelési adatok nélkül is objektíven jelzi az ACE-gátló hatást.
2. A vizsgált kohorszban (n=1823) a betegek mintegy 16,6%-ában mutattunk ki ACE-gátló interferenciára utaló biokémiai evidenciát, ami a diagnosztikai célú ACE-aktivitás meghatározás során számottevő gyakoriságú, klinikai döntéshozatalt is befolyásoló zavaró tényezőre utal.
3. A vizeletben jelen lévő endogén uACE-inhibitorok gátló hatása a <5 kDa molekulatömegű kismolekulákhoz köthető. Az urea, a húgysav és az urobilinogén az uACE fiziológias endogén inhibitorai, amelyek a fiziológias tartományban is hozzájárulnak a gátláshoz, kóros koncentrációknál pedig a gátlás fokozódhat.
4. A hígítás alapú fluoreszcens kinetikus uACE esszé az endogén inhibitor hatás kiküszöbölésével lehetővé teszi az uACE-aktivitás kvantitatív meghatározását. Igazoltuk, hogy az uACE-aktivitás fagyasztás-felolvasztás hatására megszűnhet, valamint szoros korrelációt mutat a vizelet kreatinin koncentrációval.
5. Az uACE/kreatinin hányados ACE-gátló kezelés hatására szignifikánsan csökken, így potenciális nem invazív indikátorként alkalmazható az ACE-gátló adherencia becslésének támogatására.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

Az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) különleges helyet foglal el a klinikai gyakorlatban. A szarkoidózis legszélesebb körben alkalmazott szérumbiomarkere, vizeletben mért aktivitása pedig különböző vesekárosodások potenciális jelzője lehet. Ezzel párhuzamosan a kardiovaszkuláris betegségek kezelésében alkalmazott reverzibilis gátló gyógyszerek elsődleges terápiás célpontja, továbbá az enzimaktivitást mind szérumban, mind vizeletben endogén inhibitorok befolyásolják. Ezen exogén és endogén hatások a laboratóriumi eredmények félrevezető értelmezéséhez vezethetnek.

Célunk olyan biokémiai módszerek kidolgozása volt, amelyek képesek az ACE-aktivitás mérését befolyásoló interferenciák objektív felismerésére vagy kiküszöbölésére, ezáltal javítva a biomarkerek klinikai értékét.

Igazoltuk, hogy a hagyományos, 35-szörös hígításon mért szérumban ACE-aktivitás nem alkalmas az ACE-gátló gyógyszerhatás felismerésére, mivel a kezelt és nem kezelt betegek értékei jelentősen átfednek. Kimutattuk, hogy a 4-szeres és 400-szoros hígításokon mért aktivitásokból számított ACE-gátlási arány egyetlen szérummintából, klinikai gyógyszerelési adatok nélkül is objektíven jelzi az ACE-gátló hatást. A módszer alkalmazásával 1823 szarkoidózis gyanúja miatt vizsgált beteg mintegy 17%-ában találtunk biokémiai bizonyítékot gyógyszerinterferenciára, ami a probléma korábban feltételezettnél nagyobb jelentőségére utal.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a vizelet ACE-aktivitását elfedő endogén inhibitorok <5 kDa molekulatömegűek, reverzibilis gátlószerek, és fő komponensekként az ureát, a húgysavat és az urobilinogént azonosítottuk. Ezekre az eredményekre alapozva kidolgoztunk egy hígítás alapú fluoreszcens kinetikus esszét, amely az endogén inhibitor hatás kiküszöbölésével lehetővé teszi az uACE-aktivitás kvantitatív mérését. Meghatároztuk a mérés preanalitikai feltételeit, kimutattuk, hogy az enzim aktivitása fagyasztás hatására megszűnik, valamint alátámasztottuk a kreatininre történő normalizálás indokoltságát.

Klinikai mintákban igazoltuk, hogy az uACE/kreatinin hányados ACE-gátló kezelés mellett szignifikánsan alacsonyabb, így az non-invazív indikátora lehet a farmakológiai gyógyszerhatásnak és a terápia adherenciának.

Eredményeink rámutatnak, hogy az enzimaktivitás alapú biomarkerek értelmezhetőségét alapvetően a mérési körülmények és interferenciák ismerete határozza meg. Megfelelő analitikai stratégia alkalmazásával ezen biomarkerek diagnosztikai hozzáadott értéke és klinikai haszna érdemben növelhető.

10. SUMMARY

Angiotensin-converting enzyme (ACE) holds a distinct role in clinical practice. It represents the most widely used serum biomarker of sarcoidosis, and its urinary activity may serve as a potential indicator of various renal injuries. At the same time, the enzyme is the primary therapeutic target of the reversible ACE inhibitors used in the treatment of cardiovascular diseases, and its enzymatic activity is influenced by endogenous inhibitors in both serum and urine. These exogenous and endogenous effects may lead to misleading interpretation of laboratory results.

Our aim was to develop biochemical methods capable of objectively identifying or eliminating interferences affecting ACE-activity measurements, thereby improving the clinical applicability of the biomarkers.

We demonstrated that conventional serum ACE-activity measurement at 35-fold dilution is unsuitable for recognizing ACE inhibitor drug effects, as values of treated and untreated patients substantially overlap. We showed that the ACE inhibition ratio calculated from activities measured at 4-fold and 400-fold dilutions objectively indicates ACE inhibitor effect from a single serum sample, even without clinical medication data. Using this method, biochemical evidence of drug interference was detected in approximately 16.6% of 1823 patients investigated for suspected sarcoidosis, suggesting a greater magnitude of the problem than previously assumed.

We further demonstrated that endogenous inhibitors masking urinary ACE-activity are reversible, <5 kDa molecules, and identified urea, uric acid and urobilinogen as principal components. Based on these findings, we developed a dilution-based fluorescent kinetic assay enabling quantitative measurement of uACE-activity by eliminating endogenous inhibitory effects. We established the preanalytical conditions of measurement, showed that enzymatic activity is abolished by freezing, and substantiated the rationale for normalization to creatinine concentration.

In clinical samples, uACE to creatinine ratio proved significantly lower during ACE inhibitor therapy, indicating its potential as a non-invasive marker of pharmacological drug effect and therapy adherence.

Our results demonstrate that the interpretability of enzyme activity-based biomarkers fundamentally depends on the recognition of measurement conditions and interferences. With appropriate analytical strategies, their diagnostic added value and clinical usefulness can be substantially improved.

11. IRODALOMJEGYZÉK

11.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Jain R, Yadav D, Puranik N, Guleria R, Jin JO. Sarcoidosis: Causes, Diagnosis, Clinical Features, and Treatments. *J Clin Med*. 2020 Apr 10;9(4):1081. doi:10.3390/jcm9041081
2. Melani AS, Simona A, Armati M, d'Alessandro M, Bargagli E. A Comprehensive Review of Sarcoidosis Diagnosis and Monitoring for the Pulmonologist. *Pulm Ther*. 2021 Dec 6;7(2):309–24. doi:10.1007/s41030-021-00161-w
3. Kraaijvanger R, Janssen Bonás M, Vorselaars ADM, Veltkamp M. Biomarkers in the Diagnosis and Prognosis of Sarcoidosis: Current Use and Future Prospects. *Front Immunol*. 2020 Jul 14;11. doi:10.3389/fimmu.2020.01443
4. Messerli FH, Bangalore S, Bavishi C, Rimoldi SF. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in Hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2018 Apr;71(13):1474–82. doi:10.1016/j.jacc.2018.01.058
5. Piepho RW. Overview of the angiotensin-converting-enzyme inhibitors. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2000 Oct 1;57(suppl_1):S3–7. doi:10.1093/ajhp/57.suppl_1.S3
6. d'Alessandro M, Bergantini L, Perrone A, Cameli P, Cameli M, Prasse A, et al. Serial investigation of Angiotensin-Converting Enzyme in sarcoidosis patients treated with Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor. *Eur J Intern Med*. 2020 Aug;78:58–62. doi:10.1016/j.ejim.2020.04.006
7. Krasowski MD, Savage J, Ehlers A, Maakestad J, Schmidt GA, La'ulu S, et al. Ordering of the Serum Angiotensin-Converting Enzyme Test in Patients Receiving Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Therapy. *Chest*. 2015 Dec;148(6):1447–53. doi:10.1378/chest.15-1061
8. Klauser RJ, Robinson CJ, Marinkovic D V, Erdös EG. Inhibition of human peptidyl dipeptidase (angiotensin I converting enzyme: kininase II) by human serum albumin and its fragments. *Hypertension*. 1979 May;1(3):281–6. doi:10.1161/01.HYP.1.3.281
9. Fagyas M, Úri K, Siket IM, Daragó A, Boczán J, Bányai E, et al. New Perspectives in the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) I: Endogenous Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibition. *PLoS One*. 2014 Apr 1;9(4):e87843. doi:10.1371/journal.pone.0087843

10. Ryan JW, Martin LC, Chung A, Pena GA. Mammalian inhibitors of angiotensin converting enzyme (kininase II). *Adv Exp Med Biol.* 1979;120B:599–606. PubMed PMID: 229713.
11. Hosojima H, Miyauchi E, Morimoto S. Urinary Excretion of Angiotensin Converting Enzyme in NIDDM Patients With Nephropathy. *Diabetes Care.* 1989 Sep 1;12(8):580–2. doi:10.2337/diacare.12.8.580
12. Kato I, Takada Y, Nishimura K, Hiwada K, Kokubu T. Increased Urinary Excretion of Angiotensin Converting Enzyme in Patients with Renal Diseases. *cclm.* 1982;20(7):473–6. doi:10.1515/cclm.1982.20.7.473
13. Pfeffer MA, Braunwald E, Moyé LA, Basta L, Brown EJ, Cuddy TE, et al. Effect of Captopril on Mortality and Morbidity in Patients with Left Ventricular Dysfunction after Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine.* 1992 Sep 3;327(10):669–77. doi:10.1056/NEJM199209033271001
14. Crowley SD, Gurley SB, Oliverio MI, Pazmino AK, Griffiths R, Flannery PJ, et al. Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. *Journal of Clinical Investigation.* 2005 Apr 1;115(4):1092–9. doi:10.1172/JCI23378
15. Tigerstedt R, Bergman PQ. Niere und Kreislauf. *Skand Arch Physiol.* 1898 Jan 13;8(1):223–71. doi:10.1111/j.1748-1716.1898.tb00272.x
16. Page IH, Helmer OM. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *Journal of Experimental Medicine.* 1940 Jan 1;71(1):29–42. doi:10.1084/jem.71.1.29
17. Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Muñoz JM. The substance causing renal hypertension. *J Physiol.* 1940 Jul 24;98(3):283–98. doi:10.1113/jphysiol.1940.sp003850
18. Simpson SA, Tait JF, Wettstein A, Neher R, v. Euw J, Reichstein T. Isolation from the adrenals of a new crystalline hormone with especially high effectiveness on mineral metabolism. *Experientia.* 1953 Sep;9(9):333–5. doi:10.1007/BF02155834
19. Skeggs LT, Marsh WH, Kahn JR, Shumway NP. The existence of two forms of hypertensin. *Journal of Experimental Medicine.* 1954 Mar 1;99(3):275–82. doi:10.1084/jem.99.3.275
20. Skeggs LT, Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med.* 1956 Mar 1;103(3):295–9. doi:10.1084/jem.103.3.295

21. Skeggs LT, Kahn JR, Lentz K, Shumway NP. The preparation, purification, and amino acid sequence of a polypeptide renin substrate. *J Exp Med*. 1957 Sep 1;106(3):439–53. doi:10.1084/jem.106.3.439
22. Gross F. Control of aldosterone secretion by the renin-angiotensin system and by corticotropin. *Adv Intern Med*. 1968;14:281–339. PubMed PMID: 4303034.
23. Triebel H, Castrop H. The renin angiotensin aldosterone system. *Pflugers Arch*. 2024 May 17;476(5):705–13. doi:10.1007/s00424-024-02908-1
24. Kim SM, Briggs JP, Schnermann J. Convergence of major physiological stimuli for renin release on the Gs-alpha/cyclic adenosine monophosphate signaling pathway. *Clin Exp Nephrol*. 2012 Feb 1;16(1):17–24. doi:10.1007/s10157-011-0494-1
25. Erdös EG. Angiotensin I converting enzyme. *Circ Res*. 1975 Feb;36(2):247–55. doi:10.1161/01.RES.36.2.247
26. Erdös EG. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. *Hypertension*. 1990 Oct;16(4):363–70. doi:10.1161/01.HYP.16.4.363
27. Koumallos N, Sigala E, Milas T, Baikoussis NG, Aragiannis D, Sideris S, et al. Angiotensin Regulation of Vascular Homeostasis: Exploring the Role of ROS and RAS Blockers. *Int J Mol Sci*. 2023 Jul 28;24(15):12111. doi:10.3390/ijms241512111
28. Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, Coffman TM, Kawai T, Rizzo V, et al. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev*. 2018 Jul 1;98(3):1627–738. doi:10.1152/physrev.00038.2017
29. Chow BSM, Allen TJ. Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) in renal and cardiovascular disease. *Clin Sci*. 2016 Aug 1;130(15):1307–26. doi:10.1042/CS20160243
30. Padia SH, Kemp BA, Howell NL, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Carey RM. Conversion of Renal Angiotensin II to Angiotensin III Is Critical for AT2 Receptor–Mediated Natriuresis In Rats. *Hypertension*. 2008 Feb;51(2):460–5. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.103242
31. Alghamri MS, Morris M, Meszaros JG, Elased KM, Grobe N. Novel role of aminopeptidase-A in angiotensin-(1–7) metabolism post myocardial infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2014 Apr 1;306(7):H1032–40. doi:10.1152/ajpheart.00911.2013

32. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med.* 2008 Sep 8;264(3):224–36. doi:10.1111/j.1365-2796.2008.01981.x
33. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme–Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000 Sep;87(5). doi:10.1161/01.RES.87.5.e1
34. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A Human Homolog of Angiotensin-converting Enzyme. *Journal of Biological Chemistry.* 2000 Oct;275(43):33238–43. doi:10.1074/jbc.M002615200
35. Zhong J, Basu R, Guo D, Chow FL, Byrns S, Schuster M, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Suppresses Pathological Hypertrophy, Myocardial Fibrosis, and Cardiac Dysfunction. *Circulation.* 2010 Aug 17;122(7):717–28. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.955369
36. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, et al. G-Protein–Coupled Receptor Mas Is a Physiological Antagonist of the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Circulation.* 2005 Apr 12;111(14):1806–13. doi:10.1161/01.CIR.0000160867.23556.7D
37. Ahmad H, Khan H, Haque S, Ahmad S, Srivastava N, Khan A. Angiotensin-Converting Enzyme and Hypertension: A Systemic Analysis of Various ACE Inhibitors, Their Side Effects, and Bioactive Peptides as a Putative Therapy for Hypertension. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System.* 2023 Jan 21;2023. doi:10.1155/2023/7890188
38. Petrov MN, Shilo VY, Tarasov AV., Schwartz DE, Garcia JGN, Kost OA, et al. Conformational Changes of Blood ACE in Chronic Uremia. *PLoS One.* 2012 Nov 16;7(11):e49290. doi:10.1371/journal.pone.0049290
39. Skidgel RA, Engelbrecht S, Johnson AR, Erdös EG. Hydrolysis of substance P and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides (NY).* 1984 Jul;5(4):769–76. doi:10.1016/0196-9781(84)90020-2
40. Ehlers MR, Abrie JA, Sturrock ED. C domain-selective inhibition of angiotensin-converting enzyme. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System.* 2013 Jun 17;14(2):189–92. doi:10.1177/1470320313489206
41. Hornig B, Kohler C, Drexler H. Role of Bradykinin in Mediating Vascular Effects of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in Humans. *Circulation.* 1997 Mar 4;95(5):1115–8. doi:10.1161/01.CIR.95.5.1115

42. Alhenc-Gelas F, Bouby N, Girolami JP. Kallikrein/K1, Kinins, and ACE/Kininase II in Homeostasis and in Disease Insight From Human and Experimental Genetic Studies, Therapeutic Implication. *Front Med (Lausanne)*. 2019 Jun 27;6. doi:10.3389/fmed.2019.00136
43. Coates D. The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int J Biochem Cell Biol*. 2003 Jun;35(6):769–73. doi:10.1016/S1357-2725(02)00309-6
44. Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem*. 1991 Aug 15;266(23):15377–83. PubMed PMID: 1651327.
45. Howard TE, Shai SY, Langford KG, Martin BM, Bernstein KE. Transcription of Testicular Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Is Initiated within the 12th Intron of the Somatic ACE Gene. *Mol Cell Biol*. 1990 Aug 1;10(8):4294–302. doi:10.1128/mcb.10.8.4294-4302.1990
46. Kregge JH, John SWM, Langenbach LL, Hodgins JB, Hagaman JR, Bachman ES, et al. Male–female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature*. 1995 May;375(6527):146–8. doi:10.1038/375146a0
47. Wei L, Alhenc-Gelas F, Corvol P, Clauser E. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J Biol Chem*. 1991 May 15;266(14):9002–8. PubMed PMID: 1851160.
48. Wei L, Clauser E, Alhenc-Gelas F, Corvol P. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors. *J Biol Chem*. 1992 Jul 5;267(19):13398–405. PubMed PMID: 1320019.
49. O'Neill HG, Redelinghuys P, Schwager SLU, Sturrock ED. The role of glycosylation and domain interactions in the thermal stability of human angiotensin-converting enzyme. *bchm*. 2008 Sep 1;389(9):1153–61. doi:10.1515/BC.2008.131
50. Metzger R, Franke FE, Bohle RM, Alhenc-Gelas F, Danilov SM. Heterogeneous distribution of angiotensin I-converting enzyme (CD143) in the human and rat vascular systems: Vessel, organ and species specificity. *Microvasc Res*. 2011 Mar;81(2):206–15. doi:10.1016/j.mvr.2010.12.003
51. Caldwell PRB, Seegal BC, Hsu KC, Das M, Soffer RL. Angiotensin-Converting Enzyme: Vascular Endothelial Localization. *Science (1979)*. 1976 Mar 12;191(4231):1050–1. doi:10.1126/science.175444

52. Bruneval P, Hinglais N, Alhenc-Gelas F, Tricottet V, Corvol P, Menard J, et al. Angiotensin I converting enzyme in human intestine and kidney. *Histochemistry*. 1986;85(1):73–80. doi:10.1007/BF00508656
53. Kozuch AJ, Petukhov PA, Fagyas M, Popova IA, Lindeblad MO, Bobkov AP, et al. Urinary ACE Phenotyping as a Research and Diagnostic Tool: Identification of Sex-Dependent ACE Immunoreactivity. *Biomedicines*. 2023 Mar 20;11(3):953. doi:10.3390/biomedicines11030953
54. Defending R, Zimmerman EA, Weare JA, Alhenc-Gelas F, Erdös EG. Angiotensin-Converting Enzyme in Epithelial and Neuroepithelial Cells. *Neuroendocrinology*. 1983;37(1):32–40. doi:10.1159/000123512
55. Weinstock J V. The significance of angiotensin I converting enzyme in granulomatous inflammation. Functions of ACE in granulomas. *Sarcoidosis*. 1986 Mar;3(1):19–26. PubMed PMID: 3033785.
56. Schulz WW, Hagler HK, Buja LM, Erdös EG. Ultrastructural localization of angiotensin I-converting enzyme (EC 3.4.15.1) and neutral metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11) in the proximal tubule of the human kidney. *Lab Invest*. 1988 Dec;59(6):789–97. PubMed PMID: 2848979.
57. Metzger R, Bohle RM, Pauls K, Eichner G, Alhenc-Gelas F, Danilov SM, et al. Angiotensin-converting enzyme in non-neoplastic kidney diseases. *Kidney Int*. 1999 Oct;56(4):1442–54. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00660.x
58. Alhenc-Gelas F, Baussant T, Hubert C, Soubrier F, Corvol P. The angiotensin converting enzyme in the kidney. *J Hypertens*. 1989 Sep;7:S9–14. doi:10.1097/00004872-198909007-00003
59. Wei L, Alhenc-Gelas F, Soubrier F, Michaud A, Corvol P, Clauser E. Expression and characterization of recombinant human angiotensin I-converting enzyme. Evidence for a C-terminal transmembrane anchor and for a proteolytic processing of the secreted recombinant and plasma enzymes. *J Biol Chem*. 1991 Mar 25;266(9):5540–6. PubMed PMID: 1848554.
60. Oppong SY, Hooper NM. Characterization of a secretase activity which releases angiotensin-converting enzyme from the membrane. *Biochemical Journal*. 1993 Jun 1;292(2):597–603. doi:10.1042/bj2920597

61. Kokubu T, Kato I, Nishimura K, Hiwada K, Ueda E. Angiotensin I-converting enzyme in human urine. *Clinica Chimica Acta*. 1978 Nov;89(3):375–9. doi:10.1016/0009-8981(78)90398-4
62. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *Journal of Clinical Investigation*. 1990 Oct 1;86(4):1343–6. doi:10.1172/JCI114844
63. Ungprasert P, Carmona EM, Utz JP, Ryu JH, Crowson CS, Matteson EL. Epidemiology of Sarcoidosis 1946-2013. *Mayo Clin Proc*. 2016 Feb;91(2):183–8. doi:10.1016/j.mayocp.2015.10.024
64. Gerke AK. Treatment of Sarcoidosis: A Multidisciplinary Approach. *Front Immunol*. 2020 Nov 19;11. doi:10.3389/fimmu.2020.545413
65. Beghè D, Dall'Asta L, Garavelli C, Pastorelli AA, Muscarella M, Sacconi G, et al. Sarcoidosis in an Italian province. Prevalence and environmental risk factors. *PLoS One*. 2017 May 5;12(5):e0176859. doi:10.1371/journal.pone.0176859
66. Arkema E V., Grunewald J, Kullberg S, Eklund A, Askling J. Sarcoidosis incidence and prevalence: a nationwide register-based assessment in Sweden. *European Respiratory Journal*. 2016 Dec;48(6):1690–9. doi:10.1183/13993003.00477-2016
67. Yoon HY, Kim HM, Kim YJ, Song JW. Prevalence and incidence of sarcoidosis in Korea: a nationwide population-based study. *Respir Res*. 2018 Dec 28;19(1):158. doi:10.1186/s12931-018-0871-3
68. Iannuzzi MC, Rybicki BA, Teirstein AS. Sarcoidosis. *New England Journal of Medicine*. 2007 Nov 22;357(21):2153–65. doi:10.1056/NEJMra071714
69. Baughman RP, Teirstein AS, Judson MA, Rossman MD, Yeager H, Bresnitz EA, et al. Clinical Characteristics of Patients in a Case Control Study of Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Nov 15;164(10):1885–9. doi:10.1164/ajrccm.164.10.2104046
70. Li Y, Xu G. Diagnostic Value of Imaging and Serological Biomarkers in Pulmonary Sarcoidosis. *Adv Respir Med*. 2024 Apr 28;92(3):190–201. doi:10.3390/arm92030020
71. Jara-Palomares L, Caballero-Eraso C, Gutierrez C, Donate A, Antonio J. Clinical Manifestations of Sarcoidosis. In: *Sarcoidosis*. InTech; 2013. doi:10.5772/55556
72. Watanabe K. Physiological Manifestation in Pulmonary Sarcoidosis. In: *Sarcoidosis*. InTech; 2013. doi:10.5772/55012

73. Sève P, Pacheco Y, Durupt F, Jamilloux Y, Gerfaud-Valentin M, Isaac S, et al. Sarcoidosis: A Clinical Overview from Symptoms to Diagnosis. *Cells*. 2021 Mar 31;10(4):766. doi:10.3390/cells10040766
74. Requena L, Requena C. Erythema nodosum. *Dermatol Online J*. 2002;8(1). doi:10.5070/D34829T6RN
75. Ranawaka RR., Kannangara AP., Karawita Ajith. Atlas of dermatoses in pigmented skin. Springer; 2021.
76. Marchell RM., Judson MA. Chronic cutaneous lesions of sarcoidosis. *Clin Dermatol*. 2007 May;25(3):295–302. doi:10.1016/j.clindermatol.2007.03.007
77. Costabel U, Hunninghake GW, on behalf of the Sarcoidosis Statement Committee. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. *European Respiratory Journal*. 1999 Oct;14(4):735. doi:10.1034/j.1399-3003.1999.14d02.x
78. Crouser ED, Maier LA, Wilson KC, Bonham CA, Morgenthau AS, Patterson KC, et al. Diagnosis and Detection of Sarcoidosis. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Apr 15;201(8):e26–51. doi:10.1164/rccm.202002-0251ST
79. Thillai M, Atkins CP, Crawshaw A, Hart SP, Ho LP, Kouranos V, et al. BTS Clinical Statement on pulmonary sarcoidosis. *Thorax*. 2021 Jan;76(1):4–20. doi:10.1136/thoraxjnl-2019-214348
80. Drent M, Crouser ED, Grunewald J. Challenges of Sarcoidosis and Its Management. *New England Journal of Medicine*. 2021 Sep 9;385(11):1018–32. doi:10.1056/NEJMr2101555
81. Derveaux L, Demedts M, Lijnen P, Amery A. Plasma angiotensin converting enzyme in the diagnosis and monitoring of disease activity in sarcoidosis. *Eur J Respir Dis*. 1983 Apr;64(3):197–206. PubMed PMID: 6301869.
82. Kawai H, Naruse H, Sarai M, Kato Y, Sato Y, Takahashi H, et al. Serum Angiotensin-Converting Enzyme Levels Indicating Early Sarcoidosis Diagnosis and Immunosuppressive Therapy Efficacy. *ESC Heart Fail*. 2023 Jun 1;10(3):1803–10. doi:10.1002/ehf2.14343
83. Vorselaars ADM, van Moorsel CHM, Zanen P, Ruven HJT, Claessen AME, van Velzen-Blad H, et al. ACE and sIL-2R correlate with lung function improvement in sarcoidosis during methotrexate therapy. *Respir Med*. 2015 Feb;109(2):279–85. doi:10.1016/j.rmed.2014.11.009

84. Chopra A, Kalkanis A, Judson MA. Biomarkers in sarcoidosis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2016 Nov 27;12(11):1191–208. doi:10.1080/1744666X.2016.1196135
85. Maguire GA, Price CP. A Continuous Monitoring Spectrophotometric Method for the Measurement of Angiotensin-Converting Enzyme in Human Serum. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*. 1985 Mar 1;22(2):204–10. doi:10.1177/000456328502200218
86. Buttery JE, Stuart S. Assessment and optimization of kinetic methods for angiotensin-converting enzyme in plasma. *Clin Chem*. 1993 Feb;39(2):312–6. PubMed PMID: 8381734.
87. Csongrádi A, Enyedi A, Takács I, Végh T, Mányiné IS, Pólik Z, et al. Optimized angiotensin-converting enzyme activity assay for the accurate diagnosis of sarcoidosis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2018 Jun 27;56(7):1117–25. doi:10.1515/cclm-2017-0837
88. Mahmoudpour SH, Baranova EV, Souverein PC, Asselbergs FW, de Boer A, Maitland-van der Zee AH. Determinants of angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEI) intolerance and angioedema in the UK Clinical Practice Research Datalink. *Br J Clin Pharmacol*. 2016 Dec 4;82(6):1647–59. doi:10.1111/bcp.13090
89. Cutrell S, Alhomoud IS, Mehta A, Talasaz AH, Van Tassell B, Dixon DL. ACE-Inhibitors in Hypertension: A Historical Perspective and Current Insights. *Curr Hypertens Rep*. 2023 Sep 7;25(9):243–50. doi:10.1007/s11906-023-01248-2
90. Kostis WJ, Shetty M, Chowdhury YS, Kostis JB. ACE Inhibitor-Induced Angioedema: a Review. *Curr Hypertens Rep*. 2018 Jul 8;20(7):55. doi:10.1007/s11906-018-0859-x
91. Brown NJ, Vaughan DE. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. *Circulation*. 1998 Apr 14;97(14):1411–20. doi:10.1161/01.CIR.97.14.1411
92. Hara H, Takeda N, Komuro I. Pathophysiology and therapeutic potential of cardiac fibrosis. *Inflamm Regen*. 2017 Dec 17;37(1):13. doi:10.1186/s41232-017-0046-5
93. Ferreira SH. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of bothrops jararaca. *Br J Pharmacol Chemother*. 1965 Feb 19;24(1):163–9. doi:10.1111/j.1476-5381.1965.tb02091.x
94. DiBianco R. Adverse Reactions with Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitors. *Med Toxicol*. 1986 Apr 27;1(2):122–41. doi:10.1007/BF03259832
95. Sobhy M, Eletriby A, Ragy H, Kandil H, Saleh MA, Farag N, et al. ACE Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers for the Primary and Secondary Prevention of

- Cardiovascular Outcomes: Recommendations from the 2024 Egyptian Cardiology Expert Consensus in Collaboration with the CVREP Foundation. *Cardiol Ther.* 2024 Dec 25;13(4):707–36. doi:10.1007/s40119-024-00381-6
96. Thomson A, Greenacre M. Perindopril: the evidence of its therapeutic impact in hypertension. *Core Evid.* 2007 Mar 31;2(1):63–79. PubMed PMID: 21221198.
 97. Fuller RW, Choudry NB. Increased cough reflex associated with angiotensin converting enzyme inhibitor cough. *BMJ.* 1987 Oct 24;295(6605):1025–6. doi:10.1136/bmj.295.6605.1025-a
 98. Bucknall CE, Neilly JB, Carter R, Stevenson RD, Semple PF. Bronchial hyperreactivity in patients who cough after receiving angiotensin converting enzyme inhibitors. *BMJ.* 1988 Jan 9;296(6615):86–8. doi:10.1136/bmj.296.6615.86
 99. Bas M, Hoffmann TK, Tiemann B, Dao VT, Bantis C, Balz V, et al. Potential genetic risk factors in angiotensin-converting enzyme-inhibitor-induced angio-oedema. *Br J Clin Pharmacol.* 2010 Feb 21;69(2):179–86. doi:10.1111/j.1365-2125.2009.03567.x
 100. Majd Z, Mohan A, Johnson ML, Essien EJ, Barner JC, Serna O, et al. Patient-Reported Barriers to Adherence Among ACEI/ARB Users from a Motivational Interviewing Telephonic Intervention. *Patient Prefer Adherence.* 2022 Oct;Volume 16:2739–48. doi:10.2147/PPA.S360461
 101. Wawruch M, Petrova M, Tesar T, Murin J, Schnorrerova P, Paduchova M, et al. Factors associated with non-adherence to angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in older patients with peripheral arterial disease. *Front Pharmacol.* 2023 Aug 10;14. doi:10.3389/fphar.2023.1199669
 102. Vaz Fragoso CA, McAvay GJ. Antihypertensive medications and physical function in older persons. *Exp Gerontol.* 2020 Sep;138:111009. doi:10.1016/j.exger.2020.111009
 103. Baudin B, Bénétteau-Burnat B, Baumann FCh, Giboudeau J. A Reliable Radiometric Assay for the Determination of Angiotensin I-Converting Enzyme Activity in Urine. *Clin Chem Lab Med.* 1990;28(11). doi:10.1515/cclm.1990.28.11.857
 104. Tóth A, Fagyas M, Papp Z, Édes I. Dilution based inhibition assay. Hungary: European Patent Office. 2018;2664920:35.
 105. Salvador G LO, Marmentini VM, Cosmo WR, Junior EL. Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce mortality compared to angiotensin receptor blockers: Systematic review and meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol.* 2017 Dec;24(18):1914–24. doi:10.1177/2047487317728766

106. Roulston JE, MacGregor GA. The measurement of angiotensin-converting enzyme in subjects receiving captopril. *N Engl J Med.* 1980 Aug 14;303(7):397. doi:10.1056/NEJM198008143030717 PubMed PMID: 6248782.
107. Kamoun PP, Bardet JL, Di Giulio S, Grunfeld JP. Measurements of angiotensin converting enzyme in captopril-treated patients. *Clinica Chimica Acta.* 1982 Feb;118(2–3):333–6. doi:10.1016/0009-8981(82)90021-3
108. Lieberman J, Zakria F. Effect of captopril and enalapril medication on the serum ACE test for sarcoidosis. *Sarcoidosis.* 1989 Sep;6(2):118–23. PubMed PMID: 2557660.
109. Lijnen P, Staessen J, Amery A. Assay of plasma angiotensin-converting enzyme activity in captopril-treated subjects. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1982;4(6):413–5. PubMed PMID: 6292595.
110. Hamlin R, Pijpers FS, Mandigers PJJ. Plasma ACE Inhibition by Five Different ACE Inhibitors. *Veterinary Quarterly.* 1998 Jan;20(sup1):S109–S109. doi:10.1080/01652176.1998.10807453
111. Kelly JG, O'Malley K. Clinical Pharmacokinetics of the Newer ACE Inhibitors. *Clin Pharmacokinet.* 1990 Sep;19(3):177–96. doi:10.2165/00003088-199019030-00003
112. Shaw TR, Duncan FM, Williams BC, Crichton E, Thomson SA, Davis JR, et al. Plasma free captopril concentrations during short and long term treatment with oral captopril for heart failure. *Heart.* 1985 Aug 1;54(2):160–5. doi:10.1136/hrt.54.2.160
113. Fagyas M, Úri K, Siket IM, Fülöp GÁ, Csató V, Daragó A, et al. New Perspectives in the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) II: Albumin Suppresses Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Activity in Human. *PLoS One.* 2014 Apr 1;9(4):e87844. doi:10.1371/journal.pone.0087844
114. Betraíns A, Vermeersch P, Vanderschueren S. Appropriateness of ordering serum angiotensin-converting enzyme during renin-angiotensin-aldosterone system inhibitor therapy. *Eur J Intern Med.* 2019 Jan;59:e18–9. doi:10.1016/j.ejim.2018.09.018
115. Kelly JG, O'Malley K. Clinical Pharmacokinetics of the Newer ACE Inhibitors. *Clin Pharmacokinet.* 1990 Sep;19(3):177–96. doi:10.2165/00003088-199019030-00003
116. Liu M, Li M, Liu J, Wang H, Zhong D, Zhou H, et al. Elevated urinary urea by high-protein diet could be one of the inducements of bladder disorders. *J Transl Med.* 2016 Dec 16;14(1):53. doi:10.1186/s12967-016-0809-9
117. Prezioso D, Strazzullo P, Lotti T, Bianchi G, Borghi L, Caione P, et al. Dietary treatment of urinary risk factors for renal stone formation. A review of CLU Working Group.

- Archivio Italiano di Urologia e Andrologia. 2015 Jul 7;87(2):105. doi:10.4081/aiua.2015.2.105
118. Bourke E, Milne MD, Stokes GS. Mechanisms of renal excretion of urobilinogen. *BMJ*. 1965 Dec 25;2(5477):1510–4. doi:10.1136/bmj.2.5477.1510
 119. Li M, Cheng A, Sun J, Fan C, Meng R. The role of urinary albumin-to-creatinine ratio as a biomarker to predict stroke. *Brain Circ*. 2021 Jul;7(3):139–46. doi:10.4103/bc.bc_64_20
 120. Tynkevich E, Flamant M, Haymann JP, Metzger M, Thervet E, Boffa JJ, et al. Decrease in Urinary Creatinine Excretion in Early Stage Chronic Kidney Disease. *PLoS One*. 2014 Nov 17;9(11):e111949. doi:10.1371/journal.pone.0111949
 121. Waikar SS, Sabbiseti VS, Bonventre J V. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney Int*. 2010 Sep;78(5):486–94. doi:10.1038/ki.2010.165
 122. Gundersen POM, Helland A, Spigset O, Hegstad S. Quantification of 21 antihypertensive drugs in serum using UHPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2018 Jul;1089:84–93. doi:10.1016/j.jchromb.2018.04.038
 123. Lwin EMP, Gerber C, Song Y, Leggett C, Ritchie U, Turner S, et al. A new LC-MS/MS bioanalytical method for perindopril and perindoprilat in human plasma and milk. *Anal Bioanal Chem*. 2017 Oct 25;409(26):6141–8. doi:10.1007/s00216-017-0552-y
 124. Acharya KR, Sturrock ED, Riordan JF, Ehlers MRW. Ace revisited: A new target for structure-based drug design. *Nat Rev Drug Discov*. 2003 Nov 1;2(11):891–902. doi:10.1038/nrd1227
 125. Chiba Y, Murakami K, Miyazaki M, Makino R, Yoshida M, Nagasawa T, et al. Novel clinical application of urinary angiotensin-converting enzyme assay in renal sarcoidosis: a retrospective observational study. *Clin Exp Nephrol*. 2026 Feb 3. doi:10.1007/s10157-025-02803-8
 126. Drummer OH, Jarrott B. Captopril disulfide conjugates may act as prodrugs: Disposition of the disulfide dimer of captopril in the rat. *Biochem Pharmacol*. 1984 Nov;33(22):3567–71. doi:10.1016/0006-2952(84)90138-2
 127. Souza JAL, Albuquerque MM, Grangeiro S, Pimentel MF, de Santana DP, Simões SS. Quantification of captopril disulphide as a degradation product in captopril tablets using near infrared spectroscopy and chemometrics. *Vib Spectrosc*. 2012 Sep;62:35–41. doi:10.1016/j.vibspec.2012.04.011

128. Mizuiri S, Hemmi H, Kumanomidou H, Iwamoto M, Miyagi M, Sakai K, et al. Angiotensin-converting enzyme (ACE) I/D genotype and renal ACE gene expression. *Kidney Int.* 2001 Sep;60(3):1124–30. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.0600031124.x

11.2. Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/47/2026.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szabó Attila Ádám
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10079909

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További közlemények

3. Enyedi, E. E., **Szabó, A. Á.**, Pintér, T. B., Mányiné Siket, I., Pluhár, A., Váradi, C., Bányai, E., Tóth, A., Papp, Z., Fagyas, M.: Albumin-Bound Fatty Acids Modulate Endogenous Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibition. *Biomedicines*. 14 (1), 1-19, 2026.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines14010103>
IF: 3.9 (2024)





4. Ungvári, A., Gulej, R., Patai, R., Papp, Z., Tóth, A., **Szabó, A. Á.**, Podesser, B. K., Sótónyi, P., Benyó, Z., Yabluchanskiy, A., Tarantini, S., Maier, A. B., Csiszár, A., Ungvári, Z.: Sex-specific mechanisms in vascular aging: exploring cellular and molecular pathways in the pathogenesis of age-related cardiovascular and cerebrovascular diseases.
GeroScience. 47 (1), 301-337, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-024-01489-2>
IF: 5.4 (2024)
5. Tóth, E. L., Orbán-Kálmándi, R. A., Bagoly, Z., Lóczi, L., Deli, T., Török, O., Deliné Molnár, S., Baráth, S., Singh, P., Hevessy, Z., Katona, É., Fagyas, M., **Szabó, A. Á.**, Molnár, S., Krasznai, Z. T.: Case report: Complex evaluation of coagulation, fibrinolysis and inflammatory cytokines in a SARS-CoV-2 infected pregnant woman with fetal loss.
Front. Immunol. 15, 1-10, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2024.1329236>
IF: 5.9
6. Stercel, V., Lóczi, L., Kadenczki, O., Nemes, É., Nagy, B. J., Hodossy-Takács, R., **Szabó, A. Á.**, Fagyas, M., Kappelmayer, J., Szabó, T., Bagoly, Z.: Effect of anti-SARS-CoV-2 BNT162b2 mRNA vaccination on thrombin generation in children with inflammatory bowel disease.
Front. Immunol. 14, 1-12, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2023.1257072>
IF: 5.7
7. Kacsándi, D., Fagyas, M., Horváth, Á., Végh, E., Karancsiné Pusztai, A., Czókolyová, M., Soós, B., **Szabó, A. Á.**, Hamar, A. B., Pethő, Z., Bodnár, N., Kerekes, G., Hódosi, K., Szamosi, S., Szűcs, G., Papp, Z., Szekanecz, Z.: Effect of tofacitinib therapy on angiotensin converting enzyme activity in rheumatoid arthritis.
Front. Med. 10, 1-8, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmed.2023.1226760>
IF: 3.1
8. Nagy, A. C., Majer, R., Boczán, J., Sipka, S. i., **Szabó, A. Á.**, Enyedi, E. E., Tatai, O., Fagyas, M., Papp, Z., Csiba, L., Tóth, A.: Enalapril Is Superior to Lisinopril in Improving Endothelial Function without a Difference in Blood-Pressure-Lowering Effects in Newly Diagnosed Hypertensives.
Biomedicines. 11 (12), 1-13, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines11123323>
IF: 3.9





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

9. Fagyas, M., Nagy, B. J., Ráduly, A. P., Mányiné Siket, I., Mártha, L., Erdősi, G., Sipka, S. i.,
Enyedi, E. E., **Szabó, A. Á.**, Pólik, Z., Kappelmayer, J., Papp, Z., Borbély, A., Szabó, T.,
Balla, J., Balla, G., Bai, P., Bácsi, A., Tóth, A.: The majority of severe COVID-19 patients
develop anti-cardiac autoantibodies.
GeroScience. 44, 2347-2360, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-022-00649-6>
IF: 5.6

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 41,1

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,6**

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

Debrecen, 2026.02.09.



12. TÁRGYSZAVAK

ACE-aktivitás	ACE activity
ACE-gátló terápia	ACE inhibitor therapy
angiotenzin-konvertáló enzim	angiotensin-converting enzyme
biomarker	biomarker
endogén ACE-gátlás	endogenous ACE inhibition
húgysav	uric acid
interferencia	interference
laboratóriumi diagnosztika	laboratory diagnostics
szarkoidózis	sarcoidosis
urea	urea
urobilinogén	urobilinogen
vizelet ACE	urinary ACE

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálával tartozom témavezetőmnek, *Dr. Fagyas Miklósnak*, aki az első pillanattól kezdve bátorított és önzetlenül segített. Kiváló mentorként vezetett végig a PhD képzés rögzös útján, eleinte napi szintű konzultációkon türelmesen mindent elmagyarázva, majd az önállósodás felé vezető úton elindítva, támogatva tudományos szárnypróbálgatásaimat. Vezetése mellett a kudarcok is megszépültek, az értelmetlennek tűnő eredménytelen órák is értelmet nyertek. Olyan világszemléletet adott át, amely biztos iránytűként segít eligazodni a tudományos élet útvesztőjében. Legnagyobb értéknek mégis az évek során kialakult igaz barátságunkat tartom. Remélem, a jövőben sok közös élményt élünk meg munkánk során és a futóversenyeken egyaránt.

Szeretnék köszönetet mondani *Dr. Papp Zoltán* professzor úrnak, amiért TDK hallgatóként megszólított és elhívott a Tanszékre kutatni. Nagyra becsülöm, amiért sem a PhD képzésem kezdetén, sem később, sohasem sejtetett több eredményt, vagy sikert, mint amihez a feltételeket garantálni tudta. Ez a biztonságos, kiszámítható és támogató háttér felbecsülhetetlen volt számomra. Hálás vagyok pártfogásáért, bölcs meglátásaiért és a velem való beszélgetésekre szánt idejéért.

Rengeteget jelentettek számomra *Dr. Tóth Attila* professzor úr ösztönző szavai, hasznos szakmai meglátásai és kétségeket ébresztő kérdései. Ezek mind elengedhetetlenek voltak a szakmai fejlődésemhez.

Köszönet illeti a Klinikai Fiziológiai Tanszék összes munkatársát és PhD hallgatóját, hogy munkám során segítettek. Külön köszönet illeti elsőszerző társamat, *Enyedi Enikő Editet*, akivel együtt éltünk meg az elmúlt négy évben minden kisebb-nagyobb sikert és segítettük át egymást a holtponatokon.

A közlemények nem jöhettek volna létre társszerzőink, kollaborációs partnereink és a Kardiológiai Klinika munkatársai nélkül. Köszönöm munkájukat, segítségüket és a humán minták biztosítását.

Végül köszönöm menyasszonyomnak, szüleimnek és családomnak, hogy türelemmel és szeretettel fordultak felém minden pillanatban. Köszönöm a töretlen bizalmat, a belém vetett hitet és a szüntelen támogatást.

Ezt a munkát nagy szeretettel ajánlom Szüleimnek és menyasszonyomnak, Villőnek!

A kutatás, illetve az ismertetett tudományos eredmények a **Richter Gedeon Nyrt.** által létrehozott Richter Gedeon Talentum Alapítvány támogatásával, a „Richter Gedeon Kiválósági PhD Ösztöndíj” keretében készültek.



RICHTER GEDEON