

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Enyedi Enikő Edit

Témavezető: Dr. Fagyas Miklós



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

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék	1
Rövidítések jegyzéke	3
Bevezetés	6
Elméleti és irodalmi áttekintés	7
A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer működése és az angiotenzin-konvertáló enzim szerepe	7
Az endogén ACE-gátlás	8
A HSA ligandumkötő tulajdonságai	9
Zsírsavak a keringésben	11
Az ACE szerkezeti és funkcionális sajátosságai	12
Epitóp-specifikus ACE-fenotipizálás elméleti alapjai	14
Célkitűzés	17
Anyagok és Módszerek	18
Humán minták, vizsgálati populációk	18
Az ACE-aktivitás fluoreszcens kinetikus meghatározása	18
Az ACE-aktivitás meghatározása ZPHL- és HHL-szubsztrátokkal	19
Az endogén ACE-gátlás meghatározása	20
Szérum HSA-koncentráció meghatározása	21
Szérum szabadzsírsav-koncentráció meghatározása	21
Zsírsavak eltávolítása albuminról aktív szénnel	21
Albumin kezelése meghatározott zsírsavakkal	22
Rekombináns humán ACE előállítása és tisztítása	22
ACE immunprecipitálása és kezelése HSA-val	23
ACE-fenotipizálás monoklonális antitestekkel	24
DNS-izolálás és teljes exom szekvenálás	25
Statisztikai analízis	25
Etikai engedélyek	26
Eredmények	27
Betegcsoportok jellemzése	27
A HSA-koncentráció és az endogén ACE-gátlás kapcsolata	30
Az ACE-gátlás zsírsavak jelenlétében és hiányában	32
A szérum FFA-koncentráció és az endogén ACE-gátlás közötti kapcsolat vizsgálata ...	33
A telített zsírsavak szénláncosságának szerepe a HSA-mediált ACE-gátlásban	34
A telítetlen zsírsavak szerkezeti sajátosságai és a HSA-mediált ACE-gátlás kapcsolata	37

A többszörösen telítetlen zsírsavak szerepe a HSA-mediált ACE-gátlásban.....	39
A zsírsavfüggő ACE-gátlás vizsgálata szöveti eredetű ACE esetében	41
A szérum és szöveti ACE fenotípusának összehasonlítása párosított mintákban	43
Az ACE-gátlás eltérései atípusos ACE-fenotípus esetén	45
Az atípusos ACE-fenotípus genetikai hátterének vizsgálata.....	46
Diszkusszió.....	49
Összefoglalás.....	59
Summary.....	60
Irodalomjegyzék	61
Saját közlemények jegyzéke.....	71
Tárgyszavak.....	73
Köszönetnyilvánítás	74
Függelék	75

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Abz	orto-aminobenzoil	ortho-aminobenzoyl
Abz-FRK-(Dnp)-P-OH	orto-aminobenzoil-fenilalanil-arginil-lizin(2,4-dinitrofenil)-prolin-OH	ortho-aminobenzoic acid-Phe-Arg-Lys(2,4-dinitrophenyl)-Pro-OH
ACE	angiotenzin-konvertáló enzim	angiotensin-converting enzyme
Ac-SDKP	N-acetil-szeril-aszpartil-lizil-prolin	N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline
ADAM17	A diszintegrin és metalloproteináz 17	A disintegrin and metalloproteinase 17
ADAMTSL4	ADAMTS-like protein 4	ADAMTS-like protein 4
ALA	alfa-linolénsav	alpha-linolenic acid
Asn117	117. pozícióban lévő aszparaginsav	asparagine in position no. 117
Asn666	666. pozícióban lévő aszparaginsav	asparagine in position no. 666
Asn685	685. pozícióban lévő aszparaginsav	asparagine in position no. 685
Asn731	731. pozícióban lévő aszparaginsav	asparagine in position no. 731
Asn-X-Ser/Thr	aszparagin-X-szerin/treonin	asparagine-X-serine/threonine
AT1	angiotenzin 1 receptor	angiotensin 1 receptor
AT2	angiotenzin 2 receptor	angiotensin 2 receptor
BiP	kötő immunoglobulin fehérje	binding immunoglobulin protein
BMI	testtömegindex	body mass index
BSA	szarvasmarha szérumalbumin	bovine serum albumin
CCL18	CC-kemokin ligand 18	C-C motif chemokine ligand 18
COX	ciklooxygenáz	cyclooxygenase
DHA	dokozahexaénsav	docosahexaenoic acid
Dnp	2,4-dinitrofenil	2,4-dinitrophenyl
DNS	deoxiribonukleinsav	deoxyribonucleic acid

EDA	eikozadiénsav	eicosadienoic acid
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav	ethylenediaminetetraacetic acid
eGFR	becsült glomeruláris filtrációs ráta	estimated glomerular filtration rate
ELISA	enzimkapcsolt immunszorbens esszé	enzyme-linked immunosorbent assay
EPA	eikozapentaénsav	eicosapentaenoic acid
FA	zsírsav	fatty acid
FA1	1. zsírsavkötő hely	fatty acid binding site 1
FFA	szabad zsírsav	free fatty acid
GLA	gamma-linolénsav	gamma-linolenic acid
GRP78	glükózregulált fehérje 78	glucose regulated protein 78
HHL	hippuril-L-hisztidil-L-leucin	hippuryl-L-histidyl-L-leucine
HSA	humán szérumalbumin	human serum albumin
hsCRP	nagy érzékenységű C-reaktív protein	high-sensitivity C-reactive protein
IC ₅₀	félmaximális gátló koncentráció	half maximal inhibitory concentration
IgG	immunglobulin G	immunoglobulin G
IP ₃	inozitol-1,4,5-trifoszfát	inositol 1,4,5-trisphosphate
IQR	interkvartilis tartomány	interquartile range
IRS–PI3K–Akt	inzulin receptor szubsztrát–foszfoinozítid-3-kináz–protein	insulin receptor substrates–phosphoinositide 3-kinase–
kDa	kilodalton	kilodalton
LA	linolsav	linoleic acid
LOX	lipoxigenáz	lipxygenase
mAb	monoklonális antitest	monoclonal antibody
mtsi	munkatársai	et al.
MUFA	egyszeresen telítetlen zsírsav	monounsaturated fatty acid

NF- κ B	aktivált B-sejt nukleáris faktor kappa-könnyű-lánc-enhancer fehérjekomplexe	nuclear factor kappa-light- chain-enhancer of activated B cells
Ni-NTA	nikkel-nitrilotriacetát	nickel-nitrilotriacetic acid
NOD2	nukleotid-kötő oligomerizációs domén 2	nucleotide-binding oligomerization domain protein 2
PARC	pulmonalis és aktiváció- szabályozott kemokin	pulmonary and activation- regulated chemokine
PBS	foszfát-pufferolt sóoldat	phosphate-buffered saline
PBST	Tween-t tartalmazó foszfát- pufferolt sóoldat	phosphate-buffered saline with Tween
PolyPhen-2	Polymorphism Phenotyping v2	Polymorphism Phenotyping v2
PUFA	többszörösen telítetlen zsírsav	polyunsaturated fatty acid
RAAS	renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer	renin-angiotensin-aldosterone system
recACE	rekombináns angiotenzin- konvertáló enzim	recombinant angiotensin- converting enzyme
rpm	percenkénti fordulatszám	revolutions per minute
SAA1	szérum amyloid A1	serum amyloid A1
Sf9	Spodoptera frugiperda 9 sejt	Spodoptera frugiperda 9 cell
SFA	telített zsírsav	saturated fatty acid
SMPD1	szfingomielin-foszfodiészteráz 1	sphingomyelin phosphodiesterase 1
TLR4	Toll-like receptor 4	Toll-like receptor 4
TNF α	tumor nekrosis faktor- α	tumor necrosis factor- α
TRIS	trisz(hidroximetil)-aminometán	tris(hydroxymethyl)aminometh- ane
Tyr-138	tirozin-138	tyrosine-138
ZPHL	karbobenzoxi-L-fenilalanil-L- hisztidil-L-leucin	carbobenzoxyl-L-phenylalanyl- L-histidyl-L-leucine

BEVEZETÉS

Az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) kulcsenzimeként meghatározó szerepet játszik a kardiovaszkuláris rendszer működésének, a vérnyomás- és folyadékháztartás szabályozásának, valamint több kóros folyamat, így a szív- és érrendszeri remodelling és gyulladásos válaszok alakulásának szabályozásában [1,2]. Ennek megfelelően az ACE működése és szabályozása régóta a biokémiai és orvosbiológiai kutatások fókuszában áll. Ugyanakkor egyre több megfigyelés utal arra, hogy az ACE funkcionális állapota nem azonosítható pusztán az enzim koncentrációjával vagy az adott körülmények között mért aktivitásértékkel, hanem a biológiai környezet és a szerkezeti sajátosságok is meghatározhatják működését [3,4].

Korábbi eredmények alapján a humán szérumalbumin (HSA) képes gátolni az angiotenzin-konvertáló enzimet, azonban az albumin ACE-re gyakorolt hatása nem tekinthető pusztán koncentrációfüggő jelenségnek, mivel a gátlás mértéke nem áll egyenes arányban az albumin szintjével [5]. A HSA központi szerepet játszik különböző endogén ligandumok szállításában. Ez felveti annak lehetőségét, hogy az albumin funkcionális állapota, illetve az általa kötött ligandumok jelenléte meghatározó szerepet játszhat az ACE szabályozásában.

A HSA elsődleges zsírsavszállító fehérjeként ismert, és a zsírsavkötés dokumentált módon képes módosítani az albumin szerkezeti és funkcionális sajátosságait [6]. Ennek ellenére az albuminhoz kötött zsírsavak minőségi összetételének ACE-re gyakorolt hatását eddig csak korlátozott mértékben vizsgálták. Számos klinikai vizsgálat utal arra, hogy az étrendi zsírsavösszetétel megváltoztatása mérhető hatással van a kardiovaszkuláris rendszer működésére, beleértve a vérnyomás alakulását is, ami arra utal, hogy a keringő zsírsavak nem csupán metabolikus, hanem funkcionális szabályozó szereppel is bírhatnak [7,8].

Az ACE működését a biológiai környezethez kapcsolódó szerkezeti és funkcionális sajátosságok is befolyásolhatják, amelyek hatással lehetnek a HSA közvetítésével megvalósuló gátlás jellegére. Mindezek alapján az endogén ACE-gátlás olyan összetett jelenségnek tekinthető, amelynek értelmezése több, egymással összefüggő tényező együttes figyelembevételét igényli, beleértve az ACE funkcionális állapotát, az albumin szerepét, valamint az albuminhoz kötött ligandumok moduláló hatását. Ezek a megfontolások képezik a jelen értekezés alapját.

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer működése és az angiotenzin-konvertáló enzim szerepe

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) a keringés egyik alapvető szabályozó mechanizmusa, amely a vérnyomás, a keringő volumen és a nátrium-háztartás fenntartásában játszik szerepet. A rendszer aktivációja csökkent renális perfúzió, hipovolémia vagy alacsony nátriumbevitel esetén indul meg. A vesében a juxtaglomeruláris sejtek renint választanak ki, amely az angiotenzinogént angiotenzin I-é hasítja. Az angiotenzin I biológiailag inaktív, és az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) hatására alakul át angiotenzin II-vé, amely a rendszer fő effektor molekulája [9,10].

Az angiotenzin II hatásai döntően az AT1 receptoron keresztül érvényesülnek. Az AT1 receptor Gq-fehérjéhez kapcsolt receptor, amelynek aktivációja a foszfolipáz C aktiválásához vezet. Ennek következtében az inozitol-1,4,5-trifoszfát (IP₃) és a diacilglicerol képződése fokozódik, ami intracelluláris Ca²⁺-felszabadulást, valamint protein-kináz C aktivációt eredményez. Ezek a jelátviteli folyamatok közvetlenül hozzájárulnak a simaizomkontrakció kialakulásához, és ezáltal fokozzák a perifériás ellenállást és emelik az artériás vérnyomást. Az AT1 receptor aktivációja serkenti a mellékvesekéreg zona glomerulosájában az aldoszteron szekrécióját, amely növeli a disztális nefron nátrium- és vízvisszaszívását, miközben fokozza a káliumürítést. Az angiotenzin II ezen kívül stimulálja az antidiuretikus hormon felszabadulását, aktiválja a szomjúságközpontot és fokozza a szimpatikus idegrendszeri tónust, ami tovább növeli a keringő volumen és a vérnyomás szintjét [11].

Ugyanakkor az angiotenzin II hatásai nem korlátozódnak az akut hemodinamikai szabályozásra. Tartós vagy fokozott aktiváció esetén az AT1 receptor közvetítésével proliferatív, proinflammatorikus és profibrotikus jelátviteli útvonalak aktiválódnak. A szívben és az érfalban ez simaizom- és fibroblast-proliferációhoz, extracelluláris mátrixfelhalmozódáshoz és strukturális remodellinghez vezethet. A vesében az intrarenalis RAAS-aktiváció fokozza a glomeruláris nyomást és elősegíti a progresszív nefronkárosodást. Oxidatív stressz és gyulladásos mediátorok fokozott termelődése révén az angiotenzin II hozzájárul a krónikus kardiovaszkuláris és renális betegségek progressziójához [12].

Az angiotenzin II hatásai kisebb részben az AT2 receptoron keresztül is érvényesülhetnek, amely bizonyos körülmények között a proliferáció gátlásával és vazodilatátor mechanizmusokkal ellenhatást fejthet ki, azonban a keringési és patofiziológiai hatások döntő többsége AT1-mediált [11,13].

Az ACE a fenti folyamatok meghatározó lépését katalizálja. Az emberi szervezetben a szomatikus ACE elsősorban az endotél felszínén expresszálódik, különösen a pulmonális kapillárisokban, de kimutatható a vese proximális tubulus sejteiben, a szívben, az érfal simaizomsejtjeiben, az agy bizonyos területein és a gasztrointesztinális traktusban is [14]. Az ACE lokalizációja anatómiailag és funkcionálisan is összefügg az angiotenzin II szisztémás és lokális képződésével.

Az ACE gátlása csökkenti az angiotenzin II képződését és mérsékli az AT1-mediált hatásokat. Az ACE-gátlók alkalmazása széles körben elterjedt artériás hipertóniában, krónikus szívelégtelenségben, akut miokardiális infarktust követően, balkamra-diszfunkcióban, valamint diabéteszes és nem diabéteszes krónikus vesebetegségben. A RAAS túlaktivációjához köthető strukturális és funkcionális eltérések mérséklése révén az ACE-gátlók csökkentik a morbiditást és a mortalitást ezen kórképekben.

Az angiotenzin-konvertáló enzim aktivitásának meghatározása diagnosztikai jelentőséggel bír granulomatózus betegségekben, különösen szarkoidózisban, ahol az emelkedett szérums ACE-aktivitás a betegség progressziójával összefüggésbe hozható [15].

Az endogén ACE-gátlás

Az ACE aktivitása nem kizárólag az enzim koncentrációjától függ. Azonos ACE-koncentráció mellett eltérő katalitikus aktivitás mérhető, ami arra utal, hogy a keringésben jelen lévő plazmakomponensek az enzim működését közvetlenül befolyásolják.

Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai igazolták, hogy a humán szérumban mérhető ACE-aktivitás csökkenéséért elsődlegesen a HSA felelős. Kísérletes körülmények között kimutattuk, hogy a HSA jelenléte az ACE katalitikus aktivitását reverzibilis módon gátolja, anélkül, hogy az enzim irreverzibilis inaktivációját okozná. Az albumin eltávolítása vagy koncentrációjának csökkentése az ACE-aktivitás növekedésével jár, ami a HSA direkt moduláló szerepét támasztja alá [5,16].

Az endogén ACE-gátlás mértéke azonban egyénenként változó. Klinikai mintákban az ACE-aktivitás és az ACE-koncentráció közötti arány nem állandó, és a HSA jelenléte mellett is különbségek figyelhetők meg a gátlás intenzitásában. Ez a variabilitás arra utal, hogy a HSA által közvetített gátló hatás nem kizárólag az összalbumin-koncentráció függvénye.

A HSA strukturálisan rugalmas, több kötőhellyel rendelkező fehérje, amely a keringésben számos endogén és exogén molekulával lép kölcsönhatásba. Ismert, hogy különböző környezeti tényezők, például oxidatív módosulások, konformációs eltérések vagy

ligandkötés, befolyásolhatják az albumin szerkezeti és funkcionális sajátosságait [17]. Ennek alapján ésszerűen feltételezhető, hogy a szérum aktuális összetétele és az albumin funkcionális állapota hatással lehet az ACE-re gyakorolt gátló effektus mértékére.

A HSA ligandumkötő tulajdonságai

A HSA a vér legnagyobb koncentrációban jelen lévő fehérjéje, amely megközelítőleg 35–52 g/L koncentrációban található a keringésben. A 66,5 kDa molekulatömegű, 585 aminosavból álló fehérje három homológ doménből (I., II. és III. domén) épül fel, amelyek további A és B alegységekre tagolódnak. A HSA szerkezetét 17 diszulfidhíd stabilizálja, ami jelentős szerkezeti stabilitást biztosít, ugyanakkor a molekula konformációja dinamikusan alkalmazkodik a ligandumkötéshez [18].

A HSA számos endogén és exogén molekula transzportjában vesz részt. A keringésben jelen lévő kis molekulatömegű hidrofób vagy részben hidrofób vegyületek jelentős hányada albuminhoz kötötten szállítódik. Endogén ligandumai közé tartoznak a szabad zsírsavak (FFA), a bilirubin, az epesavak, a tiroxin és más pajzsmirigyhormonok, a kortizol és egyéb szteroid hormonok, továbbá különböző lipidperoxidációs termékek és reaktív aldehidek. Az albumin képes továbbá nitrogén-monoxid és különböző reaktív oxigénszármazékok megkötésére is, amivel redox-szabályozási folyamatokban is szerepet játszhat [19].

Exogén molekulák közül az albumin számos gyógyszert köt nagy affinitással. A klasszikusan leírt kötőhelyek közé tartozik a Sudlow I hely (IIA alegység), amely például warfarin, fenilbutazon és egyes benzodiazepinek kötéséért felelős, valamint a Sudlow II hely (IIIA alegység), amely többek között diazepam, ibuprofen és más nem-szteroid gyulladáscsökkentők kötésében játszik szerepet [19–21]. E kötőhelyek kompetitív módon képesek különböző ligandumokat megkötni, ami farmakokinetikai szempontból is jelentős.

Az albumin ligandkötése nem izolált esemény, hanem a molekula teljes konformációját érintő folyamat. A különböző kötőhelyek térbeli közelsége és a domének relatív elmozdulása lehetővé teszi, hogy egy ligandum kötődése befolyásolja más ligandumok affinitását [22]. Ez az allosztérikus jellegű kölcsönhatás az albumint dinamikusan szabályozható transzportfehérjévé teszi [23].

Az albuminhoz kötött molekulák közül mennyiségi szempontból a szabad zsírsavak kiemelt jelentőséggel bírnak. A keringésben a zsírsavak döntő többsége albuminhoz kötötten található, és egy albuminmolekula több zsírsav egyidejű megkötésére képes. Emellett a HSA több nagy affinitású zsírsavkötő hellyel rendelkezik, krisztallográfiás vizsgálatok alapján

legalább hét fő zsírsavkötő hely azonosítható a molekulán [24]. A nagy affinitású helyek közül kiemelt jelentőségű az FA1 kötőhely, amely a IIA alegység régiójában helyezkedik el, és részben átfedést mutat a Sudlow I kötőhellyel. Az FA1 régióban található Tyr-138 oldallánca a zsírsav karboxilát csoportjának stabilizálásában vesz részt, így a kötés orientációjának meghatározásában is szerepet játszik. A zsírsavak kötődése elsősorban hidrofób interakciókon és specifikus aminosav-oldalláncokkal kialakuló kölcsönhatásokon keresztül valósul meg.

A zsírsavkötés nem pusztán passzív transzportfolyamat, hanem a HSA konformációját is módosítja. Strukturális és molekuláris szimulációs vizsgálatok kimutatták, hogy különböző lánchosszúságú és telítettségű zsírsavak eltérő mértékű doménelmozdulást és lokális szerkezeti átrendeződést idézhetnek elő [25,26]. A ligandumkötés következtében a domének relatív orientációja változhat, ami más kötőhelyek affinitását is módosíthatja. Ez az allosztérikus jellegű szabályozás azt eredményezi, hogy az albumin egyes kötőhelyeinek foglaltsága befolyásolhatja más ligandumok kötődését.

A HSA funkcionális tulajdonságai így ligandumfüggő módon változhatnak. A zsírsavakkal telített albumin eltérő gyógyszerkötési profilt mutathat, mint a zsírsavmentes forma és különbségek figyelhetők meg a kolloidozmotikus hatás, valamint egyes fehérje-fehérje kölcsönhatások tekintetében is. Kísérletes adatok arra utalnak, hogy a zsírsavkötés befolyásolhatja az albumin felszíni töltéseloszlását és konformációs flexibilitását, ami más fehérjékkel való interakciós potenciálját is módosíthatja [27].

A keringésben az albumin zsírsavakkal való telítettsége dinamikusan változik a metabolikus állapot függvényében. Éhezés, fizikai terhelés, inzulinrezisztencia vagy gyulladásos állapotok esetén a szabad zsírsavak koncentrációja emelkedhet, ami az albumin zsírsavkötő helyeinek nagyobb mértékű foglaltságát eredményezi. Ennek következtében az albumin konformációja és funkcionális viselkedése a fiziológiás és kóros állapotok között különbözhet.

Mindezek alapján a HSA nem tekinthető kizárólag passzív hordozófehérjének. Ligandumkötő tulajdonságai és konformációs plaszticitása révén a keringési környezet változásaira érzékenyen reagáló, funkcionálisan modulálható fehérjeként értelmezhető. Az albuminhoz kötött zsírsavak mennyiségi és minőségi jellemzői ezért potenciálisan befolyásolhatják az albumin más fehérjékkel kialakított kölcsönhatásait is.

Zsírsavak a keringésben

A keringésben jelen lévő nem észterifikált zsírsavak (free fatty acids, FFA-k) főként a zsírszövetből történő lipolízis eredményeként jutnak a plazmába. Éhomi állapotban koncentrációjuk jellemzően 0,2–0,6 mmol/L tartományban mozog, azonban éhezés, stressz, inzulinrezisztencia vagy fokozott szimpatikus aktivitás esetén 1 mmol/L feletti értékeket is elérhet. A plazmában az FFA-k döntő többsége albuminhoz kötötten kering, a nem kötött frakció aránya rendkívül alacsony.

A teljes FFA-koncentráció ugyanakkor nem tükrözi a zsírsavösszetételt. A vészérum FFA-frakció heterogén, és több fő csoport különíthető el szerkezeti alapon.

Telített zsírsavak (SFA)

A telített zsírsavak (saturated fatty acids, SFA-k) közé tartozik például a palmitinsav (C16:0) és a sztearinsav (C18:0). Kettőskötést nem tartalmaznak, láncuk lineáris, ami a biológiai membránokban fokozott lipid-rendezettséget eredményezhet. Sejtszinten a palmitinsav képes aktiválni a Toll-like receptor 4 (TLR4) jelátviteli útvonalat, amely NF- κ B-mediált gyulladásos génexpresszióhoz vezethet [28]. A telített zsírsavak továbbá elősegíthetik a ceramidképződést, ami az inzulinjelátviteli útvonal (IRS–PI3K–Akt tengely) gátlásán keresztül inzulinrezisztenciához járulhat hozzá [29,30].

Emelkedett szérum SFA-arányt írtak le metabolikus szindrómában és 2-es típusú diabétesz mellituszban, ahol a fokozott zsírszöveti lipolízis és inzulinrezisztencia következtében a palmitinsav és más hosszú láncú SFA-k aránya növekedhet [31,32].

Egyszeresen telítetlen zsírsavak (MUFA)

Az egyszeresen telítetlen zsírsavak (monounsaturated fatty acids, MUFA-k) közé tartozik az olajsav (C18:1 n-9), amely a szérum egyik leggyakoribb MUFA-komponense. Egy cisz konfigurációjú kettőskötést tartalmaz, amely térbeli hajlítást eredményez a láncban, csökkentve a membránlipidek rendezettségét és növelve a membránfluiditást. Az olajsav kevésbé aktivál gyulladásos jelátviteli útvonalakat, mint a palmitinsav, és egyes modellekben mérsékli a telített zsírsavak által kiváltott NF- κ B-aktivációt [33].

A MUFA-k metabolikus hatásprofilja általában kedvezőbb a telített zsírsavakéhoz képest: növelik a HDL-koleszterin szintjét, csökkentik a trigliceridszintet, valamint hozzájárulhatnak a glikémiás kontroll javításához [34]. E kedvező hatások részben az inzulinérzékenység megőrzésével és az oxidatív stressz csökkentésével magyarázhatók. A

szérum MUFA-arány változása összefüggésbe hozható a lipidanyagcsere állapotával és a de novo lipogenezis aktivitásával [34].

Többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA)

A többszörösen telítetlen zsírsavak (polyunsaturated fatty acids, PUFA-k) közé tartoznak az omega-6 (n-6) család tagjai, például a linolsav (C18:2 n-6) és az arachidonsav (C20:4 n-6), valamint az omega-3 (n-3) család tagjai, például az eikozapentaénsav (EPA, C20:5 n-3) és a dokozahexaénsav (DHA, C22:6 n-3). Több kettőskötést tartalmaznak, ami fokozott konformációs flexibilitást és oxidációs érzékenységet eredményez.

A szérum PUFA-arány változása összefüggésben állhat gyulladásos és kardiovaszkuláris állapotokkal. Egy tanulmány szerint a magasabb szérum omega-3 (különösen a DHA) koncentráció független védőfaktor a koszorúér-betegségekkel szemben [35]. Az arachidonsav a ciklooxygenáz (COX) és lipoxigenáz (LOX) útvonalakon keresztül prosztaglandinok, tromboxánok és leukotriének prekursora, amelyek gyulladásos és vaszkuláris folyamatokat szabályoznak [36,37]. Ezzel szemben az EPA és DHA metabolitjai, például resolvinok, protektinek és maresinek, gyulladásfeloldó (pro-resolving) mediátorok, amelyek hozzájárulnak a szöveti regenerációhoz. Krónikus gyulladásos betegségekben és egyes kardiovaszkuláris kórképekben az n-6/n-3 arány eltolódása figyelhető meg, ami a gyulladásos mediátorprofil módosulásával járhat [38].

A vérkeringésben a zsírsavprofil tehát nem pusztán energetikai paraméter, hanem olyan biokémiai jellemző, amely szerkezeti, jelátviteli és gyulladásos folyamatokat is befolyásol. A teljes FFA-koncentráció meghatározása önmagában nem tükrözi ezeket a minőségi különbségeket. A zsírsavak lánchosszúsága, telítettsége és relatív aránya eltérő fizikai-kémiai tulajdonságokat és biológiai hatásokat eredményez, amelyek potenciálisan módosíthatják az albuminhoz kötött állapotban érvényesülő funkcionális kölcsönhatásokat is.

Az ACE szerkezeti és funkcionális sajátosságai

Az ACE egy cinkfüggő dipeptidil-karboxipeptidáz, körülbelül 130–180 kDa molekulatömegű, erősen N-glikozilált fehérje, amely egyetlen polipeptidláncból áll és két homológ katalitikus domént tartalmaz: az N-domént és a C-domént. Mindkét domén rendelkezik saját aktív centrummal, amelyeknek a kialakításában résztvevő aminosavak sorrendje azonos: HEMGH-motívumhoz kötődő cinkion vesz részt a katalízisben [39,40].

A két domén funkcionálisan nem teljesen azonos. A C-domén elsődlegesen felelős az angiotenzin I angiotenzin II-vé történő átalakításáért, míg az N-domén bizonyos egyéb peptidszubsztrátok, például az N-acetil-szeril-aszpartil-lizil-prolin (Ac-SDKP), lebontásában játszik meghatározó szerepet [41,42]. Ismert, hogy egyes ACE-gátlók doménszelektív affinitást mutatnak: például a lizinopril és az enalapril elsősorban a C-doménhez kötődnek nagy affinitással, míg bizonyos kísérleti inhibitorok N-domén preferenciát mutatnak [43–46]. A doménszelektív működésnek élettani relevanciája van, mivel az Ac-SDKP lebontásának gátlása antifibrotikus hatásokkal hozható összefüggésbe [47], míg az angiotenzin II képződésének csökkentése hemodinamikai hatásokkal jár.

A szomatikus ACE membránkötött forma, amely egy C-terminális transzmembrán szakasz révén horgonyzódik a sejtfelszínhez [41]. Legnagyobb mennyiségben a pulmonális kapilláris endotélben expresszálódik, de jelen van a vese proximális tubulus sejtjeiben, a szívben, az érfal simaizomsejtjeiben és egyes immunsejtek felszínén is [48]. A szérumban mérhető szolubilis ACE a membránkötött forma extracelluláris részének proteolitikus hasításával (shedding) keletkezik, amelyben metalloproteázok, például az ADAM17 (= TNF α -konvertáló enzim), játszhatnak szerepet [49,50]. A levált forma megőrzi mindkét katalitikus doménjét és enzimaktivitását.

Az ACE több N-kapcsolt glikozilációs hellyel rendelkezik; a humán szomatikus ACE-ban legalább 7–8 potenciális N-glikozilációs konszenzushely (az N-glikoziláció esszenciális motívuma, más néven szekon, Asn-X-Ser/Thr) azonosítható [51]. A glikoziláció hozzájárul a fehérje stabilitásához, megfelelő hajtogatódásához és felszíni szerkezetéhez [52]. Kimutatták, hogy az ACE glikozilációja heterogén, és a glikánmintázat sejtípus- és szövetfüggő eltéréseket mutathat [53,54]. A glikozilációs eltérések befolyásolhatják az enzim felszíni epitópjainak hozzáférhetőségét és stabilitását.

Az ACE térszerkezete dinamikus, és szubsztrát- vagy inhibitorkötés hatására lokális konformációváltozások következnek be az aktív centrum környezetében. Krisztallográfiás vizsgálatok kimutatták, hogy az aktív centrum zsebének záródása és nyitása befolyásolja a szubsztrát-hozzáférést és a katalitikus hatékonyságot [40]. A két domén közötti relatív orientáció szintén változhat, ami domén-domén kölcsönhatásokat eredményezhet.

Biológiai minták között az ACE konformációs állapota eltérhet. Ez nem feltétlenül jár a katalitikus aktivitás drámai csökkenésével, ugyanakkor módosíthatják az enzim felszíni interakciós tulajdonságait és domén-specifikus működését.

Epitóp-specifikus ACE-fenotipizálás elméleti alapjai

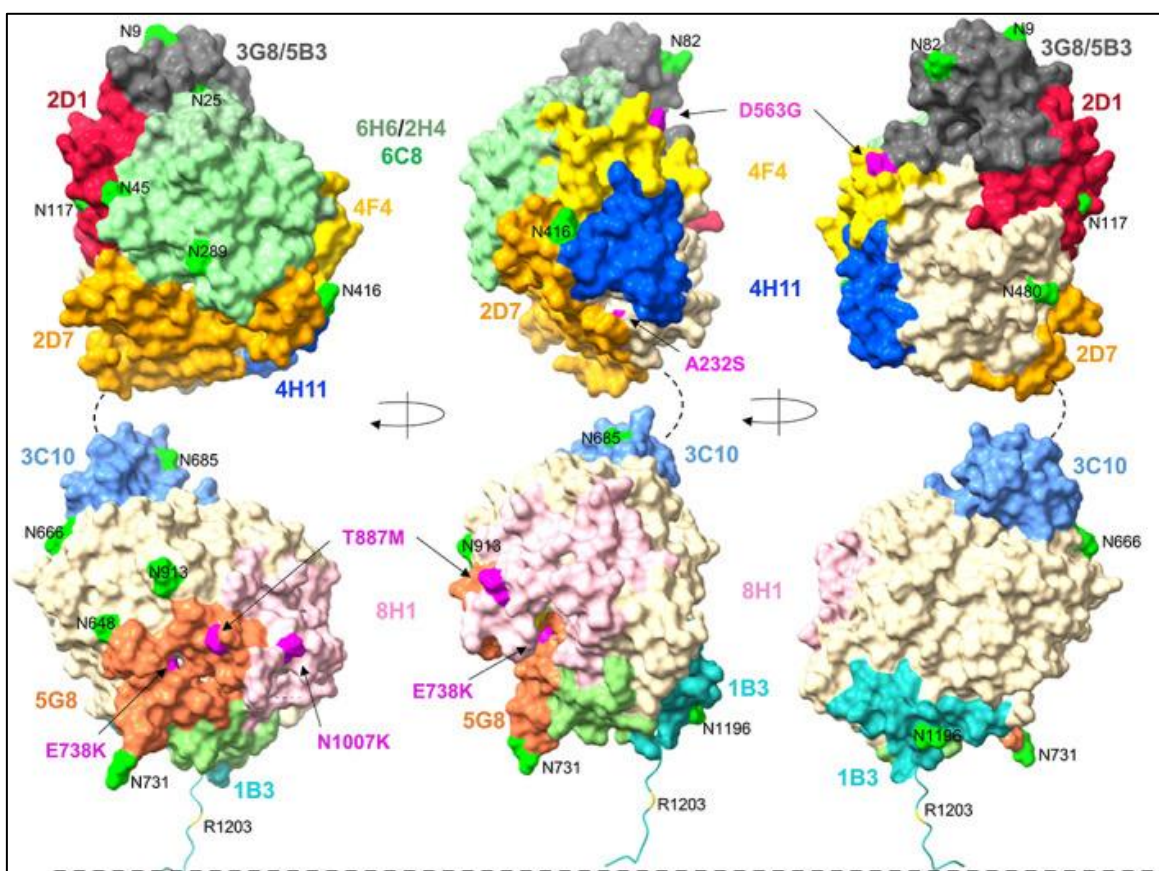
A monoklonális antitestek (monoclonal antibodies, mAb-k) epitóp-specifikus kötődése lehetőséget ad arra, hogy egy fehérje felszíni szerkezetét több, egymást kiegészítő kötődés alapján jellemezzük. Danilov és mtsi az ACE esetében olyan monoklonális antitestpanelt fejlesztettek ki, amely az enzim N- és C-doménjén elhelyezkedő, konformációfüggő epitópokat ismeri fel. Az epitópok térképezése doménspecifikus rekombináns konstrukciók, kompetíciós vizsgálatok és célzott mutagenézis segítségével történt, ami lehetővé tette a kötőhelyek doménszintű lokalizálását (1. ábra).

A módszer kulcsa, hogy a használt antitestek jelentős része konformációfüggő epitópot ismer fel, vagyis kötődésük érzékeny a felszíni térszerkezet lokális változásaira. Az ACE esetében különösen fontos, hogy az epitópok nagy hányada glikozilációs helyek közvetlen környezetéhez kapcsolódik, ezért az antitestek kötődési intenzitása nemcsak aminosavsorrend-változásra, hanem a glikánok jelenlétére és összetételére is reagálhat. Danilovék epitope-mapping vizsgálatai alapján az ACE-ban 17 potenciális N-kapcsolt glikozilációs hely azonosítható, amelyek közül több (irodalmi adatok szerint akár 15) ténylegesen glikozilált lehet, és a glikánmintázat sejttípus- és szövetfüggő heterogenitást mutat [55].

A C-doménhez rendelt epitópok térképezése során több olyan antitestet írtak le, amely kifejezetten érzékeny bizonyos glikánok jelenlétére. Például egyes mAb-k (például 1B8 és 3F10) kötődése az Asn731 környezetében lévő N-glikán összetételétől függ, míg más antitestek (például 2H9 és 3F11) az Asn685 környezetének, illetve további glikozilációs régiók (például egy C-terminális hely) állapotát jelzik a kötődésükön keresztül; további mAb-k (például 1E10 és 4E3) az Asn666 régióhoz kapcsolódó glikánérzékenységet mutatnak [56]. Ezek a példák azt támasztják alá, hogy a panel nem egyszerűen „ACE-detektor”, hanem több ponton képes a felszíni mikrokörnyezet (különösen a glikánkörnyezet) eltéréseit is megkülönböztetni.

Az N-doménhez kapcsolódó antitestek között is találhatók olyanok, amelyek funkcionálisan értelmezhető felszíni régiókat fednek le. Például 9B9 és 3G8 epitópjai az N-terminális N-domén régióhoz kötődnek, és a kötődésük összefüggésbe hozható az ACE dimerizációjával és sheddingjével; a két antitest hatása eltérő irányú lehet ugyanazon tágabb régió belül, ami arra utal, hogy a felszíni mikroarchitektúra finom különbségei biológiai következményekkel járhatnak [57]. Szintén ide sorolható a 5F1 jelű antitest, amelynél részletes epitope-mapping alapján az epitóp az N-domén N-terminális régiójában lévő glikánkörnyezethez (például egy Asn117 körüli glikánhoz) köthető, és magas

koncentrációban az ACE-aktivitást is képes gátolni [58]. Ez a megfigyelés a konformációfüggő kötődés és a katalitikus hasadék hozzáférhetősége közötti kapcsolatot is illusztrálja.



1. ábra: Az ACE felszíni epitópjainak sematikus elhelyezkedése a szomatikus ACE modelljén [55]. Az ábra a humán szomatikus ACE feltételezett konformációját mutatja, amelyben az N- és C-domén kristályszerkezetei egymáshoz orientálva kerültek ábrázolásra. Az N- és C-doménhez tartozó mAb-k által felismert epitópok felszíni régiói eltérő színekkel vannak jelölve, az egyes mAb-nevek közvetlenül a megfelelő felszíni területek mellett láthatóak. A feltételezett N-kapcsolt glikozilációs helyekhez tartozó aszparagin oldalláncok élénk zöld színnel kerültek kiemelésre, jelezve azok térbeli elhelyezkedését az epitópokhoz viszonyítva. A doméneket összekötő interdomén linker régió sematikusán, szaggatott ívvel ábrázolt, míg a C-domén juxtamembrán szakasza hurokszerűen jelenik meg, a sejtmembrán helyzetét szaggatott vonal jelöli. Az ábra a különböző epitópok térbeli elrendeződését szemlélteti, és alapját képezi az epitóp-specifikus konformációs fingerprinting megközelítésnek.

Danilov megközelítésében az ACE felszíni állapotának jellemzésére nem egyetlen mAb jelét használjuk, hanem a panel több elemének relatív kötődési mintázatát. Ezt a kötődési profilt nevezték el „konformációs ujjlenyomatként” (conformational fingerprint). Az ACE több epitópját lefedő antitestpanel együttes kötődési képe olyan érzékeny

markernek tekinthető, amely képes jelezni lokális konformációváltozásokat, glikozilációs eltéréseket, inhibitor- vagy ligandumkötéshez társuló strukturális módosulásokat, illetve sejttípus- és szövetfüggő különbségeket. A módszer gyakorlati megvalósításában központi szerepe van az immunológiai ACE-megkötésen alapuló enzimaktivitás-mérésnek (immune-capture jellegű megközelítés), ahol az antitest által megkötött ACE katalitikus aktivitása kvantifikálható, és a különböző antitestek között kapott mintázat összehasonlítható.

Ebben az értelmezési keretben az ACE „fenotípusa” nem a fehérje teljes konformációját vagy poszttranszlációs módosításainak összességét jelenti, hanem azt a relatív kötődési/aktivitási mintázatot, amelyet egy definiált epitóp-panellel mérünk. A fenotípus így egy adott mintázatot mutató fogalomként kezelendő: konzisztens mintázat esetén az ACE felszíni szerkezetének (és különösen az epitóp-mikrokörnyezeteknek) viszonylagos stabilitása feltételezhető, míg eltérő, atípusos mintázat esetén az epitópok hozzáférhetősége vagy környezete (például glikánfüggő módon) módosult [55].

A módszer előnye, hogy kis strukturális eltérésekre is érzékeny, és olyan különbségeket képes kimutatni, amelyek a teljes ACE-aktivitás egyszerű mérésével vagy koncentráció-meghatározással rejtve maradhatnak. A konformációs ujjlenyomat különösen akkor informatív, ha az ACE különböző biológiai forrásokból származik (például szérum vs. szöveti eredet, illetve különböző sejttípusokból származó ACE), ahol a glikoziláció és egyéb poszttranszlációs sajátosságok sejtspecifikusak lehetnek. Danilovék alkalmazási példái között szerepel, hogy bizonyos kórállapotokban az ACE-ujjlenyomat eltérhet a kontrolloktól, és ez a különbség szöveti és keringő ACE esetén is megjelenhet [59–61].

A megközelítésnek ugyanakkor világos limitációi vannak. Az epitóp-panel csak a felszín adott, lefedett régióiról szolgáltat információt, a nem vizsgált felszíni területek és a mélyebb szerkezeti elemek nem értékelhetők. A kötődési mintázat érzékenysége előny, de egyben értelmezési kihívás is: a glikoziláció-függő epitópok esetében a változás nem „hibát” jelent, hanem biológiai heterogenitást, amelynek okát külön kell feltárni. Emellett a mérés standardizálása kritikus, mivel a mintakezelés, immobilizáció, antitest-koncentráció és az enzimaktivitás-esszé paraméterei a mintázat összehasonlíthatóságát befolyásolhatják. Végül a módszer fenotípusa nem azonos a teljes poszttranszlációs „állapottal”: a fenotípus a panel által mért mintázat, és csak ezen a definíción belül értelmezhető.

A fenti elméleti keret alapján az ACE felszíni szerkezete epitóp-specifikusan jellemezhető, ugyanakkor továbbra is kérdés, hogy az ACE funkcionális állapota és konformációs sajátosságai milyen kapcsolatban állnak az endogén ACE-gátlás variabilitásával.

CÉLKITŰZÉS

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) működésének zavara meghatározó szerepet játszik a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában és progressziójában [16]. A rendszer egyik kulcsenzime az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE), amelynek aktivitását a klinikai gyakorlatban elsősorban farmakológiai úton, ACE-gátló gyógyszerekkel befolyásoljuk. Ezzel szemben az ACE endogén szabályozásáról, különösen a keringésben és a szövetekben érvényesülő fiziológias gátló mechanizmusokról, a rendelkezésre álló ismeretek korlátozottak.

Korábbi kutatások igazolták, hogy a humán szérumalbumin (HSA) jelentős endogén ACE-gátló hatással rendelkezik [5]. Ugyanakkor nem ismert, hogy milyen tényezők határozzák meg ennek a gátlásnak a mértékét, illetve, hogy ez a szabályozás miként érvényesül különböző szöveti környezetekben. Tekintettel arra, hogy az albumin számos ligandum, köztük zsírsavak hordozója, felmerül annak lehetősége, hogy az albuminhoz kötődő zsírsavak módosíthatják az albumin ACE-gátló tulajdonságait. Emellett az ACE nagymértékben glikozilált fehérje, amelynek poszttranszlációs módosításai konformációs eltéréseket eredményezhetnek, és ezáltal befolyásolhatják az enzim gátlhatóságát.

Munkám célja az ACE endogén szabályozásának vizsgálata volt humán mintákban, a keringésben és különböző szövetekben, különös tekintettel az albumin, az albuminhoz kötött zsírsavak, valamint az ACE poszttranszlációs módosításainak szerepére.

Vizsgálataim során az alábbi konkrét célkitűzéseket fogalmaztam meg:

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

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Humán minták, vizsgálati populációk

Vizsgálatainkhoz humán vér- és szövetmintákat használtunk fel. A szérumban angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) aktivitásának és endogén gátlásának vizsgálatához 161 felnőtt személy vérmintáját használtuk, akik a Debreceni Egyetem Kardiológiai Intézetének munkatársai, illetve ambulanciáján megjelenő betegek közül kerültek bevonásra. A vizsgálatba bevont személyek egyike sem részesült ACE-gátló kezelésben, amit részletes anamnézis felvétele, valamint biokémiai mérések alapján ellenőriztünk.

Az endogén ACE-gátlás és a zsírsavak közötti összefüggések vizsgálatához további 101 beteg vérmintáit elemeztük, amelyek a Debreceni Egyetem Kardiológiai Intézetének Klinikai Fiziológiai Tanszékére diagnosztikai célú ACE-aktivitás meghatározásra érkeztek.

A vérmintavétel standard aszeptikus technikával történt Vacutainer csövekbe (katalógusszám: 367955, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). A natív mintákat alvadást követően 1500 g-vel, 15 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten a szérumból és a sejtes elemek elválasztásához. A szérumból mintákat felhasználásig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az EDTA-val alvadását gátló vért $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -n tároltuk a DNS izolálásig.

A szöveti ACE vizsgálatához humán tüdő-, szív- és nyirokcsomószövet mintákat használtunk fel, amelyek műtéti beavatkozások során kerültek eltávolításra a Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Sebészeti Klinika, Mellkassebészeti Osztályán és a Kardiológiai és Szívsebészeti Klinikán. A vizsgálatban szövettípusonként egy-egy betegből származó minta szerepelt. A mintaválasztás egyik fő szempontja az volt, hogy a betegek ne részesüljenek ACE-gátló kezelésben. A betegektől a vérminta levétele és feldolgozása a fent leírtakkal azonos módon történt. A szövetmintákat mechanikusan aprítottuk, majd tömegarányosan 5 ml/g (nedves tömeg) 100 mM TRIS-HCl pufferoldatot (pH 7,0) adtunk hozzá jégén. A szöveteket homogenizátorral (Bio-Gen PRO200, PRO Scientific, Oxford, CT, USA) homogenizáltuk, majd 16100 g-n, 5 percig centrifugáltuk. A felülúszókat összegyűjtöttük, és a további meghatározásokig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

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

Az ACE-aktivitás fluoreszcens kinetikus meghatározása

A szérumban ACE-aktivitást fluoreszcens kinetikus módszerrel határoztuk meg, a Carmona és mtsi által leírt eljárás [62] kisebb módosításával, az általunk korábban

optimalizált protokoll szerint [63]. A mérés elve azon alapul, hogy az alkalmazott, szintetikus előállított fluoreszcens szubsztrátot (Abz-FRK-(Dnp)-P-OH) az ACE hasítja. Az intakt, quenched szubsztrát esetében a donor (Abz) és az akceptor (Dnp) molekulák közötti energiaátadás miatt a donor fluoreszcenciája nem észlelhető. A szubsztrát ACE általi hasítását követően az energiaátadás megszűnik, a donor molekula gerjeszthetővé válik, és fluoreszcens fényt bocsát ki. A mérés során a fluoreszcencia intenzitásának időbeli növekedését detektáltuk, amely közvetlenül arányos az ACE enzimaktivitásával.

A reakcióelegy 100 mM TRIS-HCl pufferben (pH 7,0) 50 mM NaCl-t és 10 μ M ZnCl₂-t tartalmazott. Az Abz-FRK(Dnp)P-OH szubsztrátot 15 μ M koncentrációban alkalmaztunk (Peptide 2.0, Chantilly, VA, USA). A szérummintákat a reakcióelegyben végső koncentrációban 35-szörös hígításban mértük. A méréseket fekete, 96 lyukú microplate lemezekon végeztük (katalógusszám: 655-900, Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Ausztria). A fluoreszcens jel detektálása ClarioStar microplate olvasóval (BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Németország) történt, 37 °C-on. A gerjesztési és emissziós hullámhosszak λ =340 nm, illetve λ =405 nm voltak. A fluoreszcencia mérését 90 percen keresztül, egyperces időközökkel végeztük, és az aktivitásszámításhoz minden esetben a reakció lineáris szakaszát használtuk fel.

Az ACE-aktivitását az alábbi összefüggés alapján számítottuk ki:

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

ahol S a fluoreszcencia-idő görbe meredeksége, k az 1 nM teljesen hidrolizált szubsztrátnak megfelelő fluoreszcencia-intenzitás, D pedig a szérumminta hígítás mértéke. Az ACE-aktivitás egységét U/L-ben fejeztük ki.

A méréseket minden mintán legalább két ismétlésben végeztük, megfelelő pozitív és negatív kontrollok alkalmazásával. Az egyes mintákra vonatkozó ACE-aktivitásértékeket az ismételt mérések átlagaként adtuk meg.

Az ACE-aktivitás meghatározása ZPHL- és HHL-szubsztrátokkal

Az ACE-fenotipizálás során az immunprecipitált ACE-aktivitását a hippuril-L-hisztidil-L-leucin (HHL) és a karbобензохи-L-fenilalanil-L-hisztidil-L-leucin (ZPHL) szubsztrátokkal határoztuk meg, Danilov és mtsi korábban leírt módszere alapján [64]. A mérés során az ACE által katalizált hidrolízis eredményeként felszabaduló His-Leu

dipeptidet o-ftáldialdehiddel származékká alakítottuk, majd az így keletkező fluoreszcens jel intenzitása alapján határoztuk meg az enzimaktivitást ($\lambda_{\text{excitációs}}=360$ nm, $\lambda_{\text{emissziós}}=530$ nm). A méréseket 96 lyukú microplate lemezekon végeztük. A reakcióelegy 0,1 M foszfát pufferben (pH 8,3), 0,3 M NaCl-t és 2 mM ZPHL (katalógusszám: 4000599, Bachem Bioscience Inc., Allentown, PA, USA) vagy 5 mM HHL (katalógusszám: H1635, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) szubsztrátot tartalmazott, amelyet 3 óráig inkubáltunk 37 °C-on folyamatos rázatással (200 rpm). Az inkubációt követően 1,4 M NaOH oldatot, majd o-ftáldialdehidet (katalógusszám: 79760, Sigma-Aldrich) adtunk a wellékhez a fluoreszcens származék képzéséhez. A reakció leállítására 2,1 M sósav oldatot alkalmaztunk, ezt követően történt a fluoreszcencia mérése ClarioStar microplate olvasóval (BMG Labtech GmbH).

A ZPHL/HHL arányt az azonos mintából ZPHL-lel, illetve HHL-lel mért fluoreszcencia-intenzitások hányadosaként határoztuk meg. A méréseket minden esetben legalább három párhuzamos ismételéssel végeztük, pozitív és negatív kontrollok mellett.

Az endogén ACE-gátlás meghatározása

Az endogén ACE-gátlás mértékét hígítási módszerrel határoztuk meg, a korábban kutatócsoportunk által publikált eljárás szerint [65]. A módszer azon az elven alapul, hogy a szérum hígításával az albumin-mediált, reverzibilis endogén ACE-gátlás fokozatosan csökken, míg nagy hígítási arány mellett az ACE-aktivitása közel gátlásmentes állapotban mérhető.

A szérumminták ACE-aktivitását fluoreszcens kinetikus módszerrel mértük 4-szeres és 400-szoros hígításon. A két hígításon mért, hígítási tényezőkkel korrigált aktivitásértékek összehasonlításából számítottuk az endogén ACE-gátlás mértékét az alábbi összefüggés alapján:

$$\text{ACE-gátlás (\%)} = 100 - (\text{ACE-aktivitás 4-szeres hígításban} / \text{ACE-aktivitás 400-szoros hígításban} \times 100)$$

Abban az esetben, ha az endogén ACE-gátlás mértéke meghaladja a 80%-ot ACE-gátló gyógyszer jelenlétére utal a szérummintában.

Szérum HSA-koncentráció meghatározása

A HSA koncentrációját Cobas Integra 400 Plus klinikai kémiai analizátoron (Roche Diagnostics, Basel, Svájc) határoztuk meg, a gyártó brómkrezolzöld alapú reagenskészletével (katalógusszám: 03183688122). A méréseket a Roche által előírt protokoll szerint végeztük, és az eredményeket g/L-ben fejeztük ki.

Szérum szabadzsírsav-koncentráció meghatározása

A szérum teljes szabadzsírsav-koncentrációját a HSA-meghatározással azonos klinikai kémiai analizátoron, Cobas Integra 400 Plus készüléken határoztuk meg (Roche Diagnostics), kolorimetriás enzimatikus módszerrel. A mérésekhez Dialab szabadzsírsav reagenskészletet alkalmaztunk (katalógusszám: D07940, Dialab, Neudorf, Ausztria), a gyártó által biztosított kalibrátorok és kontrollok felhasználásával, a gyártó utasításainak megfelelően. Az eredményeket mmol/L-ben fejeztük ki.

Zsírsavak eltávolítása albuminról aktív szénnel

A HSA-ról a kötött szabad zsírsavakat aktív szén alkalmazásával távolítottuk el. Kiindulásként HSA oldatot használtunk (Albunorm, 200 g/L infúziós oldat, Octapharma, Lachen, Svájc), amelyet desztillált vízzel 100 g/L végkoncentrációra hígítottunk. Az albuminoldathoz aktív szénport adtunk 20% (m/V) végkoncentrációban (katalógusszám: C9157, Sigma-Aldrich), majd a szuszpenziót szobahőmérsékleten, folyamatos forgatás mellett (15 rpm) 24 órán keresztül inkubáltuk.

Az inkubációt követően az aktív szenet 20000 g-n, 30 percig, +4 °C-on végzett centrifugálással távolítottuk el. A felülúszót összegyűjtöttük, majd a zsírsavmentes albuminoldatot vákuumcentrifuga segítségével (miVac DUO Concentrator, GeneVac Inc., Ipswich, Egyesült Királyság) körülbelül 200 g/L koncentrációra sűrítettük. A kapott oldatot 0,2 µm pórusméretű membránszűrőn átszűrve sterilizáltuk (katalógusszám: 4652, Pall Life Sciences, Cornwall, Egyesült Királyság). A HSA koncentrációját a további felhasználás előtt meghatároztuk.

Albumin kezelése meghatározott zsírsavakkal

A zsírsavmentes HSA-t adott zsírsavakkal kezeltük az albumin-zsírsav komplexek előállításához. Az egyes zsírsavak nátriumsóját 4:1 moláris arányban (FA:HSA) kevertük a zsírsavmentes HSA-oldathoz. A reakcióelegy 50 mM NaCl-t tartalmazott, és a kezelést szobahőmérsékleten, folyamatos forgatás mellett (15 rpm) egy éjszakán át végeztük.

Az inkubációt követően a nem kötődött zsírsavakat ultrafiltrációval távolítottuk el (Vivaspin 20, 30 kDa molekulatömeg-határ; katalógusszám: 28-9323-61, GE Healthcare, Buckinghamshire, Egyesült Királyság). A kezelt HSA-t ezt követően három egymást követő lépésben desztillált vízzel mostuk, minden mosási lépést követően azonos ultrafiltrációs eszközzel visszakoncentrálva a mintát. A HSA-koncentrációt a kezelés végén brómkrezolzöld módszerrel határoztuk meg. A fenti eljárást minden vizsgált zsírsav esetében azonos módon alkalmaztuk.

Rekombináns humán ACE előállítása és tisztítása

A rekombináns humán angiotenzin-konvertáló enzim (recACE) előállításához N-terminális His-taggel ellátott, rovarsejtes expresszióra optimalizált plazmidot használtunk (egyedi klón; katalógusszám: CS-Y4341-I03-02, GeneCopoeia, Rockville, MD, USA). A membránkötő régiót kódoló szakaszt eltávolítottuk, aminek következtében a rekombináns ACE szolúbilis formában termelődött. A plazmidot (10 ng) DH10Bac kompetens *E. coli* sejtekbe (100 μ L, katalógusszám: 10361-012, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) juttattuk hősokk (45 s, 42 °C) alkalmazásával, majd az így előállított bacmidokat izoláltuk (HiSpeed Plasmid Maxi Kit, katalógusszám: 12662, Qiagen, Hilden, Németország).

A bacmidokat Sf9 rovarsejtekbe (katalógusszám: 11496-015, Thermo Fisher Scientific) transzfektáltuk Cellfectin II reagens segítségével (480 ng bacmid, 40 μ g/mL Cellfectin II-t tartalmazó SF900 médiumban, katalógusszám: 10362100, Thermo Fisher Scientific), ezt követően a képződött baculovírusokat friss Sf9 sejt kultúrák fertőzésére használtuk. A sejteket szérumentes tápoldatban (Sf-900 II SFM, katalógusszám: 10902153, Thermo Fisher Scientific), 1 μ M ZnCl₂ jelenlétében, 28 °C-on tenyésztettük. A rekombináns fehérje termelődését a felülúszó ACE-aktivitásának mérésével követtük; a recACE a fertőzést követő negyedik napon érte el maximális enzimaktivitását. Ekkor a tápoldat felülúszóját begyűjtöttük további feldolgozás céljából.

A rekombináns fehérje tisztítását immobilizált fémion-affinitás kromatográfiával végeztük Ni-NTA Superflow agaróz oszlopon (katalógusszám: 25215, Thermo Fisher

Scientific). A recACE-t tartalmazó felülúszót egy 10 mL gyantával töltött oszlopra vittük fel állandó, 1 mL/perc áramlási sebességgel. A recACE-t tartalmazó mintát 10 percen keresztül, alacsony imidazol-koncentrációjú foszfátpufferben vittük fel az oszlopra (200 mM Na₃PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol; pH 7,4). Ezt egy 10 perces mosási lépés követte (20 mM Na₃PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol; pH 7,4), majd a fehérjét 10 percen keresztül, magas imidazol-koncentrációjú pufferrel eluáltuk (20 mM Na₃PO₄, 300 mM NaCl, 300 mM imidazol; pH 7,4). A recACE-t tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük, és 100 kDa molekulatömeg-határú centrifuga csövekkel koncentráltuk (Vivaspin 500; katalógusszám: Z614092; Sigma-Aldrich)

A tisztított recACE-t 100 mM TRIS pufferben (pH 7,0), 50% (v/v) glicerol jelenlétében –20 °C-on tároltuk a további kísérletekig.

ACE immunprecipitálása és kezelése HSA-val

Az ACE immobilizálását nagy kötőképességű, 96 lyukú ELISA lemezekon végeztük (katalógusszám: 655061, Greiner Bio-One). A lemezeket 0,6 µg/well koncentrációban kecske anti-egér IgG-vel vontuk be (katalógusszám: 31168, Pierce, Rockford, IL, USA), majd 37 °C-on, folyamatos vízszintes rázatás mellett (200 rpm) 2 órán keresztül inkubáltuk. Az inkubációt követően a lemezeket 0,05% Tween-20 tartalmú PBS pufferrel (katalógusszám: 14190-094, Thermo Fisher Scientific), PBST-vel mostuk.

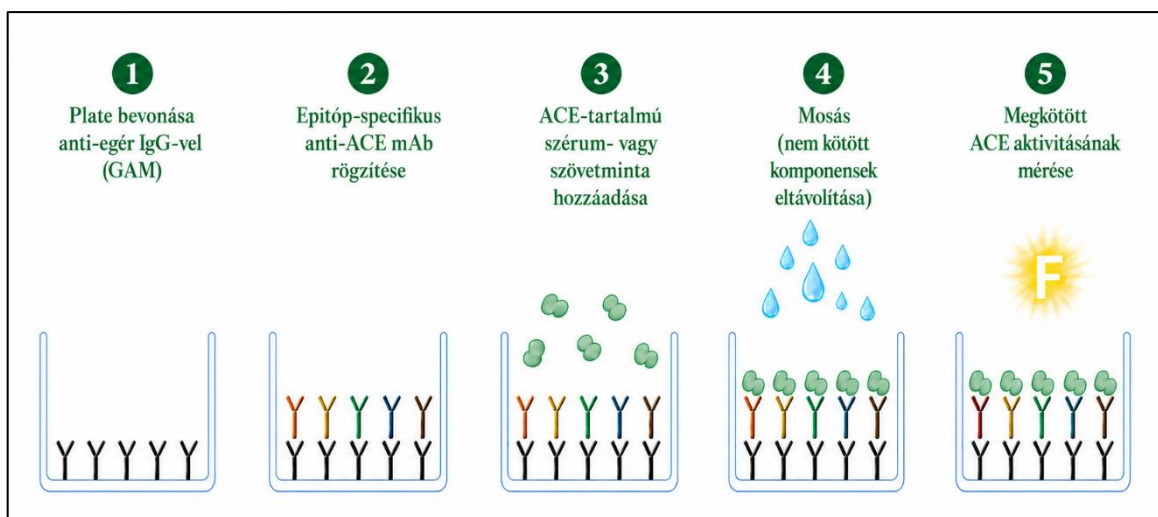
Ezt követően a welleket 0,5 µg/well mennyiségű, egérben termelt monoklonális anti-ACE antitesttel töltöttük fel (9B9 epitópot felismerő, 10 µg/mL koncentrációban, 1 m/V% BSA-t tartalmazó PBS-ben oldva), majd kétszeri PBST-mosást végeztünk. Az ACE-t tartalmazó mintákat 1 m/V% BSA-t (katalógusszám: A7906, Sigma-Aldrich) tartalmazó PBS-ben hígítottuk és adtuk az antitesttel bevont wellekbe, majd az előzőekkel azonos körülmények között inkubáltuk. Az inkubációt követően a lemezeket kétszer PBST-vel és egyszer PBS-sel mostuk.

Az immunprecipitált szöveti ACE albumin-mediált gátlásának vizsgálata céljából a lemezeket HSA-val kezeltük. Kontroll HSA-t és zsírsavmentes HSA-t felező sorozathígításban adtuk a wellekhez, 90 g/L koncentrációtól kiindulva, majd az ACE-aktivitását a korábban leírt fluoreszcens kinetikus módszerrel határoztuk meg. A méréseket minden mintán három ismétlésben végeztük, megfelelő pozitív és negatív kontrollok alkalmazásával.

ACE-fenotipizálás monoklonális antitestekkel

Az ACE fenotipizálását az immunprecipitáláshoz hasonló elrendezésben, azonban különböző epitópot felismerő, egérben termelt monoklonális anti-ACE antitestek alkalmazásával végeztük. A 96 lyukú lemezeket kecske anti-egér IgG-vel vontuk be, majd erre kapcsoltuk az egyes epitóp-specifikus mAb-eket, az immunprecipitálásnál alkalmazott pufferösszetétel és inkubációs feltételek mellett. Ezt követően az ACE-t tartalmazó szérumszöveti mintákat adtuk hozzá a wellékhez, lehetővé téve az enzim kötődését az adott epitópot felismerő antitesteken keresztül (2. ábra). Az inkubáció után a lemezeket PBST-vel mostuk a nem kötődött komponensek eltávolítására.

Az antitestek által rögzített ACE-aktivitását a korábban leírt fluoreszcens kinetikus módszerrel, vagy ZPHL szubsztrát alkalmazásával határoztuk meg. Az egyes antitestekkel rögzített ACE-mintákban mért aktivitásértékeket kontroll mérésekhez viszonyítva értékeltük. Az így kapott aktivitási és kötődési mintázatok lehetővé tették az ACE fenotípusos eltéréseinek jellemzését, mivel az egyes epitóp-specifikus antitestek kötődése érzékenyen tükrözi az enzim konformációs állapotát, valamint a poszttranszlációs módosítások, különösen a glikoziláció és szialiláció, jelenlétét és mértékét.



2. ábra: Az ACE fenotipizálásának sematikus ábrázolása epitóp-specifikus mAb-k alkalmazásával. A különböző, egérben termelt monoklonális anti-ACE antitestek eltérő epitópot ismernek fel az ACE felszínén, lehetővé téve az enzim különböző konformációs és poszttranszlációs módosításokkal jellemezhető formáinak szelektív rögzítését. Az egyes antitestek által rögzített ACE-aktivitásának és kötődési mintázatának összehasonlítása alapot szolgáltat a keringő és szöveti ACE fenotípusos eltéréseinek vizsgálatához.

DNS-izolálás és teljes exom szekvenálás

Az atípusos fenotípust mutató esetekben az ACE-gént kódoló régiókat érintő genetikai eltérések jelenlétének kizárására vagy igazolására teljes exom szekvenálást végeztünk. A genomi DNS izolálását QIAamp DNA Mini kittel végeztük (Qiagen) a gyártó utasítása szerint. A teljes exom szekvenálást és a szekvenálási adatok elemzését külső szolgáltató végezte (Novogene, Sacramento, CA, USA).

Statisztikai analízis

A koncentráció-hatás kísérletek adatait négyparaméteres logisztikai gátlási modellel (four-parameter logistic inhibition) illesztettük. Az illesztésekből IC_{50} értékeket és 95%-os konfidencia intervallumokat (profil valószínűség) számítottunk.

Az egyes zsírsavakkal kezelt albuminminták és a zsírsavmentes albumin IC_{50} értékei közötti különbségeket extra-sum-of-squares F-teszt („Compare fits” opció) segítségével hasonlítottuk össze. Az előre tervezett többszörös statisztikai tesztelés figyelembevétele érdekében a p-értékeket a Holm–Šidák-módszerrel korrigáltuk.

Az endogén ACE-gátlás mértékének független meghatározóit, beleértve a szérumszintű HSA-koncentrációt és egyéb kovariánsokat, többváltozós lineáris regresszióval (ordinary least squares) vizsgáltuk. A modellekben szereplő kovariánsok független hatását teljes esetszámú (complete-case) elemzésekben vizsgáltuk. A regressziós modellek illeszkedését a reziduális eloszlás (residual normality) vizsgálatával és a multikollinearitás ellenőrzésével (variance inflation factor, VIF) értékeltük.

A folytonos változók eloszlását normalitásvizsgálattal ellenőriztük. Az adatok nem normál eloszlása esetén az eredményeket medián [interkvartilis tartomány] formájában adtuk meg, és a csoportok közötti különbségeket Mann–Whitney U-próbával elemeztük. Kategóriás változók összehasonlítására khi-négyzet (χ^2) próbát alkalmaztunk. Az ACE-fenotipizálási vizsgálatok során az egyes mintákra vonatkozó értékeket 2–5 független mérés átlag±szórás formájában fejeztük ki, és az összehasonlításokat Mann–Whitney-próbával végeztük.

A statisztikai elemzésekhez GraphPad Prism v10 szoftvert használtunk (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Etikai engedélyek

Az endogén ACE-gátlás és a HSA koncentráció közötti összefüggések vizsgálatába bevont 161 fős betegcsoport esetében a kutatási protokollt a Debreceni Egyetem Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága, valamint az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá (ETT TUKEB, engedélyszám: 33327-1/2015/EKU; jóváhagyás dátuma: 2015. június 23.).

Az endogén ACE-gátlás és a teljes szabadzsírsav-koncentráció kapcsolatának elemzéséhez felhasznált, diagnosztikai céllal érkezett 101 szérumminta adatainak feldolgozását a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte (engedélyszám: 5925-2021; jóváhagyás dátuma: 2021. december 15.).

A humán szövetminták (tüdő-, szív- és nyirokcsomószövet) gyűjtése a Debreceni Egyetem, Klinikai Központ Klinikáin végzett sebészeti beavatkozások során történt, a vonatkozó etikai engedélyek birtokában. A vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága, valamint az Egészségügyi Tudományos Tanács engedélyezte (jóváhagyási kódok: 4375-2015; 20753-7/2018/EÜIG). Valamennyi eljárás az intézményi irányelveknek és az Egészségügyi Világszövetség Etikai Kódexének (Helsinki Nyilatkozat) megfelelően történt.

A vizsgálatban részt vevő valamennyi önkéntes és beteg írásos, tájékozott beleegyező nyilatkozatot adott vér- és szövetmintái kutatási célú felhasználásához.

EREDMÉNYEK

Betegcsoportok jellemzése

A vizsgálatba az **endogén ACE-gátlás mértékét és a HSA koncentrációját** összevető elemzésekhez bevont **161 fős populáció** demográfiai és laboratóriumi jellemzőit a T1. táblázat foglalja össze. A folytonos változók medián [IQR] értéként szerepelnek, ahol a szögletes zárójelben megadott értékek az interkvartilis tartományt jelölik. A vizsgálati csoport 71 nőből és 90 férfiből állt. Az életkor mediánja a teljes populációban 52,0 év volt [39,0–60,0 év], nem mutatkozott szignifikáns különbség a nők (52,0 [37,0–57,0] év) és a férfiak (52,7 [40,8–63,3] év) életkora között ($p=0,2206$). A testtömegindex medián értéke a teljes populációban 27,2 kg/m² volt [24,3–30,0 kg/m²], a férfiaknál valamivel magasabb BMI-érték volt megfigyelhető (28,1 [25,0–30,1] kg/m²), mint nőknél (25,8 [23,1–29,9] kg/m²; $p=0,1219$).

A vesefunkciós paraméterek közül a szérum kreatinin-koncentráció medián értéke férfiaknál szignifikánsan magasabb volt (76 [64–89] µmol/L), mint nőknél (58 [49–70] µmol/L; $p<0,0001$). A becsült glomeruláris filtrációs ráta (eGFR) medián értéke mindkét nemnél meghaladta a 90 mL/perc/1,73 m²-t. Az urea koncentráció mediánja a teljes populációban 4,6 mmol/L volt [3,8–5,7 mmol/L], míg a teljes bilirubinszint medián értéke 7,7 µmol/L-nek adódott [5,5–11,0 µmol/L], egyik paraméter esetében sem volt kimutatható szignifikáns nemi különbség (urea $p=0,2361$; bilirubin $p=0,5512$).

A szérum ACE-aktivitás medián értéke a teljes populációban 9,71 U/L volt [7,61–11,34 U/L], míg az endogén ACE-gátlás mértéke medián 66,38%-nak adódott [56,48–71,84%]. Sem az ACE-aktivitás (nők: 9,81 [7,95–11,31] U/L; férfiak: 9,41 [7,23–11,66] U/L; $p=0,4376$), sem az endogén ACE-gátlás mértéke (nők: 66,85% [54,10–71,78%]; férfiak: 65,74% [59,50–71,93%]; $p=0,8953$) tekintetében nem volt kimutatható szignifikáns különbség a nemek között. A HSA koncentrációja a teljes populációban 44,0 g/L volt [41,0–46,5 g/L], és hasonlóan alakult nőknél (45,0 [41,0–46,6] g/L) és férfiaknál (44,0 [40,8–46,1] g/L; $p=0,4134$).

A klinikai jellemzők közül hipertónia 75 esetben fordult elő (nők: 32 fő; férfiak: 43 fő), míg diabetes mellitus 20 betegnél volt jelen (nők: 7 fő; férfiak: 13 fő). A bal kamrai ejekciós frakció medián értéke a teljes populációban 59% volt [56–63%], nőknél 60% [57–63%], férfiaknál pedig 58% [55–64%], szignifikáns nemi különbség nélkül ($p=0,1969$).

Összességében a vizsgált 161 fős populáció demográfiai és laboratóriumi jellemzői kiegyensúlyozottak voltak; a nemek közötti különbségek elsősorban a szérum kreatinin-

koncentrációra korlátozódtak, míg az ACE-aktivitás, az endogén ACE-gátlás és a szérumban albumin koncentrációja tekintetében nem volt kimutatható szignifikáns eltérés.

	Nő	Férfi	Összes
n	71	90	161
Kor (évek, medián [IQR])	52,0 [37,0–57,0]	52,7 [40,8–63,3]	52,0 [39,0–60,0]
BMI (kg/m ² , medián [IQR], n nő/férfi=56/61)	25,8 [23,1–29,9]	28,1 [25,0–30,1]	27,2 [24,3–30,0]
Kreatinin (μmol/L, medián [IQR], n nő/férfi=49/58)	58 [49–70]*	76 [64–89]*	67 [57–82]
Urea (mmol/L, medián [IQR], n nő/férfi = 49/55)	4,5 [3,7–5,7]	4,8 [3,9–5,7]	4,6 [3,8–5,7]
eGFR (mL/min/1.73m ² , medián [IQR], n nő/férfi=49/58)	90 [90–90]	90 [90–90]	90 [90–90]
Össz. bilirubin (μmol/L, medián [IQR], n nő/férfi=24/40)	7,4 [5,4–10,2]	8,0 [5,7–11,2]	7,7 [5,5–11,0]
Szérumban ACE-aktivitás (U/L, medián [IQR])	9,81 [7,95–11,31]	9,41 [7,23–11,66]	9,71 [7,61–11,34]
Endogén ACE-gátlás (% , medián [IQR])	66,85 [54,10–71,78]	65,74 [59,50–71,93]	66,38 [56,48–71,84]
HSA-koncentráció , (g/L, medián [IQR])	45,0 [41,0–46,6]	44,0 [40,8–46,1]	44,0 [41,0–46,5]
Magas vérnyomás (n)	32	43	75
Diabetes mellitus (n)	7	13	20
Bal kamrai ejekciós frakció (% , medián [IQR])	60 [57–63]	58 [55–64]	59 [56–63]

T1. táblázat: Az endogén ACE-gátlás és a HSA koncentráció közötti összefüggések vizsgálatába bevont populáció demográfiai és laboratóriumi jellemzői (n=161). A folytonos változókat medián [interkvartilis tartomány] formájában, a kategorikus változókat esetszámként (n) tüntettük fel. A nők és férfiak közötti különbségek vizsgálatát folytonos változók esetén Mann–Whitney U-próbával (nem paraméteres, kétmintás, kétoldali), kategorikus változók esetén khi-négyzet (χ^2) próbával végeztük (hipertónia, diabetes mellitus, bal kamrai ejekciós frakció). Az egyedi p-értékeket nem tüntettük fel; csillag (*) jelöli a statisztikailag szignifikáns eltérést ($p < 0,05$), csillag hiányában az eltérés nem szignifikáns ($p \geq 0,05$). Hiányzó adatok esetén az adott paraméternél a rendelkezésre álló esetszámot (n) külön jelöltük a sor elején.

A szérumban teljes szabadzsírsav-koncentrációját és az endogén ACE-gátlás mértékét összevető elemzésekhez bevont 101 fős vizsgálati populáció demográfiai és laboratóriumi jellemzőit a T2. táblázat foglalja össze. A vizsgálati csoport 55 nőből és 46 férfiból állt. Az életkor mediánja a teljes populációban 49,6 év volt [39,2–65,3 év], a nők

életkora szignifikánsan magasabbnak bizonyult (55,6 év [42,4–67,2 év]), mint a férfiaké (46,7 év [36,3–60,1 év]; $p=0,0167$).

A szérum ACE-aktivitás medián értéke a teljes populációban 10,79 U/L volt [9,80–12,75 U/L], és nem mutatott szignifikáns különbséget a nők (10,47 [9,78–12,61] U/L) és a férfiak (10,94 [9,74–12,94] U/L; $p=0,5008$) között. Az endogén ACE-gátlás medián mértéke 61,27% volt [55,32–68,79%], amely hasonlóan alakult a női (62,20% [57,47–68,12%]) és a férfi (60,64% [54,03–69,08%]; $p=0,6084$) alcsoportban.

A szérum teljes szabadzsírsav-koncentráció (FFA) medián értéke 0,505 mmol/L-nek adódott [0,254–0,737 mmol/L], míg a HSA koncentrációja 44,87 g/L volt [42,02–47,40 g/L]. Ennek megfelelően az FFA:HSA arány medián értéke a teljes populációban 0,75 volt [0,38–1,15], nem mutatva szignifikáns eltérést a nemek között (FFA $p=0,3742$; HSA $p=0,7953$).

A gyulladásos státuszt jellemző hsCRP medián koncentrációja 4,84 mg/L volt [1,71–14,79 mg/L]. A vesefunkciós paraméterek közül a szérum kreatinin (nők: 62 [52–69] $\mu\text{mol/L}$; férfiak: 79 [69–89] $\mu\text{mol/L}$; $p<0,0001$) és az urea (nők: 4,5 [3,8–5,7] mmol/L; férfiak: 5,5 [4,1–6,3] mmol/L; $p=0,0351$) koncentrációja férfiaknál szignifikánsan magasabb volt. A becsült glomeruláris filtrációs ráta (eGFR) medián értéke mindkét nemben meghaladta a 90 mL/perc/1,73 m²-t, megtartott vesefunkciót jelezve. A teljes bilirubin koncentrációja nem mutatott szignifikáns nemi különbséget ($p=0,7469$).

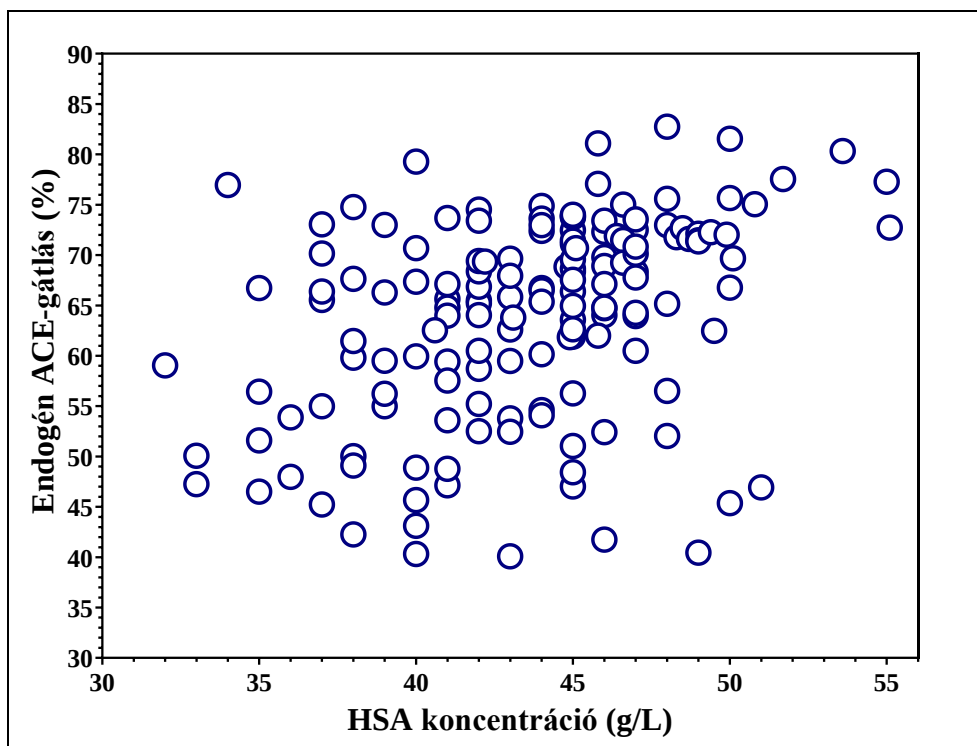
A populáció demográfiai és laboratóriumi paraméterei összességében egységes képet mutattak. A nemek közötti eltérések elsősorban az életkorban és egyes vesefunkciós paraméterekben jelentkeztek, míg az ACE-hoz kapcsolódó paraméterek, valamint a szérum albumin- és szabadzsírsav-szintek nem mutattak szignifikáns különbséget.

	Nő	Férfi	Összes
n	55	46	101
Kor (évek, medián [IQR])	55,6 [42,4–67,2]*	46,7 [36,3–60,1]*	49,6 [39,2–65,3]
Szérum ACE-aktivitás (U/L, medián [IQR])	10,47 [9,78–12,61]	10,94 [9,74–12,94]	10,79 [9,80–12,75]
Endogén ACE-gátlás (% , medián [IQR])	62,20 [57,47–68,12]	60,64 [54,03–69,08]	61,27 [55,32–68,79]
FFA-koncentráció (mM, medián [IQR])	0,508 [0,285–0,782]	0,501 [0,217–0,721]	0,505 [0,254–0,737]
HSA-koncentráció (g/L, medián [IQR])	44,69 [42,04–47,46]	44,99 [42,02–47,44]	44,87 [42,02–47,40]
FFA:HSA arány	0,77 [0,42–1,16]	0,72 [0,33–1,06]	0,75 [0,38–1,15]
hsCRP (mg/L, medián [IQR], n nő/férfi = 37/30)	5,54 [1,66–15,46]	4,59 [1,95–12,75]	4,84 [1,71–14,79]
Kreatinin (μmol/L, medián [IQR], n nő/férfi = 41/39)	62 [52–69]*	79 [69–89]*	69 [59–81]
Urea (mmol/L, medián [IQR], n nő/férfi = 41/39)	4,5 [3,8–5,7]*	5,5 [4,1–6,3]*	5,1 [4,0–6,0]
eGFR (mL/min/1.73m ² , medián [IQR], n nő/férfi = 41/39)	90 [82–90]	90 [90–90]	90 [86–90]
Össz. bilirubin (μmol/L, medián [IQR], n nő/férfi = 21/10)	71 [67–76]	70 [66–75]	71 [67–75]

T2. táblázat: Az endogén ACE-gátlás és a szérum FFA-koncentráció közötti összefüggések vizsgálatába bevont populáció (n=101) demográfiai és laboratóriumi jellemzői. A folytonos változókat medián [interkvartilis tartomány] formában tüntettük fel, míg a kategorikus változók esetszámként (n) szerepelnek. A nők és férfiak közötti különbségeket folytonos változók esetében Mann–Whitney U-próbával, kategorikus változók esetében khi-négyzet (χ^2) próbával értékeltük. Az egyedi p-értékeket nem tüntettük fel; a csillag (*) statisztikailag szignifikáns különbséget jelez ($p < 0,05$), csillag hiányában az eltérés nem szignifikáns ($p \geq 0,05$). Hiányzó adatok esetén az adott paraméternél a rendelkezésre álló esetszámot (n) külön jelöltük a sor elején.

A HSA-koncentráció és az endogén ACE-gátlás kapcsolata

Az endogén ACE-gátlás mértékét és a HSA koncentrációját 161 vizsgálati személy szérummintájában határoztuk meg (3. ábra). Az endogén ACE-gátlás mértéke a HSA-koncentráció növekedésével együtt emelkedett, a két paraméter között szoros pozitív kapcsolat volt kimutatható (Spearman-féle rangkorreláció: $\rho = 0,422$; 95% CI: 0,281–0,544; $p < 0,0001$). Ugyanakkor az illesztés alacsony r^2 értéke (0,164) arra utal, hogy az endogén ACE-gátlás alakulását az albumin koncentrációja mellett további tényezők is befolyásolják.



3. ábra: Az endogén ACE-gátlás és a HSA koncentrációjának összefüggése. Az ábra az endogén ACE-gátlásának és a HSA-koncentrációjának kapcsolatát szemlélteti 161 vizsgálati személy szérum mintájában. Az egyes pontok az individuális mérési adatokat jelölik, a folytonos vonal az adatokra illesztett lineáris regressziót mutatja ($r^2=0,164$).

Többváltozós lineáris regressziós elemzéseket végeztünk annak vizsgálatára, hogy a HSA-koncentráció és az endogén ACE-gátlás közötti kapcsolat fennmarad-e egyéb tényezők figyelembevételét követően. Az életkorra és nemre korrigált modellben ($n=161$) a HSA-koncentráció továbbra is önálló, pozitív kapcsolatot mutatott az endogén ACE-gátlás mértékével, a modell egészében szignifikáns volt ($F(3,157)=11,60$; $p<0,0001$), illeszkedése $r^2=0,1815$ értéket mutatott.

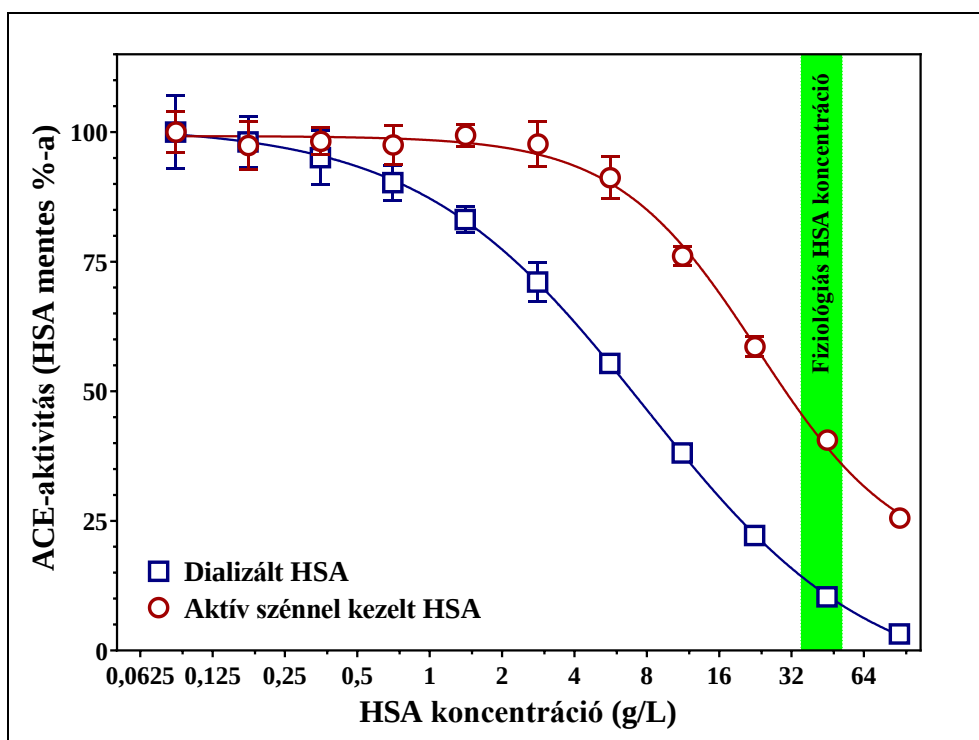
A klinikai kovariánsokra rendelkezésre álló teljes esetszámú almintán ($n=87$) az életkorra és nemre korrigált modell illeszkedése $r^2=0,1107$ volt ($F(3,83)=3,444$; $p=0,0204$). A BMI és eGFR bevonásával kiterjesztett modellben az összefüggés fennmaradt, a modell illeszkedése $r^2=0,1893$ -ra nőtt ($F(5,81)=3,782$; $p=0,0040$).

A kisebb elemszámú, a teljes bilirubinszintet mint albuminhoz kötődő ligandumot is tartalmazó elemzés leíró jellegű volt az alacsony elemszám miatt ($n=64$); a modell egészében nem bizonyult szignifikánsnak ($F(4,59)=1,719$; $p=0,1578$; $r^2=0,1044$).

Az ACE-gátlás zsírsavak jelenlétében és hiányában

A HSA ismert módon számos vízdékony és vízben nem oldódó molekula hordozófehérjéje. A klinikai gyakorlatban alkalmazott albuminkészítményeket jellemzően dialízissel tisztítják, amely során a vízdékony komponensek eltávolításra kerülnek, míg a vízben nem oldódó, albuminhoz kötött molekulák megmaradnak. Az ilyen módon **dializált HSA** a rekombináns ACE aktivitását koncentrációfüggő módon csökkentette ($IC_{50}=7,84$ [6,58–9,75] g/L), és fiziológiás albuminkoncentráció mellett közel teljes gátlást eredményezett ($\approx 90\%$ gátlás 45 g/L HSA-nál; 4. ábra).

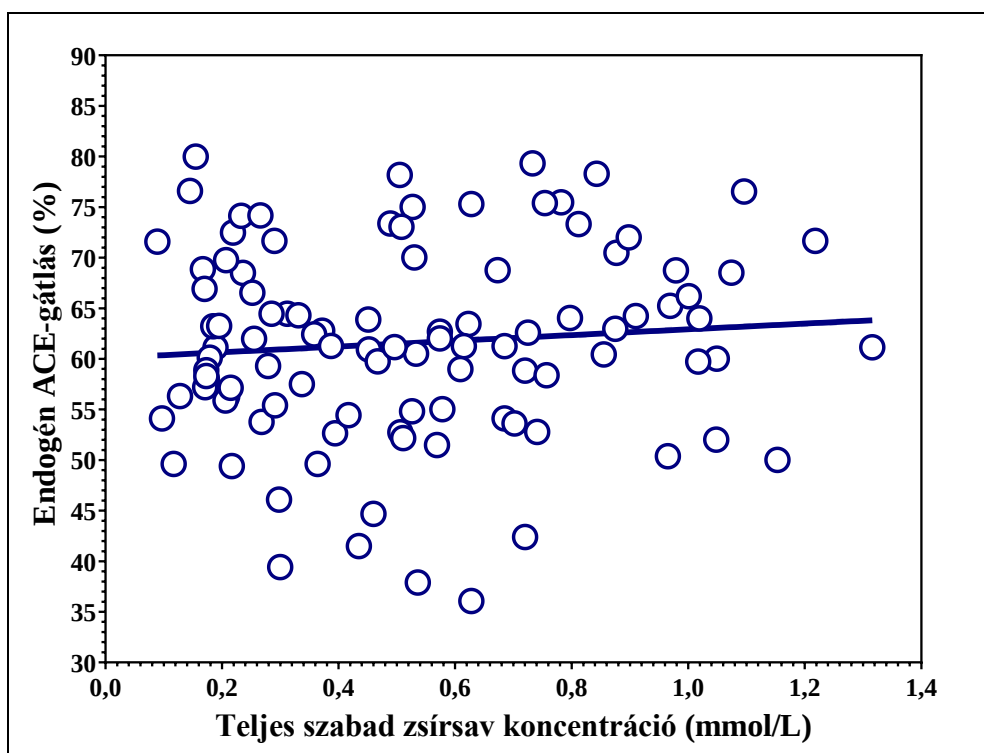
Ezzel szemben az aktív szénnel kezelt, **zsírsavmentesített HSA** ACE-gátló hatása lényegesen gyengébbnek bizonyult ($IC_{50}=23,24$ [19,40–29,78] g/L; $p<0,001$; Holm–Šidák-korrektúra után $p=0,001$), és fiziológiás koncentráción az ACE aktivitás jelentős része megmaradt ($\approx 41\%$ 45 g/L HSA mellett).



4 ábra: Dialízissel tisztított és aktív szénnel kezelt HSA hatása a rekombináns ACE-aktivitásra. Az ábra a HSA rekombináns ACE-aktivitásra gyakorolt hatását mutatja koncentrációfüggő elrendezésben. A dialízissel tisztított HSA-ról (kék négyzetek) a vízdékony komponensek eltávolításra kerültek. Az aktív szénnel kezelt, zsírsavmentes HSA-t piros körök jelölik. Az adatok három független mérés átlagát és szórását ábrázolják. A zöld sáv a fiziológiás HSA-koncentráció tartományát (35–52 g/L) jelöli.

A szérumszabadszűrőkoncentráció és az endogén ACE-gátlás közötti kapcsolat vizsgálata

A szérumszabadszűrőkoncentrációját és az endogén ACE-gátlás mértékét 101 vizsgálati személy esetében határoztuk meg, majd a két paraméter közötti összefüggést elemeztük (5. ábra). A szérumszabadszűrőkoncentráció és az endogén ACE-gátlás mértéke között nem volt kimutatható szignifikáns kapcsolat (Spearman-féle rangkorreláció: $\rho=0,088$; $p=0,380$; $r^2=0,008$), az endogén ACE-gátlás mértékét a szabadszűrőkoncentrációja önmagában nem határozza meg.



5. ábra: A szérumszabadszűrőkoncentrációjának és az endogén ACE-gátlás kapcsolata. Az ábra a szérumszabadszűrőkoncentráció és az ACE-gátlás mértéke közötti összefüggést szemlélteti 101 vizsgálati személy esetében. Az egyes adatpontok az egyéni méréseket jelölik. A folytonos vonal a legjobban illeszkedő lineáris regressziós egyenest mutatja (Spearman-féle rangkorreláció: $\rho=0,088$; $p=0,380$; $r^2=0,008$).

Ez az eredmény multivariábilis lineáris regressziós elemzésekben is fennmaradt. Az életkorra ($p=0,111$), nemre ($p=0,715$) és a HSA-koncentrációra ($p=0,072$) korrigált modellben ($n=101$) a teljes szabadszűrőkoncentráció nem mutatott önálló kapcsolatot az endogén ACE-gátlás mértékével ($p=0,863$).

Az érzékenységi elemzésekben, amelyekben további kovariánsokat vontunk be, az összefüggés továbbra sem volt kimutatható ($p=0,999$). A hsCRP-t ($p=0,079$) és eGFR-t ($p=0,453$) is tartalmazó modellben ($n=65$) a regresszió nem módosult. Hasonló eredményre

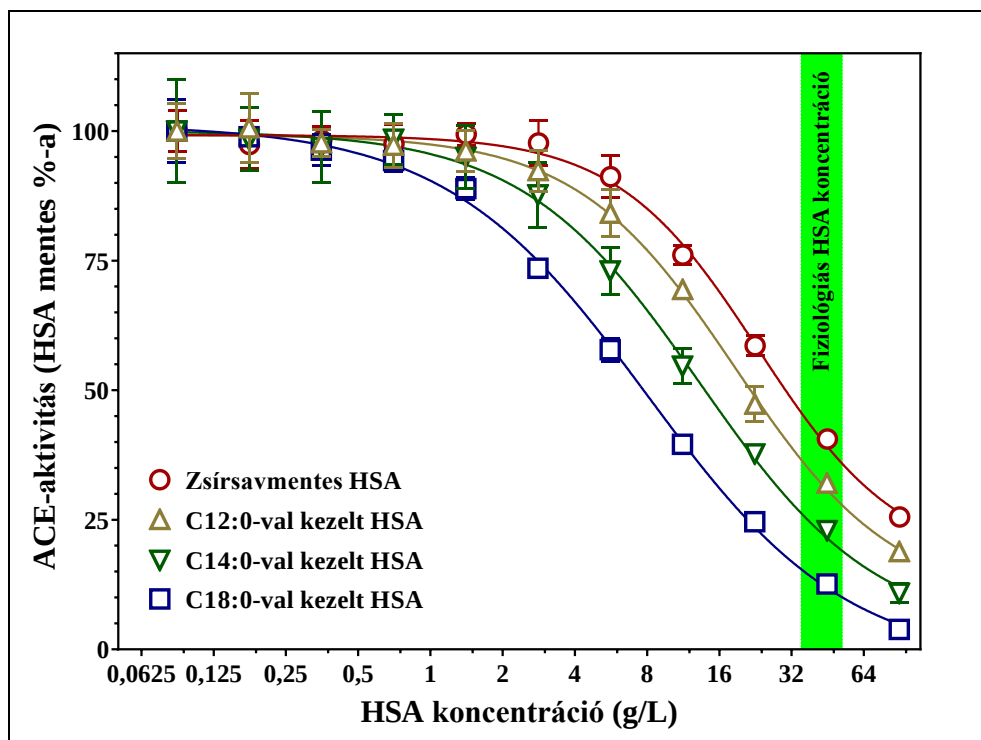
vezetett a teljes bilirubinszintet ($p=0,271$) mint albuminhoz kötődő ligandumot bevonó elemzés is ($n=55$).

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

Mivel a HSA különböző zsírsavakat eltérő affinitással köt, és ezek a ligandumok az albumin konformációját különböző módon befolyásolhatják, azt feltételeztük, hogy az ACE-gátlás mértékét nem a szabad zsírsavak mennyisége, hanem azok minősége határozza meg. Ennek vizsgálatára zsírsavmentes albumint **különböző telített zsírsavakkal (SFA-k)** kezeltünk, majd az így előállított albumin-zsírsav komplexek ACE-gátló hatását elemeztük (6. ábra).

A **dodekánsavval** (C12:0) kezelt albumin ACE-gátló hatása nem különbözött szignifikánsan a zsírsavmentes albuminétól ($IC_{50}=18,69$ [15,36–24,97] g/L vs. 23,24 [19,40–29,78] g/L; $p=0,170$). Fiziológias albuminkoncentráció mellett (45 g/L) az ACE-gátlás mértéke dodekánsavval (C12:0) kezelt albumin esetén $67,9\pm0,4\%$, míg zsírsavmentes albumin jelenlétében $59,4\pm1,4\%$ volt.

Ezzel szemben a mirisztinsavval (C14:0) és sztearinsavval (C18:0) kezelt albumin jelentősen fokozta az ACE-gátlás mértékét. **Mirisztinsav** jelenlétében az IC_{50} érték 13,26 [10,19–19,86] g/L-re csökkent, és fiziológias albuminkoncentráció mellett az ACE-gátlás elérte a $77,1\pm1,0\%$ -ot ($p=0,006$; Holm–Šidák-korrektúra után $p=0,023$). **Sztearinsavval** történő kezelés esetén az ACE-gátló hatás tovább erősödött ($IC_{50}=7,98$ [7,04–9,23] g/L), és 45 g/L albumin mellett az ACE-gátlás $87,4\pm0,6\%$ -nak adódott ($p<0,001$; Holm–Šidák-korrektúra után $p=0,001$).



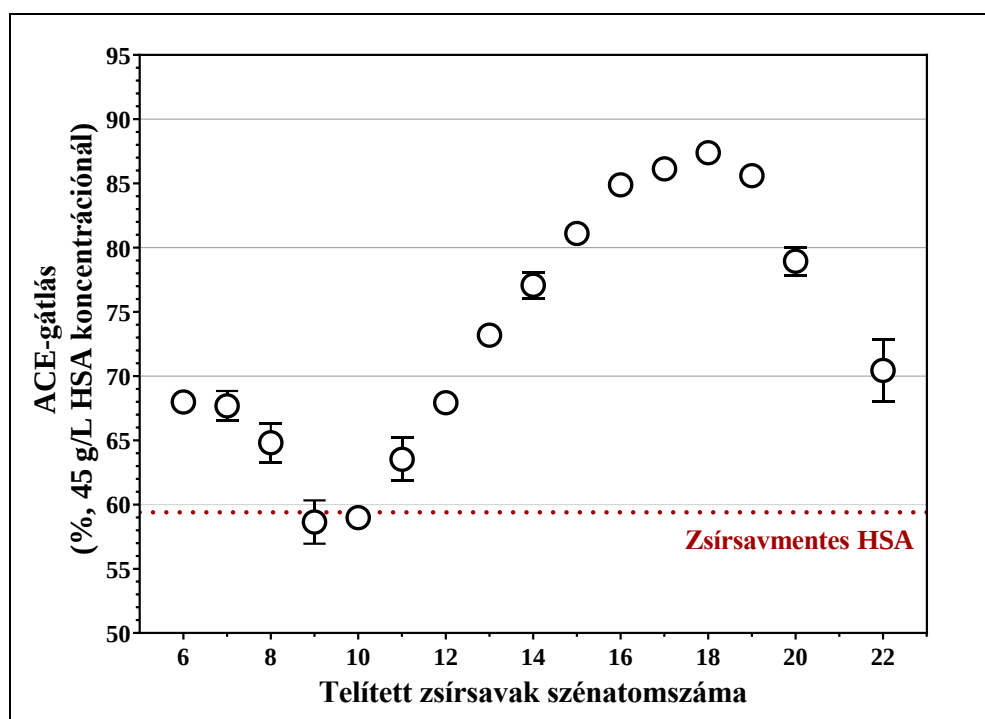
6. ábra: Különböző hosszúságú telített zsírsavakkal kezelt albumin hatása a rekombináns ACE aktivitására. Az ábra a zsírmentes HSA kötött különböző telített zsírsavak rekombináns ACE-aktivitására gyakorolt hatását mutatja koncentráció-hatás görbék formájában. A dodekánsavval (C12:0; sárga háromszögek), mirisztinsavval (C14:0; zöld lefelé mutató háromszögek) és sztearinsavval (C18:0; kék négyzetek) kezelt HSA hatását hasonlítottuk össze a zsírmentes HSA-val (kontroll; piros körök). A szimbólumok három független mérés átlagát és szórását jelzik. A zöld sáv a fiziológias szérumszint HSA-koncentráció tartományát (35–52 g/L) szemlélteti.

A fenti megfigyelések kiterjesztéseként a telített zsírsavak szénlánc hosszának hatását is szisztematikusan elemeztük. Ennek során 6–22 szénatomszámú telített zsírsavakkal kezelt HSA-val koncentráció-hatás görbéket hoztunk létre, majd ezek alapján meghatároztuk az ACE-aktivitás gátlásának mértékét fiziológias albuminkoncentráción (7. ábra), valamint kiszámítottuk az egyes komplexek IC_{50} értékeit (T3. táblázat).

A fiziológias HSA-koncentráción (45 g/L) mért ACE-gátlás mértéke a zsírsavak szénlánc hosszának növekedésével fokozatosan emelkedett. A vizsgált zsírsavak közül a **sztearinsav** (C18:0) kezelt HSA fejtette ki a legerőteljesebb gátló hatást ($87,4 \pm 0,6\%$), amely szignifikánsan meghaladta a zsírmentes HSA által kiváltott gátlás mértékét ($p < 0,001$; Holm–Šidák-korrektúra után $p = 0,002$). Ezzel szemben a **kaprinsav** (C10:0) jelenléte nem eredményezett érdemi eltérést a zsírmentes HSA-hoz viszonyítva ($59,0 \pm 0,5\%$; $p = 0,468$; Holm–Šidák-korrektúra után $p = 0,932$).

Az IC_{50} értékek alakulása összhangban volt a fenti eredményekkel. A HSA-mediált ACE-gátláshoz szükséges albuminkoncentráció a szénlánc hossz növekedésével csökkent: a kaprinsavval (C10:0) kezelt HSA esetében az IC_{50} 27,09 [19,39–55,55] g/L volt, míg a sztearinsavval (C18:0) kezelt komplex esetében 7,98 [7,04–9,23] g/L-nek adódott. A C18:0-nál hosszabb szénláncú telített zsírsavak esetében az IC_{50} értékek enyhe emelkedést mutattak.

A telített zsírsavak szénlánc hossza meghatározó tényezője a HSA-hoz kötött zsírsavak ACE-gátló hatásának nagyságában, és a hatás nem lineárisan, hanem egy optimális szénlánc hossz körül érvényesül a legerősebben.



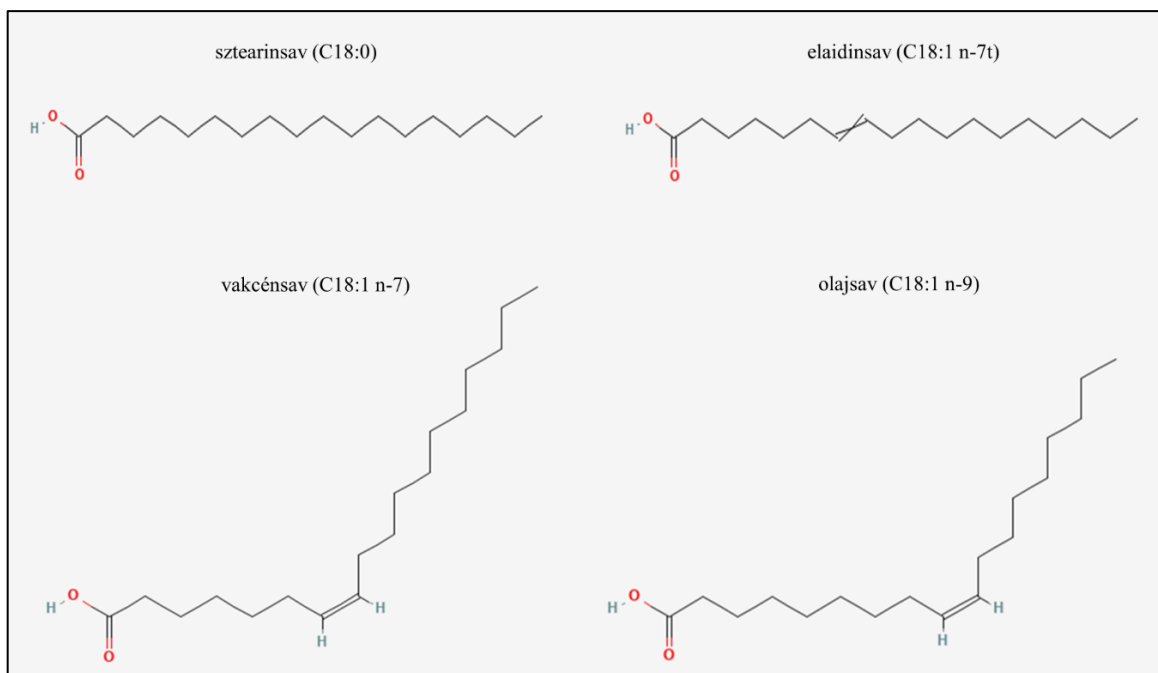
7. ábra: A telített zsírsavak szénlánc hosszának hatása a HSA-mediált ACE-gátlás mértékére fiziológiás albuminkoncentráción. Az ACE-aktivitás gátlásának mértéke 45 g/L HSA koncentráción, a HSA-hoz kötött telített zsírsavak szénatomszámának függvényében. Az ábrán a mért értékek az ACE-gátlás százalékos mértékét mutatják a zsírsavmentes HSA-hoz viszonyítva. A pontok három független mérés átlagát $\pm$ szórását jelölik. A szaggatott piros vonal a zsírsavmentes HSA-val mért ACE-gátlás szintjét ábrázolja. A szénlánc hossz növekedésével az ACE-gátlás mértéke egy pontig fokozatosan emelkedik majd ezután csökken. A legerőteljesebb hatás a közepes-hosszú láncú (palmitinsav C16:0, margarinsav C17:0, sztearinsav C18:0, nonadekánsav C:19:0) telített zsírsavak esetében figyelhető meg.

	IC ₅₀ (g/L) [CI 95%]	p (Holm–Šidák korrigált)	ACE-gátlás 45 g/L HSA-nál (%)
C6:0	19,52 [17,02–23,20]	0,207 (0,750)	68,0±0,5
C7:0	18,67 [16,77–21,24]	0,075 (0,464)	67,7±1,2
C8:0	20,76 [16,56–29,23]	0,522 (0,932)	64,8±1,5
C9:0	25,61 [19,15–44,78]	0,614 (0,932)	58,7±1,7
C10:0	27,09 [19,39–55,55]	0,468 (0,932)	59,0±0,5
C11:0	21,99 [18,22–28,71]	0,711 (0,932)	63,5±1,7
C12:0	18,69 [15,36–24,97]	0,168 (0,724)	67,9±0,4
C13:0	15,54 [13,91–17,72]	0,003 (0,035)	73,2±0,1
C14:0	13,26 [10,19–19,86]	0,006 (0,052)	77,1±1,0
C15:0	11,43 [10,37–12,77]	<0,001 (0,002)	81,1±0,4
C16:0	9,62 [8,70–10,78]	<0,001 (0,002)	84,9±0,8
C17:0	8,69 [8,23–9,22]	<0,001 (0,002)	86,1±0,4
C18:0	7,98 [7,04–9,23]	<0,001 (0,002)	87,4±0,6
C19:0	8,49 [7,93–9,14]	<0,001 (0,002)	85,6±0,3
C20:0	13,27 [10,48–18,82]	0,005 (0,045)	79,0±1,1
C22:0	19,43 [14,03–36,49]	0,415 (0,932)	70,4±2,4

T3. táblázat: A telített zsírsavakkal kezelt HSA ACE-gátló hatásának IC₅₀ értékei és az ezekhez tartozó ACE-gátlás mértéke. A különböző szénlánc-hosszúságú telített zsírsavakkal kezelt HSA esetében meghatározott IC₅₀ értékek (95%-os konfidenciaintervallummal) és a fiziológiás HSA-koncentráción (45 g/L) mért ACE-gátlás mértéke. Az IC₅₀ értékek a HSA-koncentráció (g/L) függvényében kerültek meghatározásra, és az ACE-aktivitás zsírsavmentes HSA-hoz viszonyított százalékos értékében vannak kifejezve. A p-értékek a zsírsavmentes HSA-val végzett mérésekhez viszonyított összehasonlításból származnak, Holm–Šidák-féle korrekció után.

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

A telített zsírsavakkal végzett kísérletek alapján felmerült, hogy azonos szénlánc-hossz mellett a kettős kötés jelenléte és térbeli elrendeződése is befolyásolhatja a HSA-mediált ACE-gátlás mértékét. Ennek vizsgálatára C18 szénatomszámú, **egyszeresen telítetlen zsírsavakat (MUFA-k)** hasonlítottunk össze, amelyek szerkezete a kettős kötés jelenlétében, illetve konfigurációjában tért el egymástól (8. ábra).

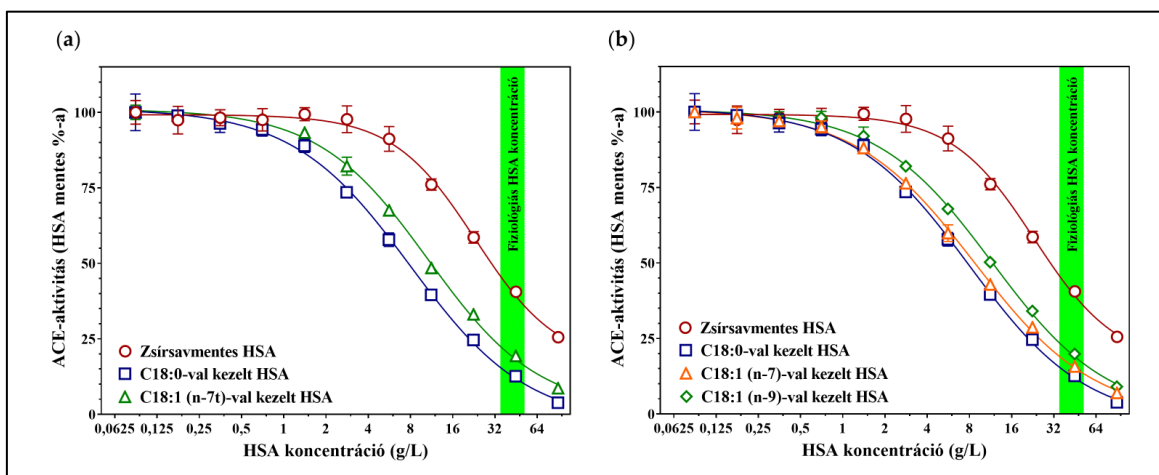


8. ábra: A vizsgálatok során alkalmazott C18 szénatomszámú zsírsavak szerkezeti képletei [66–69]. A telített sztearinsav (C18:0), valamint az eltérő kettős kötés-konfigurációval és -pozícióval rendelkező telítetlen zsírsavak, elaidinsav (C18:1 n-7t), vakcénsav (C18:1 n-7) és olajsav (C18:1 n-9), sematikus ábrázolása. Az ábra szemlélteti, hogy az azonos lánc hossz mellett a kettős kötés jelenléte, konfigurációja (cisz/transz) és elhelyezkedése eltérő térszerkezeti sajátosságokat eredményez.

A sztearinsavhoz (C18:0) viszonyítva az n-7 pozícióban elhelyezkedő transz kettős kötet tartalmazó **elaidinsav** (C18:1 n-7t) esetében a HSA ACE-gátló hatása szignifikánsan csökkent. Az elaidinsav telítetlen volta ellenére megőrzi közel lineáris szénlánc-szerkezetét, amely térbeli elrendeződésében a telített zsírsavakhoz hasonló. Ennek ellenére az elaidinsavval kezelt HSA IC_{50} értéke magasabb volt (10,74 [9,71–12,05] g/L), és a fiziológias albuminkoncentráción mért ACE-gátlás mértéke is alacsonyabbnak adódott ($80,7 \pm 0,7\%$), mint a sztearinsavval kezelt HSA esetében ($IC_{50}=7,98$ [7,04–9,23] g/L; gátlás 45 g/L HSA-nál $87,4 \pm 0,6\%$; $p=0,001$; 9.a ábra).

Ezzel szemben az azonos szénlánc hosszúságú, de n-7 pozícióban elhelyezkedő cisz kettős kötet tartalmazó **vakcénsav** (C18:1 n-7) nem okozott szignifikáns eltérést a HSA-mediált ACE-gátlásban a sztearinsavhoz képest. A cisz konfiguráció következtében kialakuló enyhén hajlított szénlánc-szerkezet ellenére a vakcénsavval kezelt HSA IC_{50} értéke (8,70 [7,85–9,79] g/L) és a fiziológias albuminszint mellett mért gátlás mértéke ($84,3 \pm 0,7\%$) nem különbözött szignifikánsan a telített zsírsavval kezelt mintákétól ($p=0,317$; 9.b ábra).

Amennyiben azonban a cisz kettős kötés az n-9 pozícióban helyezkedett el, mint az **olajsav** (C18:1 n-9) esetében, a HSA ACE-gátló hatása jelentősen mérséklődött. Az olajsav jellegzetes, markánsabb térbeli törést okozó szerkezete mellett a HSA-val képzett komplex IC_{50} értéke 11,61 [10,35–13,28] g/L volt, és a fiziológiás albuminkoncentráción mért ACE-gátlás is alacsonyabbnak bizonyult ($80,1 \pm 1,7\%$) a sztearinsavhoz viszonyítva ($p < 0,001$); 9.b ábra).



9. ábra: A kettős kötés jelenlétének, konfigurációjának és pozíciójának hatása a HSA által közvetített ACE-gátlásra. (a) Az elaidinsavval (C18:1 n-7t) kezelt HSA és a sztearinsavval (C18:0) kezelt HSA rekombináns ACE-aktivitásra gyakorolt hatás koncentráció-hatás görbék formájában. (b) A vakcénsavval (C18:1 n-7) és az olajsavval (C18:1 n-9) kezelt HSA rekombináns ACE-aktivitásra gyakorolt hatás koncentráció-hatás görbék formájában. Kontrollként zsírsavmentes HSA szerepel. Az ACE-aktivitás a zsírsavmentes HSA-hoz viszonyított százalékos értékben került kifejezésre. A szimbólumok három független mérés átlagát $\pm$ szórását jelzik. A zöld sáv a fiziológiás szérumszint HSA-koncentráció tartományát (35–52 g/L) szemlélteti.

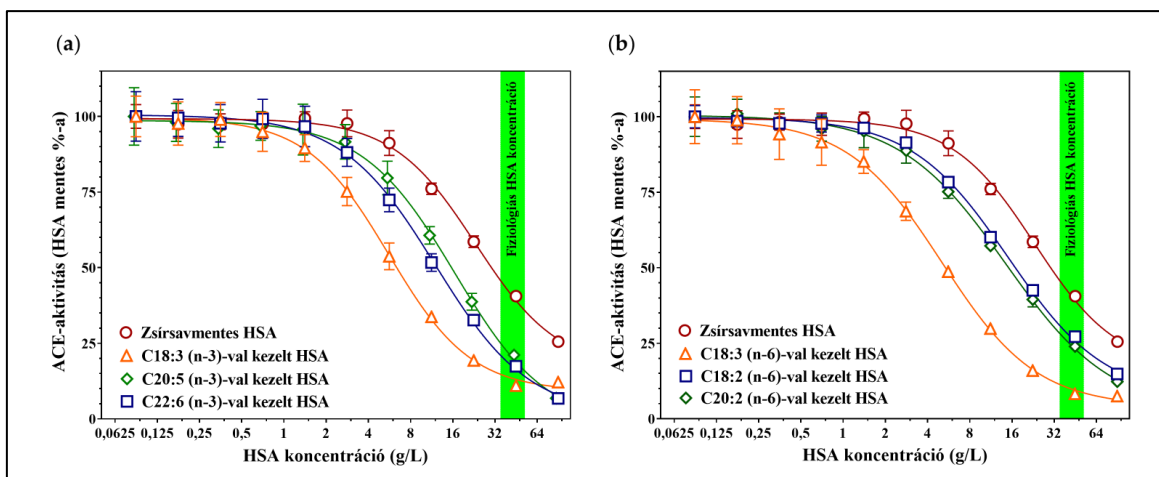
A többszörösen telítetlen zsírsavak szerepe a HSA-mediált ACE-gátlásban

A telített és egyszeresen telítetlen zsírsavakkal kapott eredmények alapján indokoltá vált a **többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA-k)** hatásának vizsgálata is a HSA-mediált ACE-gátlás szempontjából. Annak vizsgálatához, hogy a többszörösen telítetlen, omega-3 és omega-6 típusú zsírsavak milyen mértékben módosítják a HSA által közvetített ACE-gátlást a zsírsavmentes HSA-t különböző omega-3 és omega-6 zsírsavakkal kezeltünk, majd meghatároztuk az ACE-gátlás mértékét koncentráció-hatás összefüggések alapján (10. ábra).

Az **omega-3** zsírsavak közül az **α -linolénsav (ALA, C18:3 n-3)** fokozta legnagyobb mértékben a HSA által közvetített ACE-gátlást. Az α -linolénsavat tartalmazó HSA esetében

az IC_{50} érték 5,60 [4,28–6,15] g/L volt, és a fiziológiás HSA-koncentráción mért ACE-gátlás elérte a $89,0 \pm 0,3\%$ -ot, ami szignifikánsan meghaladta a zsírsavmentes HSA esetében mért értékeket ($p < 0,001$; Holm–Šidák-korrigált $p = 0,001$; 10.a ábra). A **dokozahexaénsav (DHA, C22:6 n-3)** szintén szignifikáns gátló hatást fejtett ki, azonban kisebb mértékben ($IC_{50} = 12,02$ [9,86–15,06] g/L; ACE-gátlás 45 g/L HSA-nál $82,6 \pm 0,9\%$; $p < 0,001$; Holm–Šidák-korrigált $p = 0,001$). Ezzel szemben az **eikozapentaénsav (EPA, C20:5 n-3)** jelenléte nem eredményezett szignifikáns változást a HSA ACE-gátló hatásában a zsírsavmentes HSA-hoz képest ($IC_{50} = 16,56$ [13,00–24,22] g/L; ACE-gátlás $78,9 \pm 0,9\%$; $p = 0,059$; Holm–Šidák-korrigált $p = 0,114$) (10.a ábra).

Az **omega-6** zsírsavak vizsgálata során a **γ -linolénsav (GLA, C18:3 n-6)** bizonyult a legerőteljesebb ACE-gátló hatással rendelkező vizsgált PUFA-nak. A γ -linolénsavat tartalmazó HSA IC_{50} értéke 5,09 [4,28–6,15] g/L volt, és a fiziológiás HSA-koncentráción mért ACE-gátlás elérte a $91,7 \pm 0,2\%$ -ot ($p < 0,001$; Holm–Šidák-korrigált $p = 0,001$; 10.b ábra). Az **eikozadiénsav (EDA, C20:2 n-6)** és a **linolsav (LA, C18:2 n-6)** szintén szignifikánsan fokozta a HSA által közvetített ACE-gátlást, azonban hatásuk mérsékeltebbnek bizonyult (EDA, C20:2 n-6: $IC_{50} = 14,41$ [11,79–19,06] g/L; ACE-gátlás $76,1 \pm 1,7\%$; $p = 0,001$; Holm–Šidák-korrigált $p = 0,023$; LA, C18:2 n-6: $IC_{50} = 15,04$ [13,55–17,00] g/L; ACE-gátlás $72,8 \pm 1,3\%$; $p = 0,001$; Holm–Šidák-korrigált $p = 0,005$) (10.b ábra).



10. ábra: Többszörösen telítetlen zsírsavak hatása a HSA-mediált ACE-gátlásra. (a) Az omega-3 típusú zsírsavakkal, α -linolénsavval (ALA, C18:3 n-3), eikozapentaénsavval (EPA, C20:5 n-3) és dokozahexaénsavval (DHA, C22:6 n-3), kezelt HSA rekombináns ACE-aktivitásra gyakorolt hatása koncentráció-hatás görbék formájában. **(b)** Az omega-6 típusú zsírsavakkal, γ -linolénsavval (GLA, C18:3 n-6), eikozadiénsavval (EDA, C20:2 n-6) és linolsavval (LA, C18:2 n-6), kezelt HSA rekombináns ACE-aktivitásra gyakorolt hatása koncentráció-hatás görbék formájában. Kontrollként mindkét panelen zsírmentes HSA szerepel. Az ACE-aktivitás a zsírmentes HSA-hoz viszonyított százalékos értékben került kifejezésre. A szimbólumok három független mérés átlagát $\pm$ szórását jelzik. A zöld sáv a fiziológias szérum HSA-koncentráció tartományát (35–52 g/L) szemlélteti.

A zsírsavfüggő ACE-gátlás vizsgálata szöveti eredetű ACE esetében

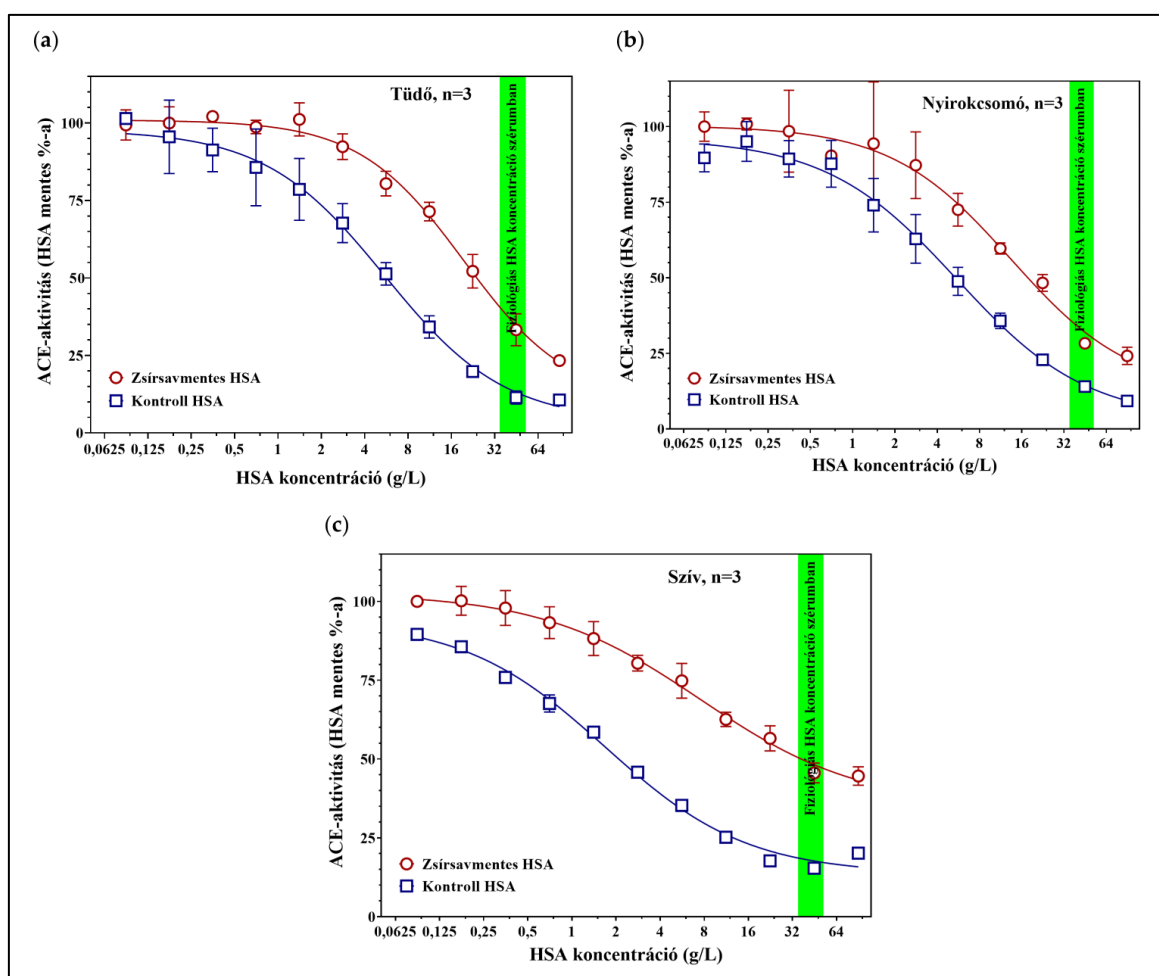
A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a zsírsavak jelenlétéhez kötődő, HSA által közvetített ACE-gátló hatás kimutatható-e szöveti eredetű ACE esetében is. Ennek érdekében humán tüdő-, nyirokcsomó- és szívszövet-homogenizátumokból származó ACE-t rögzítettünk szilárd fázison, majd a reakciókat fiziológias módon zsírsavakat hordozó, illetve zsírmentes HSA jelenlétében végeztük el (11. ábra).

Mindhárom vizsgált szövettípus esetében egységes mintázat volt megfigyelhető: a fiziológiásan kötött zsírsavakat tartalmazó HSA jelenlétében az ACE-aktivitás gátlása kifejezettebbnek bizonyult, mint zsírmentes HSA alkalmazásakor. Tüdőszövetből származó ACE esetében a zsírsavakat hordozó HSA szignifikánsan alacsonyabb IC_{50} értéket mutatott (5,52 [4,07–7,90] g/L), és a fiziológias HSA-koncentráción mért ACE-gátlás mértéke is magasabb volt ($88,6 \pm 2,1\%$), mint zsírmentes HSA esetében ($IC_{50} = 19,55$ [14,55–32,86] g/L; gátlás 45 g/L-nél $66,7 \pm 5,2\%$; $p < 0,001$; 11.a ábra).

Hasonló eltérés volt megfigyelhető nyirokcsomó-homogenizátumból származó ACE esetében is, ahol a zsírsavakat tartalmazó HSA alkalmazása fokozott ACE-gátláshoz vezetett

($IC_{50}=5,52$ [4,08–8,35] g/L; gátlás 45 g/L-nél $86,0\pm1,6\%$), szemben a zsírsavmentes HSA-val mért értékekkel ($IC_{50}=13,40$ [7,99–128,90] g/L; gátlás $71,7\pm1,2\%$; $p=0,019$; 11.b ábra).

Szívszövetből származó ACE esetében a különbség különösen jelentősnek bizonyult. A zsírsavakat hordozó HSA IC_{50} értéke lényegesen alacsonyabb volt ($1,69$ [1,36–2,03] g/L), míg a fiziológiás albuminszinten mért ACE-gátlás mértéke magasabbnak adódott ($84,7\pm1,2\%$), mint zsírsavmentes HSA alkalmazásakor ($IC_{50}=7,59$ [5,01–17,38] g/L; gátlás $54,41\pm3,2\%$; $p<0,001$; 11.c ábra).



11. ábra: A HSA-mediált ACE-gátlás megjelenése szöveti eredetű ACE esetén. Az ACE-t tüdő- (a), nyirokcsomó- (b) és szívszövetből (c) származó homogenizátumokból immunprecipitálást követően vizsgáltuk. Az immobilizált ACE aktivitását zsírsavakat fiziológiás módon tartalmazó HSA (kék négyzetek), illetve zsírsavmentes HSA (piros körök) jelenlétében határoztuk meg koncentráció-hatás görbék alapján. A zöld sáv a fiziológiás szérum HSA-koncentráció tartományát (35–52 g/L) jelöli. Az ábrák szövettípusonként egy-egy mintából, három független mérés alapján számított átlag $\pm$ szórás értékeiket mutatják.

A szérum és szöveti ACE fenotípusának összehasonlítása párosított mintákban

A szérum és a szöveti ACE fenotípusának összehasonlítását 18 olyan beteg esetében végeztük el, akiknél ugyanazon egyénből származó szérum- és tüdőminták egyaránt rendelkezésre álltak, és akiknél nem állt fenn ACE-gátló kezelés. A vizsgálat célja annak megítélése volt, hogy a szérumban megfigyelhető ACE-fenotípus mennyiben tükrözi a tüdőszövetben jelen lévő ACE szerkezeti és funkcionális sajátosságait, illetve, hogy kimutathatók-e következetes eltérések a két mintatípus között.

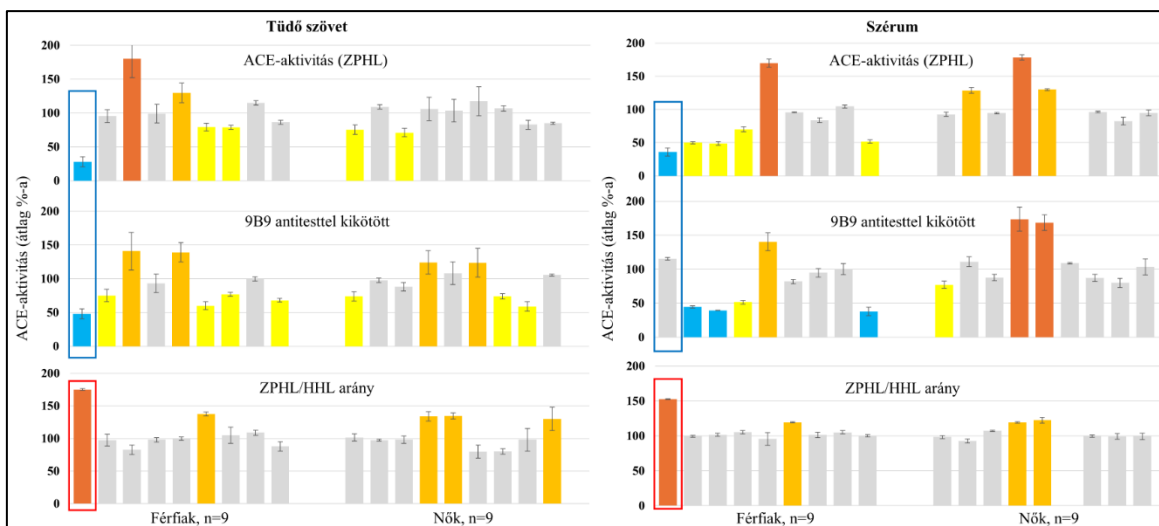
Az ACE-fenotipizálást epitóp-specifikus mAb-k alkalmazásával végeztük. Ezek az antitestek az ACE felszínének eltérő, térben elkülönülő régióihoz kötődnek, így lehetővé teszik az enzim konformációs állapotának és felszíni hozzáférhetőségének közvetett jellemzését. A mérések során az egyes antitestek által rögzített ACE-aktivitását határoztuk meg, majd az antitestekhez tartozó relatív aktivitásmintázatokat hasonlítottuk össze. Az így kapott aktivitási mintázatot tekintettük az adott minta ACE-fenotípusának.

A funkcionális paraméterek értékelése során meghatároztuk a ZPHL és a HHL szubsztrátok hidrolízisének arányát. A két szubsztrát eltérő mértékben preferálja az ACE N- és C-doménjének aktív centrumait, ezért a hidrolízisarány érzékeny paraméterként használható az enzim szerkezeti állapotának és a domének relatív funkcionális aktivitásának monitorozására. A ZPHL/HHL arány változása lehetővé teszi szelektív doméninaktiváció vagy -gátlás kimutatását [64].

A 12. ábra reprezentatív módon mutatja be a ZPHL-lel mért ACE-aktivitást, a ZPHL/HHL arányt és egy, jól jellemzett epitópra irányuló antitesttel (9B9) meghatározott kötődést párosított szérum- és tüdőmintákban. A vizsgált esetek többségében a szérum- és tüdőminták fenotípusos mintázata hasonló volt. Ettől eltérő mintázat egy esetben volt megfigyelhető (első oszlop, S13 beteg).

Az egyes mintákban előfordultak izolált eltérések egy-egy epitóp kötődési arányában, ezek azonban nem jártak együtt több epitópot érintő arányeltolódással, és nem társultak a ZPHL/HHL aktivitásarány változásával.

Az S13 beteg tüdőmintájában ezzel szemben több, egymástól független epitóp kötődési aránya, valamint a ZPHL/HHL aktivitásarány egyidejű eltérése volt kimutatható, míg a szérumminta fenotípusos mintázata nem mutatott hasonló változást.



12. ábra: A tüdő- és a szérumeredetű ACE fenotípusának összehasonlítása párosított mintákban. Az ábra a tüdőszövetből és a szérumból származó ACE-aktivitását mutatja ZPHL szubsztrát alkalmazásával, valamint a 9B9 mAb-vel rögzített ACE-aktivitást és a ZPHL/HHL aktivitásarányt. Minden oszlop egy-egy vizsgálati személy mintáját reprezentálja, az értékek a csoportátlag százalékában kerültek ábrázolásra. Az oszlopok színezése a kontrollhoz viszonyított eltérés mértékét jelzi. A szürke oszlopok a normáltartományba eső értékeket mutatják (a kontroll 80–120%-a). A kontrollhoz képest emelkedést jelöl a sötét narancssárga (>20%), a narancssárga (>50%) szín, míg csökkenést jelez a citromsárga (>20%) és a világoskék (>50%) szín. Az adatok 2-5 egymástól független kísérlet átlagát±szórását mutatják, kísérletenként triplikát mérések alapján. A bekeretezett oszlopok az S13 beteg mintáin végzett méréseket jelölik.

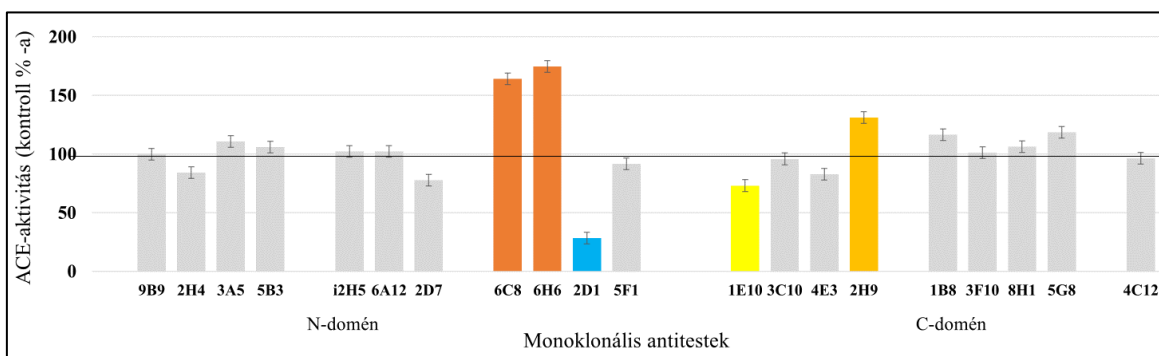
Az eltérés részletesebb jellemzésére az S13 tüdőmintájából származó ACE esetében kiterjesztett konformációs fingerprinting vizsgálatot végeztünk, amely során az ACE aktivitását 20 különböző epitópra irányuló monoklonális antitesttel precipitáltuk, és az így kapott kötődési arányokat kontroll tüdőminták eredményeivel hasonlítottuk össze. A kontrollminták a vizsgálatban szereplő 9 férfi közül a 2–9. számú betegek tüdőmintáiból képzett pooled homogenizátumok voltak (13. ábra).

Az epitóp-specifikus antitestekkel meghatározott precipitációs profil alapján az S13 tüdőmintájában az ACE több mAb esetén is eltérést mutatott a kontrollmintákhoz képest. A változások nem egyetlen epitópra korlátozódtak, hanem az ACE N- és C-doménjének több, térben elkülönülő régióját érintették.

A fingerprinting elemzés során számított egyes epitóp-arányok, különösen a 2H9/2D1 kötődési arány, amely érzékeny az ACE N-doménjének szialilációs állapotára, az S13 tüdőmintájában kifejezetten megemelkedett értéket mutatott a kontrollmintákhoz

viszonyítva, míg a szérumból származó ACE esetében hasonló eltérés nem volt megfigyelhető.

Tekintettel arra, hogy az epitóp-specifikus monoklonális antitestek kötődése az ACE felszíni állapotának érzékeny jelzője, az észlelt többdimenziós eltérés alapján megvizsgáltuk, hogy az atípusos ACE-fenotípus befolyásolja-e a HSA által közvetített ACE-gátlás mértékét.



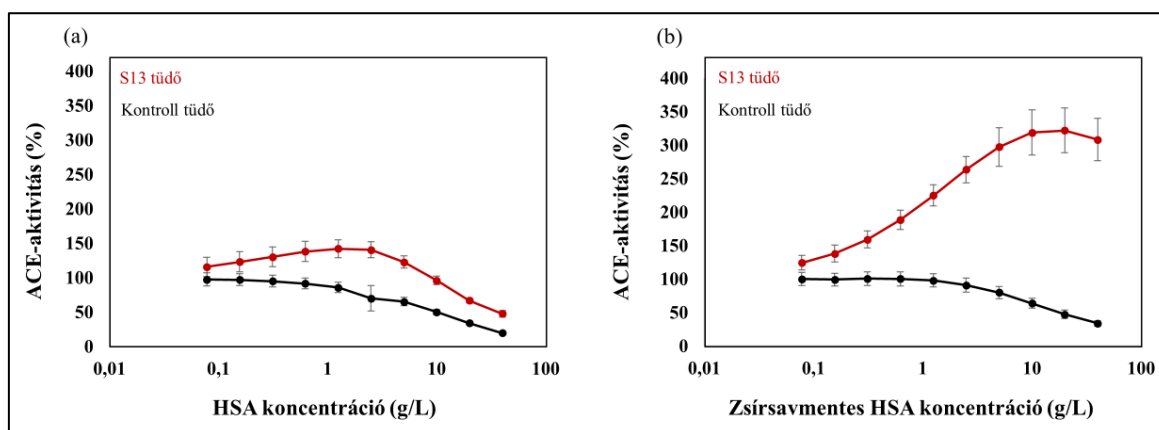
13. ábra. Az atípusos ACE-fenotípus konformációs fingerprintje S13 tüdőmintájában. Az ábra az S13 beteg tüdőhomogenizátumából származó ACE aktivitásának precipitációját mutatja 20, eltérő epitópra irányuló mAb alkalmazásával, kontroll tüdőmintákhoz viszonyítva. Az oszlopok az egyes antitestek által rögzített ACE-aktivitást fejezik ki a kontrollminták átlagának százalékában. Az oszlopok színezése megfelel a 12. ábrán ismertetett jelölésnek.

Az ACE-gátlás eltérései atípusos ACE-fenotípus esetén

Az atípusos ACE-fenotípust mutató beteg (S13) esetében azt vizsgáltuk, hogy a szöveti ACE felszíni sajátosságainak eltérése együtt jár-e a HSA hatásának megváltozásával. Ennek érdekében az S13 tüdőmintájából származó, immunprecipitált ACE aktivitását fiziológiás módon zsírsavakat hordozó, illetve zsírsavmentes HSA jelenlétében határoztuk meg, és az eredményeket típusos ACE-fenotípusú kontrollmintákkal hasonlítottuk össze (14. ábra). A kontrollmintákban a HSA az előző kísérletekben megfigyelt mintázatnak megfelelően csökkentette az ACE-aktivitást. Ez a hatás kifejezettebb volt akkor, amikor az albumin zsírsavakat hordozott, ami összhangban áll azzal, hogy a HSA-hoz kötött zsírsavak fokozzák az albumin ACE-gátló hatását (14. ábra).

Ezzel szemben az atípusos ACE-fenotípust mutató S13 tüdőmintájában a HSA hatása ettől eltérő mintázatot mutatott. A zsírsavakat hordozó HSA jelenlétében az ACE-aktivitás csökkenése mérsékeltebbnek bizonyult, és nem mutatta a kontrollmintákra jellemző különbséget a zsírsavmentes HSA hatásához képest. Zsírsavmentes HSA jelenlétében az S13

mintában nagyobb HSA-koncentrációknál az ACE-aktivitás kifejezett növekedése volt megfigyelhető, ami arra utal, hogy ebben az atípusos fenotípusban a HSA és az ACE közötti kölcsönhatás funkcionális következménye alapvetően eltér a kontrollmintákban megfigyelt mintázattól (14.b ábra).



14. ábra: A HSA hatásának eltérései atípusos ACE-fenotípus esetén. (a) Az S13 beteg tüdőmintájából származó ACE (piros görbe) és típusos ACE-fenotípusú kontroll tüdőhomogenizátum (fekete görbe) reziduális ACE-aktivitása fiziológias módon zsírsavakat hordozó HSA különböző koncentrációiban. (b) Az S13 beteg tüdőmintájából származó ACE és típusos ACE-fenotípusú kontroll tüdőhomogenizátum reziduális ACE-aktivitása zsírsavmentes HSA jelenlétében. Az ACE-aktivitás a HSA nélküli állapothoz viszonyított százalékos értékben került kifejezésre. Az ábrák három független mérés átlagát $\pm$ szórását mutatják.

Az atípusos ACE-fenotípus genetikai hátterének vizsgálata

Az atípusos ACE-fenotípust mutató beteg (S13) esetében annak tisztázására, hogy a szöveti ACE-fenotípusban és a HSA-mediált ACE-gátlásban megfigyelt eltérések genetikai eredetűek-e, teljes exom szekvenálást végeztünk. Az elemzés első lépéseként azt vizsgáltuk, hogy az ACE-gén kódoló régiójában jelen van-e olyan nukleotidszintű eltérés, amely az enzim aminosavsorrendjét, katalitikus tulajdonságait vagy felszíni szerkezetét érintheti.

A teljes exom szekvenálás során az ACE-gén kódoló szakaszában nem azonosítottunk olyan variánst, amely aminosavcserével járna, illetve amely korábbi adatok alapján az ACE működését vagy konformációját érdemben befolyásolhatná. Ennek megfelelően az atípusos ACE-fenotípus nem volt magyarázható az ACE elsődleges szerkezetét érintő mutációval.

Ezt követően az elemzést kiterjesztettük olyan, korábbi vizsgálatok alapján ismert ACE-kötő fehérjékre, amelyek megváltozott ACE-kapcsolódás révén befolyásolhatják az enzim lokális konformációját és funkcionális tulajdonságait. Ennek keretében vizsgáltuk

többek között a chaperon BiP-et (GRP78), a ribophorin 1-et, a protein kináz C-t [70–72], az albumint, valamint a lizozimet [73,74], amelyekről korábban kimutatták, hogy közvetlen vagy közvetett módon kapcsolatba hozhatók az ACE működésével és felszíni szerkezetével.

A teljes exom szekvenálás során az S13 beteg genomjában a referencia-szekvenciához viszonyítva több mint 10000 genetikai variánst azonosítottunk. Ezek közül 1381 potenciálisan káros misszensz mutációt detektáltunk a PolyPhen-2 HVAR pontszám alapján, továbbá 641 exoni nonszensz mutációt, illetve inzerciót vagy deléció. A lehetséges ok-okozati összefüggések szűkítése érdekében az S13 betegben azonosított variánsokat összevetettük 16 olyan vizsgálati személy exomadataival, akiknél teljes exom szekvenálás történt, azonban az S13 betegéhez hasonló atípusos ACE-fenotípus nem volt kimutatható. Ezen összehasonlítás során mintegy 1700, nagy valószínűséggel véletlenszerűen előforduló, potenciálisan káros variánst zártunk ki, és több mint 200 olyan génváltozat maradt fenn, amelyek elméletileg hozzájárulhatnak az észlelt fenotípus kialakulásához.

A leszűkített variánshalmaz értelmezése során figyelembe vettük, hogy az S13 beteg tudómintájából származó ACE esetében a konformációs fingerprint több, egymástól független epitóp régióban mutatott eltérést. Különösen érintettek voltak az N domén C terminális részéhez tartozó epitópok, amelyekhez a 6H6, 2D1 és 6C8 mAb-k kötődnek [55], valamint a C domén N terminális régiójához közeli epitópok, amelyekhez az 1E10 és 2H9 antitestek kapcsolódnak. Ez a több régiót érintő eltérés arra utal, hogy az ACE felszíni szerkezete az S13 beteg tudómintájában komplex módon módosult, és nem egyetlen, lokalizált szerkezeti változás következménye.

A genetikai adatok értelmezése során ezért külön figyelmet fordítottunk olyan génekre, amelyek termékei kis méretű, jellemzően 10–30 kDa molekulatömegű fehérjéket kódolnak, és amelyek funkciójuk vagy térbeli elhelyezkedésük alapján képesek lehetnek az ACE N és C doménjei közötti hasadéokban megkötődni. Korábbi vizsgálatok alapján ilyen mérettartományba eső fehérjék kötődése az ACE felszínéhez képes lehet az epitóp-hozzáférhetőség és az enzim konformációjának módosítására [61,75]. A fennmaradó variánsok között több olyan génváltozat is azonosítható volt, amelyek gyulladásos válaszhoz, lizoszomális működéshez vagy extracelluláris fehérjék feldolgozásához kapcsolódó fehérjéket érintenek.

A szűrés eredményeként több potenciálisan releváns génváltozat került azonosításra, köztük a SAA1 gén rs1136747 (V75A) variánsa, az ADAMTSL4 gén rs199599791 (R87P) variánsa, a NOD2 gén rs2066844 (R702W) variánsa, valamint az SMPD1 gén rs550365194 variánsa, amely egy három aminosavat érintő in-frame delécióval jár. Ezek a variánsok

együttesen, heterozigóta formában fordultak elő az S13 betegben, és ilyen kombináció más, vizsgált egyénekben nem volt jelen. A variánsok nem az ACE kódoló régióját érintették, hanem olyan génekben jelentek meg, amelyek gyulladásos válaszhoz, lizoszomális működéshez vagy extracelluláris fehérjék feldolgozásához kapcsolódnak. Ez az eredmény összhangban volt azzal, hogy az ACE-fenotípus eltérése nem az ACE elsődleges szerkezetének megváltozásával magyarázható.

DISZKUSSZIÓ

Az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) aktivitásának endogén szabályozása a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) finomhangolásának egyik kulcseleme, amelynek jelentőségét a kardiovaszkuláris betegségek patogenezisében mind klinikai, mind kísérletes adatok alátámasztják. A kardiovaszkuláris mortalitás globális terhe továbbra is kiemelkedő, és az ACE farmakológiai gátlása évtizedek óta bizonyítottan csökkenti a kardiovaszkuláris események kockázatát [76,77]. Korábbi munkáinkban kimutattuk, hogy a keringő ACE aktivitása a humán szérumalbumin (HSA) által jelentős mértékű endogén gátlás alatt áll [5,16], és hogy ennek az endogén gátlásnak a hiánya vagy csökkenése hozzájárulhat a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásához [4]. Ezt a koncepciót epidemiológiai adatok is alátámasztják, amelyek szerint az alacsony-normál tartományba eső HSA koncentráció független rizikófaktor a kardiovaszkuláris morbiditásnak és mortalitásnak [78–80]. A jelen vizsgálat eredményei ezt az összefüggésrendszert tovább árnyalják azáltal, hogy igazolják: az endogén ACE-gátlás mértéke szoros kapcsolatban áll a HSA koncentrációjával, ugyanakkor az alacsony illeszkedési érték arra utal, hogy az albumin mennyisége önmagában nem magyarázza teljes mértékben az ACE-gátlás variabilitását. Ezt a megfigyelést erősíti az a tény, hogy a szérum teljes szabadzsírsav-koncentrációja (FFA) nem mutatott kapcsolatot az endogén ACE-gátlás mértékével, ami arra utal, hogy nem a zsírsavak mennyisége, hanem azok minősége lehet meghatározó az albumin-ACE kölcsönhatás szabályozásában.

Az *in vitro* kísérletek eredményei egyértelműen alátámasztják ezt az értelmezést, mivel a HSA zsírsavmentesítése jelentősen csökkentette az ACE-gátló hatást, míg egyes albuminhoz kötött zsírsavak ezt kifejezetten fokozták. A HSA jól ismert, sokkötőhelyes transzportfehérje, amely különböző affinitású zsírsavkötő helyein keresztül jelentős konformációs változásokon megy keresztül ligandumkötés hatására [6,81,82]. Eredményeink szerint a hosszú szénláncú telített zsírsavak, különösen a palmitinsav (C16:0) és a sztearinsav (C18:0), valamint egyes többszörösen telítetlen zsírsavak, így az α -linolénsav (ALA, C18:3 n-3), és a γ -linolénsav (GLA, C18:3 n-6) jelentősen növelték a HSA-mediált ACE-gátlás mértékét. Az egyes zsírsavak ACE-gátló képességének összehasonlítható bemutatását, a 45 g/L HSA-koncentráción mért gátlás mértéke és az IC₅₀ értékek alapján, a T4. táblázat szemlélteti. Ezek a megfigyelések illeszkednek azokhoz a szerkezeti adatokhoz, amelyek szerint a FA1 kötőhelyhez tartozó Tyr-138 aminosav egyszerre játszik szerepet a zsírsavkötésben és az ACE-hez való kapcsolódás kialakításában

[82,83], továbbá, hogy az albumin egy másik, ACE-hez kötődő régiója átfedést mutat a Sudlow I kötőhellyel [24,84]. Mindez alapot szolgáltat arra, hogy az albuminhoz kötött zsírsavak típusa közvetlenül befolyásolja a HSA-ACE interakció hatékonyságát. A jelen eredmények alapján a HSA nem csupán passzív hordozófehérjeként értelmezhető, hanem olyan dinamikus szabályozó elemként, amelynek ACE-gátló kapacitását az aktuális metabolikus és lipidkörnyezet finoman modulálja. Ez a megközelítés azt sugallja, hogy az endogén ACE-gátlás a szervezet anyagcsere-állapotához adaptívan igazodó, rugalmas szabályozó mechanizmus lehet.

A telített zsírsavakkal végzett kísérletek egyik lényeges tanulsága, hogy a HSA-mediált ACE-gátlás mértéke nem bináris módon, hanem finoman hangolt szerkezeti paraméterek függvényében változik. A szénlánc hossz fokozatos növekedésével párhuzamosan megfigyelt, egyre erőteljesebb ACE-gátló hatás arra utal, hogy a HSA konformációs állapotának módosulása nem pusztán a zsírsavkötés jelenlétéhez, hanem annak geometriai és térkitöltési sajátosságaihoz is kötődik. A hosszabb szénláncú zsírsavak stabilabban és mélyebben foglalják el a nagy affinitású zsírsavkötő zsebeket, ami az albumin globális konformációjának átrendeződését indukálhatja, és ezáltal befolyásolhatja az ACE-hoz való kölcsönhatásban részt vevő felszíni régiók hozzáférhetőségét vagy orientációját [6,81,82]. Ez megfelel annak a szemléletnek, miszerint az albumin ligandkötés által módosuló konformációs állapotai funkcionális következményekkel járhatnak, és aktív szabályozó szerepet tölthetnek be fehérje-fehérje interakciókban [6,81,82].

Ezt a szerkezeti érzékenységet tovább árnyalják a telítetlen zsírsavak vizsgálatának eredményei, miszerint az ACE-gátlás mértékét nem kizárólag a telítetlenség ténye, hanem annak konfigurációja és a kettős kötés pozíciója határozza meg. Az elaidinsav (C18:1 n-7t) közel lineáris szerkezete ellenére gyengébb gátló hatást fejtett ki, mint a sztearinsav (C18:0), míg a cisz konfigurációjú vakcénsav (C18:1 n-7) esetében az ACE-gátlás megmaradt a telített zsírsavakra jellemző tartományban. Ezzel szemben az olajsav (C18:1 n-9) fokozottabb térbeli törést okozó szerkezete már egyértelműen csökkentette a HSA ACE-gátló képességét. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az albumin ACE-hoz való kapcsolódását nem kizárólag a ligandum jelenléte, hanem annak albuminkonformációt módosító hatása határozza meg. Ez megegyezik korábbi szerkezeti adatokkal, amelyek szerint a zsírsavkötés helye és módja eltérő allosztérikus hatásokat közvetít az albumin felszínén [24,82].

Különösen figyelemre méltó, hogy a többszörösen telítetlen zsírsavak csoportján belül is jelentős heterogenitás volt megfigyelhető. Az ALA (C18:3 n-3) és a GLA (C18:3 n-6)

kifejezetten erőteljes ACE-gátló hatást eredményezett, amely meghaladta a telített zsírsavakét is, míg más PUFA-k, például az EPA (C20:5 n-3), lényegesen kisebb vagy elhanyagolható hatást mutattak. Ez a megfigyelés tovább erősíti azt a koncepciót, hogy a HSA nem passzív hordozóként, hanem aktív regulátorként vesz részt az ACE működésének finomhangolásában, mégpedig a hozzá kötődő zsírsavak minősége révén. Ezzel összhangban állatkísérletes adatok szerint az étrendi α -linolénsav spontán hipertóniás patkányok aortájában csökkentette az ACE-aktivitást és az ACE mRNS-expresszióját [85]. Klinikai szempontból ez különösen érdekes annak fényében, hogy az α -linolénsavban gazdag étrendi módosítások vérnyomáscsökkentő hatását humán vizsgálatok és metaanalízisek is alátámasztják [8,86,87], bár az ACE-gátláson keresztül megvalósuló mechanizmus eddig közvetlenül nem került igazolásra.

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

Érdemes kiemelni, hogy az ALA és (C18:3 n-3) és a GLA (C18:3 n-6) által kiváltott erőteljes HSA-mediált ACE-gátlás nem feltétlenül áll ellentmondásban azzal a klinikai tapasztalattal, miszerint az omega-3 zsírsavak rutinszerű pótlása nem jár egyértelmű kardiovaszkuláris előnnyel [88,89]. Eredményeink alapján elképzelhető, hogy az albuminhoz kötött zsírsavak szerkezeti sajátosságai, valamint az általuk kiváltott albumin-konformációk finom különbségei meghatározóbbak, mint az omega-3 csoportba tartozás önmagában. Ez a szempont hozzájárulhat ahhoz, hogy miért mutatnak eltérő klinikai hatást az egyes, szerkezetileg rokon zsírsavak.

Triviális név	Jelölés	Csoport, konformáció	IC ₅₀ (g/L)	ACE-gátlás (%) 45 g/L HSA- nál
γ-linolénsav (GLA)	(C18:3 n-6)	PUFA, komplex tér szerkezet	5,09 [4,28–6,15]	91,7±0,2
α-linolénsav (ALA)	(C18:3 n-3)	PUFA, komplex tér szerkezet	5,60 [4,28–6,15]	89,0±0,3
sztearinsav	(C18:0)	SFA, egyenes	7,98 [7,04–9,23]	87,4±0,6
palmitinsav	(C16:0)	SFA, egyenes	9,62 [8,70–10,78]	84,9±0,8
vakcénsav	(C18:1 n-7)	MUFA, cisz, hajlított	8,70 [7,85–9,79]	84,3±0,7
dokozahexaénsav (DHA)	(C22:6 n-3)	PUFA, komplex tér szerkezet	12,02 [9,86–15,06]	82,6±0,9
elaidinsav	(C18:1 n-7t)	MUFA, transz, egyenes	10,74 [9,71–12,05]	80,7±0,7
olajsav	(C18:1 n-9)	MUFA, cisz, hajlított	11,61 [10,35–13,28]	80,1±1,7
eikozapentaénsav (EPA)	(C20:5 n-3)	PUFA, komplex tér szerkezet	16,56 [13,00–24,22]	78,9±0,9
mirisztinsav	(C14:0)	SFA, egyenes	13,26 [10,19–19,86]	77,1±1,0
eikozadiénsav (EDA)	(C20:2 n-6)	PUFA, komplex tér szerkezet	14,41 [11,79–19,06]	76,1±1,7
linolsav (LA)	(C18:2 n-6)	PUFA, komplex tér szerkezet	15,04 [13,55–17,00]	72,8±1,3
dodekánsav	(C12:0)	SFA, egyenes	18,69 [15,36–24,97]	67,9±0,4
kaprinsav	(C10:0)	SFA, egyenes	27,09 [19,39–55,55]	59,0±0,5

T4. táblázat: Az egyes zsírsavak HSA-mediált ACE-gátló hatásának összehasonlítása fiziológiás albuminkoncentráción. A táblázat az albuminhoz kötött különböző zsírsavak HSA-mediált ACE-gátló hatását foglalja össze 45 g/L HSA koncentráció mellett, a gátlás mértéke (%) és az IC₅₀ értékek alapján. A zsírsavak az ACE-gátlás mértéke szerint csökkenő sorrendben kerültek feltüntetésre. A gátlás mértéke minden esetben a zsírsavmentes HSA által kiváltott ACE-aktivitáshoz viszonyított relatív változást jelzi. A táblázat egyértelműen szemlélteti, hogy az ACE-gátló hatás nem kizárólag a zsírsavak telítettségétől vagy omega-besorolásától függ, hanem szoros összefüggést mutat a szénláncosszal, a kettős kötések számával, valamint azok térbeli elrendeződésével. Azonos szénatomszám mellett is jelentős különbségek figyelhetők meg az egyes izomerek között, ami arra utal, hogy az albumin konformációját módosító hatás döntő szerepet játszik a HSA-ACE kölcsönhatás hatékonyságának meghatározásában.

A szöveti ACE-n végzett kísérletek tovább erősítik azt a következtetést, hogy a HSA-mediált, zsírsavfüggő ACE-gátlás nem korlátozódik a keringő enzimre. A tüdő-, szív- és nyirokcsomószövetből származó ACE esetében megfigyelt hasonló mintázat arra utal, hogy az albumin képes az intersticiális térben és a szöveti mikrokörnyezetben is funkcionális

szabályozó szerepet betölteni. Mivel a lokális angiotenzin II-képződés jelentős mértékben hozzájárul mind a hemodinamikai szabályozáshoz, mind a szöveti remodellinghez és gyulladásos folyamatokhoz, ezek az eredmények túlmutatnak a keringő RAAS klasszikus értelmezésén [90,91].

E ponton a zsírsavak által módosított HSA-ACE kölcsönhatás értelmezése természetes módon veti fel azt a kérdést, hogy az ACE felszíni szerkezeti állapotának egyéni vagy szövet-specifikus eltérései miként befolyásolhatják ezt a szabályozást. Mivel az ACE nagymértékben glikozilált fehérje, és poszttranszlációs módosításai adott esetekben befolyásolhatják mind a fehérje-fehérje interakciókat, mind az epitóp-hozzáférhetőséget [92], feltételezhető, hogy az albumin által közvetített gátlás hatékonysága nemcsak az albumin, hanem az ACE konformációs állapotától is függ.

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

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

Az S13 beteg tüdőszövetén végzett konformációs fingerprinting során észlelt eltérések különösen az N-domén C-terminális régióját érintő epitópok (6H6, 2D1, 6C8), valamint a C-domén N-terminális részén elhelyezkedő epitópok (1E10, 2H9) esetében voltak kifejezettek, ami arra utal, hogy az N- és C-domén határterületének szerkezeti környezete módosult. Ez összhangban áll azokkal a korábbi megfigyelésekkel, amelyek szerint ez a régió különösen érzékeny a poszttranszlációs módosításokra és fehérje-fehérje kölcsönhatásokra, és kulcsszerepet játszik az ACE funkcionális szabályozásában [39,93].

Az S13 tüdőmintájában megfigyelt, emelkedett 2H9/2D1 kötődési arány arra utal, hogy az ACE szialilációs állapota ebben a szöveti környezetben eltér a keringő formától. Tekintettel arra, hogy a 2D1 antitest kötődése különösen érzékeny a szialiláció mértékére, ezek az adatok azt valószínűsítik, hogy az atípusos fenotípus kialakulásában az ACE felszíni mikrokörnyezetét érintő poszttranszlációs módosulások játszhatnak szerepet. Ezek a

módosulások az epitóp-hozzáférhetőség arányain keresztül jelennek meg, és ezáltal módosítják a konformációs fingerprintet. Ez egyezik azzal a koncepcióval, hogy az ACE funkcionális heterogenitását a genetikai tényezők mellett a szövet-specifikus poszttranszlációs szabályozás is alakítja [94].

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

A megfigyelt különbség nem magyarázható az ACE mennyiségi eltéréseivel vagy az immunprecipitáció hatékonyságának változásával, mivel az aktivitásmérések normalizált körülmények között történtek, és a kontroll- és atípusos minták összehasonlítása azonos módszertani feltételek mellett zajlott. Ennek alapján valószínűsíthető, hogy az atípusos ACE-fenotípus háttérében olyan szerkezeti vagy konformációs sajátosság áll, amely közvetlenül befolyásolja az ACE és a HSA közötti funkcionális kölcsönhatást, különösen a zsírsavakat hordozó HSA esetében.

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

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

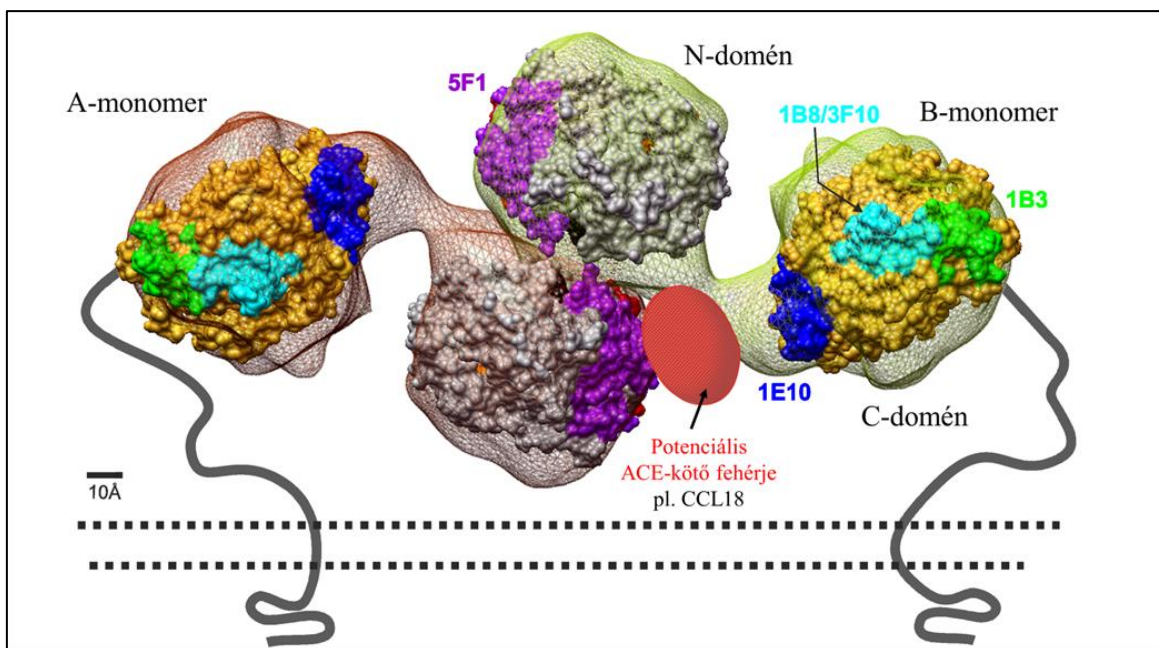
ezáltal egyszerre befolyásolhatja az epitóp-hozzáférhetőséget és az ACE katalitikus tulajdonságait.

Ezt a koncepciót erősíti a Gaucher-betegségben vizsgált lép-ACE fenotípusával mutatott párhuzam, ahol az albumin ACE-gátló hatása szintén megszűnt, és a konformációs fingerprint inverz mintázatot mutatott a doménhatárhoz közeli epitópok esetében [61]. A két állapot közötti hasonlóság arra utal, hogy a domének közötti hasadék funkcionális szabályozó térként viselkedhet, amelyet, ha különböző, szövet- vagy kórállapot specifikus fehérjék elfoglalnak az az ACE működésének mélyreható módosulásához vezethet.

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

Az SMPD1 által kódolt savi szfingomielináz központi szerepet játszik a szfingomielin-ceramid anyagcsere szabályozásában, és e gén funkciózavarai jól ismert lizoszomális tárolási betegségekhez, köztük a Niemann–Pick szindrómához kapcsolódnak [95]. Bár az S13 beteg esetében klinikailag manifeszt Niemann–Pick-betegség nem igazolódott, az SMPD1 génben azonosított strukturális eltérés olyan lizoszomális diszreguláció irányába mutat, amelyhez korábbi irodalmi adatok alapján a CCL18/PARC kemokin fokozott termelődése és felszaporodása társulhat [96].

Ez az összefüggés különösen releváns annak fényében, hogy a CCL18/PARC kis molekulatömegű (7,9–10 kDa), szekretált fehérje, amely térbeli és méretbeli sajátosságai alapján alkalmas lehet az ACE N- és C-doménjei közötti hasadék régiójában való kötődésre (15. ábra).



15. ábra: Az ACE dimer modellje [97]. Az ábra az ACE két monomerének N- és C-doménjeit mutatja. A jelölt színes régiók a mAb-k által felismert epitópokat reprezentálják: az N-doménon például az 5F1, a C-doménon többek között az 1E10 epitópjai láthatók. A piros oválissal jelzett régió a konformációs változások alapján feltételezett ACE-kötő fehérje (CCL18) potenciális kötődési helyét szemlélteti.

Kimutatták, hogy Gaucher-kórban is megemelkedik a CCL18 szint [98,99]. Kiegészítő kísérletes megfigyelések (amelyek a jelen értekezésben nem kerülnek részletes bemutatásra) arra utalnak, hogy tüdőminták normál lép, illetve CCL18-at tartalmazó Gaucher lép mintákkal történő inkubálása során a CCL18 képes befolyásolni az ACE funkcionális paramétereit, és így reális jelöltként merül fel egy új, eddig nem ismert ACE-kötő fehérjeként. Ennek megfelelően az S13 beteg ACE-fenotípusa olyan modellként értelmezhető, amelyben több, egymást erősítő genetikai eltérés következtében megváltozott fehérje-mikrokörnyezet alakul ki, és ez hozzájárulhat az ACE felszíni konformációjának, HSA-val való kölcsönhatásának és endogén gátlásának együttes módosulásához.

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

hogy az aktív szénnel végzett zsírsavmentesítés a zsírsavak mellett más hidrofób, albuminhoz kötött ligandok eltávolításával is járhat. A klinikai minták heterogén beteganyagot képviselnek, ami növeli az eredmények biológiai relevanciáját, ugyanakkor korlátozza az egyes betegcsoportokra vonatkozó következtetések levonását. A szérumminták ezért elsősorban a HSA-koncentráció, a teljes FFA-koncentráció és az endogén ACE-gátlás közötti kapcsolat értékelésére alkalmasak; annak pontos megítélése, hogy ezek a tényezők milyen irányban és milyen mértékben befolyásolják egymást *in vivo*, további célzott vizsgálatokat igényel. A szöveti vizsgálatok értelmezésénél figyelembe kell venni, hogy a tüdő-, nyirokcsomó- és szívszöveti eredmények sebészeti beavatkozásokból származó, szövettípusonként egy-egy humán mintán alapulnak, ezért a társbetegségek ACE-aktivitásra vagy gátolhatóságra gyakorolt hatása teljes mértékben nem zárható ki. Mivel azonban az összehasonlítás minden esetben ugyanazon szöveti homogenizátumon történt, az eredmények elsősorban a zsírsavakat hordozó és a zsírsavmentes HSA közötti relatív különbséget jelzik. Az S13 beteg eredményei pedig nem az atípusos ACE-fenotípus gyakoriságáról adnak információt, hanem azt mutatják meg, hogy az ACE felszíni szerkezeti állapotának eltérése jelentősen módosíthatja a HSA-mediált endogén ACE-gátlást.

A további vizsgálatok egyik fontos iránya olyan célzott klinikai mintagyűjtés lehet, amelyben az endogén ACE-gátlás meghatározása mellett az albuminhoz kötött zsírsavak összetétele is részletesen mérhető. Ez lehetővé tenné annak tisztázását, hogy a teljes FFA-koncentráció helyett az egyes zsírsavak relatív aránya, albuminkötött frakciója vagy kötődési mintázata mutat-e szorosabb kapcsolatot az ACE-gátlás mértékével. Különösen relevánsak lehetnek azok az állapotok, amelyekben az albuminkoncentráció, a lipidanyagcsere vagy a gyulladásos mikrokörnyezet megváltozik [100,101]. Fontos további irány az ACE-fenotipizálás nagyobb betegpopulációkban történő alkalmazása annak vizsgálatára, hogy az atípusos felszíni mintázatok előfordulnak-e más betegekben is, és összefüggnek-e az endogén ACE-gátlás változásával vagy klinikai jellemzőkkel.

Összességében eredményeink azt mutatják, hogy az endogén ACE-gátlás egy többszintű, konformációérzékeny szabályozási folyamat, amelyet az albuminhoz kötött zsírsavak minőségi összetétele és az ACE felszíni szerkezeti állapota egyaránt befolyásol. A klinikai és kísérletes adatok együttesen alátámasztják, hogy a HSA nem csupán transzportfehérjeként értelmezhető, hanem az ACE működését szabályozó fehérjeként is, amelynek hatása az aktuális metabolikus és szöveti mikrokörnyezet függvényében változhat. Az atípusos ACE-fenotípus vizsgálata rámutatott arra is, hogy az enzim felszíni szerkezeti

állapotának egyéni eltérései jelentősen módosíthatják az endogén gátlás mértékét. Mindez új szempontot ad az ACE-aktivitás biokémiai és klinikai értelmezéséhez.

A doktori értekezésben bemutatott új eredmények:

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

ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

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

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

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

SUMMARY

Angiotensin-converting enzyme (ACE) is a central component of the renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS). Although pharmacological inhibition of ACE is widely used in clinical practice, the mechanisms underlying endogenous regulation of the enzyme are not fully understood. Previous observations indicated that human serum albumin (HSA) is capable of inhibiting ACE; however, the molecular basis of this inhibition had remained unclear.

In the present work, we demonstrated that the extent of HSA-mediated endogenous ACE inhibition does not depend solely on the presence of albumin but is fundamentally determined by the structural properties of fatty acids (FAs) bound to albumin. We showed that endogenous ACE inhibition mediated through the HSA–ACE interaction is FA-dependent and is influenced by FA chain length, degree of saturation, and spatial conformation. Based on our *in vitro* experiments, albumin-bound long-chain FAs exerted stronger ACE inhibition. Among polyunsaturated FAs, α -linolenic acid and γ -linolenic acid showed the most pronounced inhibitory effects, while among saturated fatty acids, stearic acid and palmitic acid were the most effective. In contrast, the monounsaturated vaccenic acid exhibited a more moderate inhibitory effect. These findings indicate that endogenous ACE inhibition represents a ligand-specific, finely tuned regulatory mechanism.

Analysis of human samples confirmed that the qualitative composition of albumin-bound FAs is a key determinant of the extent of endogenous ACE inhibition, whereas total serum free FA concentration alone did not correlate with ACE inhibition. This supports the concept that HSA functions as an active regulator of ACE activity rather than a passive carrier protein.

ACE phenotyping studies further refined this concept. We demonstrated that HSA-mediated endogenous ACE inhibition can be markedly altered under pathological conditions. In a patient exhibiting an atypical ACE phenotype, alterations in the surface structural state of ACE were associated with disruption of the HSA–ACE–FA interaction, resulting in a substantial reduction of endogenous inhibition. This case illustrates that the effectiveness of albumin-mediated ACE inhibition also depends on the conformational state of ACE.

Overall, our results reveal a previously unrecognized role of the HSA–ACE–FA axis in the endogenous regulation of ACE and demonstrate that this mechanism is physiologically relevant yet vulnerable under pathological conditions. These findings provide a novel conceptual framework for understanding endogenous control of ACE activity.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Pop, D.; Dădărlat-Pop, A.; Tomoaia, R.; Zdrengea, D.; Caloian, B. Updates on the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and the Cardiovascular Continuum. *Biomedicines* **2024**, *12*, doi:10.3390/BIOMEDICINES12071582.
2. Grobbee, D.E.; Filippatos, G.; Desai, N.R.; Coats, A.J.S.; Pinto, F.; Rosano, G.M.C.; Cleland, J.G.F.; Kammerer, J.; de Arellano, A.R. Epidemiology and Risk Factors for Hyperkalaemia in Heart Failure. *ESC Heart Fail.* **2024**, *11*, 1821–1840, doi:10.1002/EHF2.14661.
3. Bánhegyi, V.; Enyedi, A.; Fülöp, G.Á.; Oláh, A.; Siket, I.M.; Váradi, C.; Bottyán, K.; Lódi, M.; Csongrádi, A.; Umar, A.J.; et al. Human Tissue Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Activity Is Regulated by Genetic Polymorphisms, Posttranslational Modifications, Endogenous Inhibitors and Secretion in the Serum, Lungs and Heart. *Cells* **2021**, *Vol. 10, Page 1708* **2021**, *10*, 1708, doi:10.3390/cells10071708.
4. Fagyas, M.; Uri, K.; Siket, I.M.; Daragó, A.; Boczán, J.; Bányai, E.; Édes, I.; Papp, Z.; Tóth, A. New Perspectives in the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) III: Endogenous Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Provides Protection against Cardiovascular Diseases. *PLoS One* **2014**, *9*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0093719.
5. Fagyas, M.; Uri, K.; Siket, I.M.; Fülöp, G.B.Á.; Csató, V.; Daragó, A.; Boczán, J.; Bányai, E.; Szentkirályi, I.E.; Maros, T.M.; et al. New Perspectives in the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) II: Albumin Suppresses Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Activity in Human. *PLoS One* **2014**, *9*, e87844, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0087844.
6. Wu, D.; Gucwa, M.; Czub, M.P.; Cooper, D.R.; Shabalin, I.G.; Fritzen, R.; Arya, S.; Schwarz-Linek, U.; Blindauer, C.A.; Minor, W.; et al. Structural and Biochemical Characterisation of Co²⁺-Binding Sites on Serum Albumins and Their Interplay with Fatty Acids. *Chem. Sci.* **2023**, *14*, 6244–6258, doi:10.1039/D3SC01723K.
7. Bloedon, L.A.T.; Balikai, S.; Szapary, P.O.; Bloedon, L.A.T.; Rader, D.J.; Szapary, P.O.; Chittams, J.; Berlin, J.A.; Szapary, P.O.; Cunnane, S.C. Flaxseed and Cardiovascular Risk Factors: Results from a Double Blind, Randomized, Controlled Clinical Trial. *J. Am. Coll. Nutr.* **2008**, *27*, 65–74, doi:10.1080/07315724.2008.10719676.
8. Fazeli Moghadam, E.; Khaghani, L.; Shekarchizadeh-Esfahani, P. Flaxseed Lowers Blood Pressure in Hypertensive Subjects: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Clin. Nutr. Res.* **2024**, *13*, 295, doi:10.7762/CNR.2024.13.4.295.
9. Santos, R.A.S.; Oudit, G.Y.; Verano-Braga, T.; Canta, G.; Steckelings, U.M.; Bader, M. The Renin-Angiotensin System: Going beyond the Classical Paradigms. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2019**, *316*, H958, doi:10.1152/ajpheart.00723.2018.

10. Atlas, S.A. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. *J. Manag. Care Pharm.* **2007**, *13*, 10.18553/jmcp.2007.13.s8-b.9, doi:10.18553/jmcp.2007.13.s8-b.9.
11. Fyhrquist, F.; Saijonmaa, O. Renin-Angiotensin System Revisited. *J. Intern. Med.* **2008**, *264*, 224–236, doi:10.1111/J.1365-2796.2008.01981.X;CTYPE:STRING:JOURNAL.
12. Guo, D.F.; Sun, Y.L.; Hamet, P.; Inagami, T. The Angiotensin II Type 1 Receptor and Receptor-Associated Proteins. *Cell Res.* **2001**, *11*, 165–180, doi:10.1038/sj.cr.7290083.
13. Padia, S.H.; Carey, R.M. AT₂ RECEPTORS: BENEFICIAL COUNTER-REGULATORY ROLE IN CARDIOVASCULAR AND RENAL FUNCTION. *Pflugers Arch.* **2012**, *465*, 99, doi:10.1007/S00424-012-1146-3.
14. Studdy, P.R.; Lapworth, R.; Bird, R. Angiotensin-Converting Enzyme and Its Clinical Significance--a Review. *J. Clin. Pathol.* **1983**, *36*, 938, doi:10.1136/jcp.36.8.938.
15. Enyedi, A.; Csongrádi, A.; Altorjay, I.T.; Beke, G.L.; Váradi, C.; Enyedi, E.E.; Kiss, D.R.; Bányai, E.; Kalina, E.; Kappelmayer, J.; et al. Combined Application of Angiotensin Converting Enzyme and Chitotriosidase Analysis Improves the Laboratory Diagnosis of Sarcoidosis. *Clinica Chimica Acta* **2020**, *500*, 155–162, doi:10.1016/j.cca.2019.10.010.
16. Fagyas, M.; Uri, K.; Siket, I.M.; Daragó, A.; Boczán, J.; Bányai, E.; Édes, I.; Papp, Z.; Tóth, A. New Perspectives in the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) I: Endogenous Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibition. *PLoS One* **2014**, *9*, e87843, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0087843.
17. Roche, M.; Rondeau, P.; Singh, N.R.; Tarnus, E.; Bourdon, E. The Antioxidant Properties of Serum Albumin. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 1783–1787, doi:10.1016/j.febslet.2008.04.057.
18. Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. Crystal Structure of Human Serum Albumin at 2.5 Å Resolution. *Protein Eng.* **1999**, *12*, 439–446, doi:10.1093/protein/12.6.439.
19. Theodore Peters Jr. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*; 1st ed.; Academic Press: Cambridge, 1995;
20. Belinskaia, D.A.; Goncharov, N. V. Theoretical and Practical Aspects of Albumin Esterase Activity. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2020**, *46*, 287–298, doi:10.1134/S1068162020030036.
21. Tayyab, S.; Feroz, S.R. Serum Albumin: Clinical Significance of Drug Binding and Development as Drug Delivery Vehicle. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **2021**, *123*, 193–218, doi:10.1016/bs.apcsb.2020.08.003.

22. Birkett, D.J.; Myers, S.P.; Sudlow, G. Effects of Fatty Acids on Two Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin. *Mol. Pharmacol.* **1977**, *13*, 987–992, doi:10.1016/s0026-895x(25)12512-1.
23. Carter, D.C.; Ho, J.X. Structure of Serum Albumin. *Adv. Protein Chem.* **1994**, *45*, 153–203, doi:10.1016/s0065-3233(08)60640-3.
24. Curry, S. Plasma Albumin as a Fatty Acid Carrier. *Advances in Molecular and Cell Biology* **2003**, *33*, 29–46, doi:10.1016/S1569-2558(03)33003-6.
25. Curry, S.; Mandelkow, H.; Brick, P.; Franks, N. Crystal Structure of Human Serum Albumin Complexed with Fatty Acid Reveals an Asymmetric Distribution of Binding Sites. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 827–835, doi:10.1038/1869.
26. Fujiwara, S.I.; Amisaki, T. Fatty Acid Binding to Serum Albumin: Molecular Simulation Approaches. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2013**, *1830*, 5427–5434, doi:10.1016/j.bbagen.2013.03.032.
27. Simard, J.R.; Zunszain, P.A.; Hamilton, J.A.; Curry, S. Location of High and Low Affinity Fatty Acid Binding Sites on Human Serum Albumin Revealed by NMR Drug-Competition Analysis. *J. Mol. Biol.* **2006**, *361*, 336–351, doi:10.1016/j.jmb.2006.06.028.
28. Suganami, T.; Tanimoto-Koyama, K.; Nishida, J.; Itoh, M.; Yuan, X.; Mizuarai, S.; Kotani, H.; Yamaoka, S.; Miyake, K.; Aoe, S.; et al. Role of the Toll-like Receptor 4/NF-KappaB Pathway in Saturated Fatty Acid-Induced Inflammatory Changes in the Interaction between Adipocytes and Macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 84–91, doi:10.1161/01.ATV.0000251608.09329.9a.
29. Chavez, J.A.; Summers, S.A. Characterizing the Effects of Saturated Fatty Acids on Insulin Signaling and Ceramide and Diacylglycerol Accumulation in 3T3-L1 Adipocytes and C2C12 Myotubes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *419*, 101–109, doi:10.1016/j.abb.2003.08.020.
30. Summers, S.A. Ceramides in Insulin Resistance and Lipotoxicity. *Prog. Lipid Res.* **2006**, *45*, 42–72, doi:10.1016/j.plipres.2005.11.002.
31. Boden, G. Obesity, Insulin Resistance and Free Fatty Acids. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **2011**, *18*, 139–143, doi:10.1097/MED.0b013e3283444b09.
32. Wenjie, M.; Wu, J.H.Y.; Wang, Q.; Lemaitre, R.N.; Mukamal, K.J.; Djoussé, L.; King, I.B.; Song, X.; Biggs, M.L.; Delaney, J.A.; et al. Prospective Association of Fatty Acids in the de Novo Lipogenesis Pathway with Risk of Type 2 Diabetes: The Cardiovascular Health Study. *American Journal of Clinical Nutrition* **2015**, *101*, 153–163, doi:10.3945/ajcn.114.092601.
33. Lee, J.Y.; Sohn, K.H.; Rhee, S.H.; Hwang, D. Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 16683–16689, doi:10.1074/jbc.M011695200.

34. Cao, X.; Xia, J.; Zhou, Y.; Wang, Y.; Xia, H.; Wang, S.; Liao, W.; Sun, G. The Effect of MUFA-Rich Food on Lipid Profile: A Meta-Analysis of Randomized and Controlled-Feeding Trials. *Foods* **2022**, *11*, 1982, doi:10.3390/foods11131982.
35. Liu, W.; Xie, X.; Liu, M.; Zhang, J.; Liang, W.; Chen, X. Serum ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids and Potential Influence Factors in Elderly Patients with Multiple Cardiovascular Risk Factors. *Scientific Reports* **2018**, *8*, 1102-, doi:10.1038/s41598-018-19193-5.
36. Smith, W.L.; DeWitt, D.L.; Garavito, R.M. Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 145–182, doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.145.
37. Samuelsson, B. Leukotrienes: Mediators of Immediate Hypersensitivity Reactions and Inflammation. *Science* **1983**, *220*, 568–575, doi:10.1126/science.6301011.
38. Kharazmi-Khorassani, J.; Zirak, R.G.; Ghazizadeh, H.; Zare-Feyzabadi, R.; Kharazmi-Khorassani, S.; Naji-Reihani-garmroudi, S.; Kazemi, E.; Esmaily, H.; Javan-Doust, A.; Banpour, H.; et al. The Role of Serum Monounsaturated Fatty Acids (MUFAs) and Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs) in Cardiovascular Disease Risk. *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis* **2021**, *92*, e2021049, doi:10.23750/abm.v92i2.9235.
39. Bernstein, K.E.; Ong, F.S.; Blackwell, W.-L.B.; Shah, K.H.; Giani, J.F.; Gonzalez-Villalobos, R.A.; Shen, X.Z.; Fuchs, S. A Modern Understanding of the Traditional and Nontraditional Biological Functions of Angiotensin-Converting Enzyme. **2013**, doi:10.1124/pr.112.006809.
40. Natesh, R.; Schwager, S.L.U.; Sturrock, E.D.; Acharya, K.R. Crystal Structure of the Human Angiotensin-Converting Enzyme-Lisinopril Complex. *Nature* **2003**, *421*, 551–554, doi:10.1038/nature01370.
41. Wei, L.; Alhenc-Gelas, F.; Corvol, P.; Clauser, E. The Two Homologous Domains of Human Angiotensin I-Converting Enzyme Are Both Catalytically Active. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266*, 9002–9008, doi:10.1016/s0021-9258(18)31543-6.
42. Rousseau, A.; Michaud, A.; Chauvet, M.T.; Lenfant, M.; Corvol, P. The Hemoregulatory Peptide N-Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro Is a Natural and Specific Substrate of the N-Terminal Active Site of Human Angiotensin-Converting Enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 3656–3661, doi:10.1074/jbc.270.8.3656.
43. Vazeux, G.; Cotton, J.; Cuniasse, P.; Dive, V. Potency and Selectivity of RXP407 on Human, Rat, and Mouse Angiotensin-Converting Enzyme. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *61*, 835–841, doi:10.1016/S0006-2952(01)00550-0.
44. Georgiadis, D.; Cuniasse, P.; Cotton, J.; Yiotakis, A.; Dive, V. Structural Determinants of RXPA380, a Potent and Highly Selective Inhibitor of the Angiotensin-Converting Enzyme C-Domain. *Biochemistry* **2004**, *43*, 8048–8054, doi:10.1021/bi049504q.

45. Wei, L.; Clauser, E.; Alhene-Gelas, F.; Corvol, P. The Two Homologous Domains of Human Angiotensin I-Converting Enzyme Interact Differently with Competitive Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, 267, 13398–13405, doi:10.1016/s0021-9258(18)42224-7.
46. Fernandez, J.H.; Hayashi, M.A.F.; Camargo, A.C.M.; Neshich, G. Structural Basis of the Lisinopril-Binding Specificity in N- and C-Domains of Human Somatic ACE. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 308, 219–226, doi:10.1016/S0006-291X(03)01363-9.
47. Azizi, M.; Rousseau, A.; Ezan, E.; Guyene, T.T.; Michelet, S.; Grognet, J.M.; Lenfant, M.; Corvol, P.; Ménard, J. Acute Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Increases the Plasma Level of the Natural Stem Cell Regulator N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline. *J. Clin. Invest.* **1996**, 97, 839–844, doi:10.1172/JCI118484.
48. Acharya, K.R.; Gregory, K.S.; Sturrock, E.D. Advances in the Structural Basis for Angiotensin-1 Converting Enzyme (ACE) Inhibitors. *Biosci. Rep.* **2024**, 44, doi:10.1042/BSR20240130.
49. Beldent, V.; Michaud, A.; Wei, L.; Chauvet, M.T.; Corvol, P. Proteolytic Release of Human Angiotensin-Converting Enzyme: Localization of the Cleavage Site. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268, 26428–26434, doi:10.1016/s0021-9258(19)74332-4.
50. Lambert, D.W.; Yarski, M.; Warner, F.J.; Thornhill, P.; Parkin, E.T.; Smith, A.I.; Hooper, N.M.; Turner, A.J. Tumor Necrosis Factor- α Convertase (ADAM17) Mediates Regulated Ectodomain Shedding of the Severe-Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus (SARS-CoV) Receptor, Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ACE2). *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280, 30113–30119, doi:10.1074/jbc.M505111200.
51. Anthony, C.S.; Corradi, H.R.; Schwager, S.L.U.; Redelinghuys, P.; Georgiadis, D.; Dive, V.; Acharya, K.R.; Sturrock, E.D. The N Domain of Human Angiotensin-I-Converting Enzyme: The Role of N-Glycosylation and the Crystal Structure in Complex with an N-Domain-Specific Phosphinic Inhibitor, RXP407. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 35685, doi:10.1074/JBC.M110.167866.
52. O'Neill, H.G.; Redelinghuys, P.; Schwager, S.L.U.; Sturrock, E.D. The Role of Glycosylation and Domain Interactions in the Thermal Stability of Human Angiotensin-Converting Enzyme. *Biol. Chem.* **2008**, 389, 1153–1161, doi:10.1515/BC.2008.131.
53. Ripka, J.E.; Ryan, J.W.; Valido, F.A.; Chung, A.Y.K.; Peterson, C.M.; Urry, R.L. N-Glycosylation of Forms of Angiotensin Converting Enzyme from Four Mammalian Species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 196, 503–508, doi:10.1006/bbrc.1993.2278.

54. Kryukova, O. V.; Tikhomirova, V.E.; Golukhova, E.Z.; Evdokimov, V. V.; Kalantarov, G.F.; Trakht, I.N.; Schwartz, D.E.; Dull, R.O.; Gusakov, A. V.; Uporov, I. V.; et al. Tissue Specificity of Human Angiotensin I-Converting Enzyme. *PLoS One* **2015**, *10*, doi:10.1371/journal.pone.0143455.
55. Popova, I.A.; Lubbe, L.; Petukhov, P.A.; Kalantarov, G.F.; Trakht, I.N.; Chernykh, E.R.; Leplina, O.Y.; Lyubimov, A. V.; Garcia, J.G.N.; Dudek, S.M.; et al. Epitope Mapping of Novel Monoclonal Antibodies to Human Angiotensin I-Converting Enzyme. *Protein Sci.* **2021**, *30*, 1577–1593, doi:10.1002/PRO.4091.
56. Naperova, I.A.; Balyasnikova, I. V.; Schwartz, D.E.; Watermeyer, J.; Sturrock, E.D.; Kost, O.A.; Danilov, S.M. Mapping of Conformational MAb Epitopes to the C Domain of Human Angiotensin I-Converting Enzyme. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 3396–3411, doi:10.1021/pr800142w.
57. Gordon, K.; Balyasnikova, I. V.; Nesterovitch, A.B.; Schwartz, D.E.; Sturrock, E.D.; Danilov, S.M. Fine Epitope Mapping of Monoclonal Antibodies 9B9 and 3G8 to the N Domain of Angiotensin-Converting Enzyme (CD143) Defines a Region Involved in Regulating Angiotensin-Converting Enzyme Dimerization and Shedding. *Tissue Antigens* **2010**, *75*, 136–150, doi:10.1111/j.1399-0039.2009.01416.x.
58. Danilov, S.M.; Watermeyer, J.M.; Balyasnikova, I. V.; Gordon, K.; Kugaevskaya, E. V.; Elisseeva, Y.E.; Albrecht, R.F.; Sturrock, E.D. Fine Epitope Mapping of Monoclonal Antibody 5F1 Reveals Anticatalytic Activity toward the N Domain of Human Angiotensin-Converting Enzyme†. *Biochemistry* **2007**, *46*, 9019–9031, doi:10.1021/bi700489v.
59. Danilov, S.M.; Balyasnikova, I. V.; Danilova, A.S.; Naperova, I.A.; Arablinskaya, N.E.; Borisov, S.E.; Metzger, R.; Franke, F.E.; Schwartz, D.E.; Gachok, I. V.; et al. Conformational Fingerprinting of the Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE). 1. Application in Sarcoidosis. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 5782–5793, doi:10.1021/PR100564R/ASSET/IMAGES/MEDIUM/PR-2010-00564R_0008.GIF.
60. Petrov, M.N.; Shilo, V.Y.; Tarasov, A. V.; Schwartz, D.E.; Garcia, J.G.N.; Kost, O.A.; Danilov, S.M. Conformational Changes of Blood ACE in Chronic Uremia. *PLoS One* **2012**, *7*, e49290, doi:10.1371/journal.pone.0049290.
61. Danilov, S.M.; Tikhomirova, V.E.; Metzger, R.; Naperova, I.A.; Bukina, T.M.; Goker-Alpan, O.; Tayebi, N.; Gayfullin, N.M.; Schwartz, D.E.; Samokhodskaya, L.M.; et al. ACE Phenotyping in Gaucher Disease. *Mol. Genet. Metab.* **2018**, *123*, 501–510, doi:10.1016/j.ymgme.2018.02.007.
62. Carmona, A.K.; Schwager, S.L.; Juliano, M.A.; Juliano, L.; Sturrock, E.D. A Continuous Fluorescence Resonance Energy Transfer Angiotensin I-Converting Enzyme Assay. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1971–1976, doi:10.1038/nprot.2006.306.

63. Csongrádi, A.; Enyedi, A.; Takács, I.; Végh, T.; Mányiné, I.S.; Pólik, Z.; Altorjay, I.T.; Balla, J.; Balla, G.; Édes, I.; et al. Optimized Angiotensin-Converting Enzyme Activity Assay for the Accurate Diagnosis of Sarcoidosis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* **2018**, *56*, 1117–1125, doi:10.1515/cclm-2017-0837.
64. Danilov, S.M.; Balyasnikova, I. V.; Albrecht, R.F.; Kost, O.A. Simultaneous Determination of ACE Activity with 2 Substrates Provides Information on the Status of Somatic ACE and Allows Detection of Inhibitors in Human Blood. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2008**, *52*, 90–103, doi:10.1097/FJC.0B013E31817FD3BC.
65. Szabó, A.Á.; Enyedi, E.E.; Altorjay, I.T.; Hajnal, P.; Pintér, T.B.; Mányiné, I.S.; Váradi, C.; Bányai, E.; Tóth, A.; Papp, Z.; et al. 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.* **2024**, *62*, 1393–1401, doi:10.1515/CCLM-2023-1288/XML.
66. Stearic Acid | C₁₈H₃₆O₂ | CID 5281 - PubChem Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281> (accessed on 8 February 2026).
67. Trans-7-Octadecenoic Acid | C₁₈H₃₄O₂ | CID 4602094 - PubChem Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4602094> (accessed on 8 February 2026).
68. 7Z-Octadecenoic Acid | C₁₈H₃₄O₂ | CID 5282755 - PubChem Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5282755> (accessed on 8 February 2026).
69. Oleic Acid | C₁₈H₃₄O₂ | CID 445639 - PubChem Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/445639> (accessed on 8 February 2026).
70. Santhamma, K.R.; Sen, I. Specific Cellular Proteins Associate with Angiotensin-Converting Enzyme and Regulate Its Intracellular Transport and Cleavage-Secretion. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 23253–23258, doi:10.1074/jbc.M000593200.
71. Villard, E.; Alonso, A.; Agrapart, M.; Challah, M.; Soubrier, F. Induction of Angiotensin I-Converting Enzyme Transcription by a Protein Kinase C-Dependent Mechanism in Human Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 25191–25197, doi:10.1074/jbc.273.39.25191.
72. Zhang, Y.; Bloem, L.J.; Yu, L.; Estridge, T.B.; Iversen, P.W.; McDonald, C.E.; Schrementi, J.P.; Wang, X.S.; Vlahos, C.J.; Wang, J. Protein Kinase C BII Activation Induces Angiotensin Converting Enzyme Expression in Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* **2003**, *57*, 139–146, doi:10.1016/S0008-6363(02)00610-7.
73. Danilov, S.M.; Lünsdorf, H.; Akinbi, H.T.; Nesterovitch, A.B.; Epshtein, Y.; Letsiou, E.; Kryukova, O. V.; Piegeler, T.; Golukhova, E.Z.; Schwartz, D.E.; et al. Lysozyme and Bilirubin Bind to ACE and Regulate Its Conformation and Shedding. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, doi:10.1038/srep34913.

74. Rawendra, R.D.S.; Aisha; Chang, C.I.; Aulanni'am; Chen, H.H.; Huang, T.C.; Hsu, J.L. A Novel Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived from Proteolytic Digest of Chinese Soft-Shelled Turtle Egg White Proteins. *J. Proteomics* **2013**, *94*, 359–369, doi:10.1016/j.jprot.2013.10.006.
75. Danilov, S.M.; Lünsdorf, H.; Akinbi, H.T.; Nesterovitch, A.B.; Epshtein, Y.; Letsiou, E.; Kryukova, O. V.; Piegeler, T.; Golukhova, E.Z.; Schwartz, D.E.; et al. Lysozyme and Bilirubin Bind to ACE and Regulate Its Conformation and Shedding. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 1–14, doi:10.1038/srep34913.
76. WHO Cardiovascular Diseases (CVDs) Available online: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (accessed on 10 November 2025).
77. Salvador, G.L.O.; Marmentini, V.M.; Cosmo, W.R.; Junior, E.L. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors Reduce Mortality Compared to Angiotensin Receptor Blockers: Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur. J. Prev. Cardiol.* **2017**, *24*, 1914–1924, doi:10.1177/2047487317728766.
78. Huang, T.; An, Z.; Huang, Z.; Gao, W.; Hao, B.; Xu, J. Serum Albumin and Cardiovascular Disease: A Mendelian Randomization Study. *BMC Cardiovasc. Disord.* **2024**, *24*, 196, doi:10.1186/S12872-024-03873-4.
79. Arques, S. Human Serum Albumin in Cardiovascular Diseases. *Eur. J. Intern. Med.* **2018**, *52*, 8–12, doi:10.1016/j.ejim.2018.04.014.
80. Oda, E. Decreased Serum Albumin Predicts Hypertension in a Japanese Health Screening Population. *Intern. Med.* **2014**, *53*, 655–660, doi:10.2169/INTERNALMEDICINE.53.1894.
81. Ashraf, S.; Qaiser, H.; Tariq, S.; Khalid, A.; Makeen, H.A.; Alhazmi, H.A.; Ul-Haq, Z. Unraveling the Versatility of Human Serum Albumin – A Comprehensive Review of Its Biological Significance and Therapeutic Potential. *Curr. Res. Struct. Biol.* **2023**, *6*, doi:10.1016/j.crstbi.2023.100114.
82. Roy, D.; Kumar, V.; James, J.; Shihabudeen, M.S.; Kulshrestha, S.; Goel, V.; Thirumurugan, K. Evidence That Chemical Chaperone 4-Phenylbutyric Acid Binds to Human Serum Albumin at Fatty Acid Binding Sites. *PLoS One* **2015**, *10*, e0133012, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0133012.
83. Nakagomi, K.; Fujimura, A.; Ebisu, H.; Sakai, T.; Sadakane, Y.; Fujii, N.; Tanimura, T. Acein-1, a Novel Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide Isolated from Tryptic Hydrolysate of Human Plasma. *FEBS Lett.* **1998**, *438*, 255–257, doi:10.1016/S0014-5793(98)01311-8.
84. Nakagomi, K.; Ebisu, H.; Sadakane, Y.; Fujii, N.; Akizawa, T.; Tanimura, T. Properties and Human Origin of Two Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Isolated from a Tryptic Hydrolysate of Human Serum Albumin. *Biol. Pharm. Bull.* **2000**, *23*, 879–883, doi:10.1248/BPB.23.879.

85. Ogawa, A.; Suzuki, Y.; Aoyama, T.; Takeuchi, H. Dietary Alpha-Linolenic Acid Inhibits Angiotensin-Converting Enzyme Activity and mRNA Expression Levels in the Aorta of Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Oleo Sci.* **2009**, *58*, 355–360, doi:10.5650/JOS.58.355.
86. Naghshi, S.; Aune, D.; Beyene, J.; Mobarak, S.; Asadi, M.; Sadeghi, O. Dietary Intake and Biomarkers of Alpha Linolenic Acid and Risk of All Cause, Cardiovascular, and Cancer Mortality: Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Cohort Studies. *BMJ* **2021**, *375*, doi:10.1136/BMJ.N2213.
87. Rodriguez-Leyva, D.; Weighell, W.; Edel, A.L.; Lavalley, R.; Dibrov, E.; Pinneker, R.; Maddaford, T.G.; Ramjiawan, B.; Aliani, M.; Guzman, R.; et al. Potent Antihypertensive Action of Dietary Flaxseed in Hypertensive Patients. *Hypertension* **2013**, *62*, 1081–1089, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02094.
88. N-3 Fatty Acids and Cardiovascular Outcomes in Patients with Dysglycemia. *New England Journal of Medicine* **2012**, *367*, 309–318, doi:10.1056/nejmoa1203859.
89. Rizos, E.C.; Ntzani, E.E.; Bika, E.; Kostapanos, M.S.; Elisaf, M.S. Association between Omega-3 Fatty Acid Supplementation and Risk of Major Cardiovascular Disease Events: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JAMA* **2012**, *308*, 1024–1033, doi:10.1001/2012.jama.11374.
90. Oosthuizen, D.; Sturrock, E.D. Exploring the Impact of ACE Inhibition in Immunity and Disease. *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone. Syst.* **2022**, *2022*, doi:10.1155/2022/9028969.
91. Bernstein, K.E.; Cao, D.Y.; Shibata, T.; Saito, S.; Bernstein, E.A.; Nishi, E.; Yamashita, M.; Tourtellotte, W.G.; Zhao, T. V.; Khan, Z. Classical and Nonclassical Effects of Angiotensin-Converting Enzyme: How Increased ACE Enhances Myeloid Immune Function. *Journal of Biological Chemistry* **2024**, *300*, 107388, doi:10.1016/j.jbc.2024.107388.
92. Danilov, S.; Jaspard, E.; Churakova, T.; Towbin, H.; Savoie, F.; Wei, L.; Alhenc-Gelas, F. Structure-Function Analysis of Angiotensin I-Converting Enzyme Using Monoclonal Antibodies. Selective Inhibition of the Amino-Terminal Active Site. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 26806–26814, doi:10.1016/s0021-9258(18)47091-3.
93. Danilov, S.M.; Tikhomirova, V.E.; Kryukova, O. V.; Balatsky, A. V.; Bulaeva, N.I.; Golukhova, E.Z.; Bokeria, L.A.; Samokhodskaya, L.M.; Kost, O.A. Conformational Fingerprint of Blood and Tissue ACEs: Personalized Approach. *PLoS One* **2018**, *13*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0209861.
94. Skidgel, R.A.; Erdös, E.G. The Broad Substrate Specificity of Human Angiotensin I Converting Enzyme. *Clin. Exp. Hypertens. A* **1987**, *A9*, 243–259, doi:10.3109/10641968709164184.
95. Erdős, M.; Erdős, M. Niemann–Pick–Betegség: Saját Megfigyelések És Új Terápiás Lehetőségek. *Orv. Hetil.* **2021**, *162*, 74–80, doi:10.1556/650.2021.31950.

96. Brinkman, J.; Wijburg, F.A.; Hollak, C.E.; Groener, J.E.; Verhoek, M.; Scheij, S.; Aten, J.; Boot, R.G.; Aerts, J.M. Plasma Chitotriosidase and CCL18: Early Biochemical Surrogate Markers in Type B Niemann-Pick Disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2005**, *28*, 13–20, doi:10.1007/s10545-005-4416-9.
97. Danilov, S.M.; Gordon, K.; Nesterovitch, A.B.; Lünsdorf, H.; Chen, Z.; Castellon, M.; Popova, I.A.; Kalinin, S.; Mendonca, E.; Petukhov, P.A.; et al. An Angiotensin I-Converting Enzyme Mutation (Y465D) Causes a Dramatic Increase in Blood ACE via Accelerated ACE Shedding. *PLoS One* **2011**, *6*, doi:10.1371/journal.pone.0025952.
98. Raskovalova, T.; Deegan, P.B.; Yang, R.; Pavlova, E.; Stirnemann, J.; Labarère, J.; Zimran, A.; Mistry, P.K.; Berger, M. Plasma Chitotriosidase Activity versus CCL18 Level for Assessing Type I Gaucher Disease Severity: Protocol for a Systematic Review with Meta-Analysis of Individual Participant Data. *Syst. Rev.* **2017**, *6*, 87, doi:10.1186/s13643-017-0483-x.
99. Boot, R.G.; Verhoek, M.; De Fost, M.; Hollak, C.E.M.; Maas, M.; Bleijlevens, B.; Van Breemen, M.J.; Van Meurs, M.; Boven, L.A.; Laman, J.D.; et al. Marked Elevation of the Chemokine CCL18/PARC in Gaucher Disease: A Novel Surrogate Marker for Assessing Therapeutic Intervention. *Blood* **2004**, *103*, 33–39, doi:10.1182/blood-2003-05-1612.
100. Soeters, P.B.; Wolfe, R.R.; Shenkin, A. Hypoalbuminemia: Pathogenesis and Clinical Significance. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* **2019**, *43*, 181–193, doi:10.1002/JPEN.1451.
101. Andersen, C.J. Lipid Metabolism in Inflammation and Immune Function. *Nutrients* **2022**, *14*, 1414, doi:10.3390/NU14071414.

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/45/2026.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További közlemények

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





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 35

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

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

Debrecen, 2026.02.09.



TÁRGYSZAVAK

angiotenzin-konvertáló enzim	angiotensin-converting enzyme
renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer	renin-angiotensin-aldosterone system
endogén ACE-gátlás	endogenous ACE-inhibition
humán szérumalbumin	human serum albumin
szabad zsírsavak	free fatty acids
zsírsav szerkezet	fatty acid structure
zsírsav-albumin kölcsönhatás	fatty acid-albumin interaction
ACE-fenotipizálás	ACE phenotyping
ACE-konformáció	ACE conformation
poszttranszlációs módosítások	post-translational modifications
ACE-szabályozás	ACE regulation

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt hálás köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, *Dr. Fagyas Miklósnak*, akivel már 8 éve dolgozunk együtt. Szakmai iránymutatása, következetes gondolkodásmódja és szemléletformáló munkája alapvetően meghatározta tudományos fejlődésemet. Vezetésével nemcsak a kutatómunkához szükséges módszertani és elméleti alapokat sajátíthattam el, hanem azt a szemléletet is, amely végigkísérte doktori munkámat, és amely nélkül ez az értekezés nem jöhetett volna létre.

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

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

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

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

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

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

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

FÜGGELÉK

A függelék a doktori értekezés alapjául szolgáló publikált közleményeket tartalmazza.