

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Dr. Daragó Andrea

Témavezető: Dr. Tóth Attila



DEBRECENI EGYETEM

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2015

Az angiotenzin konvertáz enzim (ACE) szerepe kardiovaszkuláris kórképekben

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

Írta: **Dr. Daragó Andrea** okleveles orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

Témavezető: Dr. Tóth Attila, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Soltész Pál, az MTA doktora

Prof. Dr. Andréka Péter, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK

Laboratóriumi Medicina Intézet könyvtára

(In Vitro Diagnosztikai Tömb, 2. emelet)

2015. június 17. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Halmosi Róbert, PhD

Dr. Ujhelyi László, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Soltész Pál, az MTA doktora

Prof. Dr. Andréka Péter, PhD

Dr. Halmosi Róbert, PhD

Dr. Ujhelyi László, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK

Augusztai Épület, nagyelőadó

2015. június 17. 13:00 óra

BEVEZETÉS

A kardiovaszkuláris halálozás világszerte a vezető halálokok közé sorolható, az összes halálozás egyharmadát teszi ki. A fejlett országokban a daganatos megbetegedésekkel összevetve közel azonos incidenciát mutatnak. Első ízben az USA-ban indítottak a szív- és érrendszeri megbetegedések etiológiájának, rizikófaktorainak tisztázása céljából átfogó, prospektív vizsgálatot, követve Framingham városka lakosainak aktuális egészségi állapotát. Ezen vizsgálatnak köszönhető, hogy az ateroszklerózis folyamatában kikristályosodott a vérsírok, a hipertónia, diabétesz jelentősége, a dohányzás egyértelműen káros volta. A kutatók jelenleg a betegségek hátterében álló genetikai eltéréseket kutatják.

A szív és érrendszer patofiziológiája számos változó súlyosságú megbetegedés formájában ölthet testet. Általában a rizikófaktorok megjelenésével kezdődik, majd miokardialis infarktusban, stroke-ban, illetve a végtagi ütőerek elzáródásában végződhet. A nekrotizált területeken kötőszövetes átépülési folyamat, remodelling indul el, mely hosszú távon az adott célszerv elégtelenségéhez, például szívelégtelenség, kialakulásához, majd átlagosan 5-15 éven belül halálhozhoz vezethetnek. A társadalom számára egyre jelentősebbé válik az iszkémiás kardiomiopátiás betegcsoport, mivel a primer koronária intervenció elterjedését követően, az akut szívizominfarktus okozta mortalitás világszerte látványosan visszaesett, viszont a túlélő betegek képezik a szívelégtelen beteg populáció igen nagy hányadát.

Az iszkémiás szívizomzat kezelésére mára már számos lehetőség áll rendelkezésünkre. Alapvető terápiás eszköztárunk a gyógyszeres kezelés, ezen belül az acetilszalicilsav használata, béta-blokkolók, Ca^{2+} -csatorna blokkolók, illetve I_f -csatorna gátlószer alkalmazása, tüneti szerként nitrát terápia folyamatos és *ad hoc*, rohamokra használt alkalmazása. Prevenációs céllal, de bázis terápiaként adjuk az angiotenzin konvertáz enzim (ACE) gátlókat, angiotenzin receptor blokkolókat (ARB), a koleszterin szintézist csökkentő sztatinokat és a koleszterin felszívódását gátló ezetimibet. Szintén főképp tüneti szerként használjuk a mitokondriumokban az aerob anyagcserét „erősítő” trimetazidine-t. A fent említett gyógyszeres terápia, a koronária meszesedés igazolása után invazív terápiás

eljárásokkal (perkután koronária angioplasztika és koronária by-pass műtét) egészíthető ki az iszkémia megoldásának céljából.

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) működése

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

A folyamat első lépéseként a májban szintetizálódó angiotenzinogén (alfa₂-globulin) N-terminális végéről a vese juxtaglomeruláris sejtjeiben termelődő proteáz, a renin Angiotenzin I-et (decapeptid) hasít le. Az Angiotenzin I – Angiotenzin II átalakulást az angiotenzin konvertáz enzim (ACE) katalizálja, mely szintén proteáz. Az ACE az Angiotenzin I (AngI) C-terminálisáról 2 aminosavat hasítva eredményezi az Angiotenzin II (AngII) nevű oktapeptidet. Mivel az ACE más folyamatokban is részt vesz, például inaktíválja a bradykinint, ezért kinináznak is hívják. Az Ang I – Ang II átalakulás más ACE-től eltérő alternatív útvonalon például a kimáz által is végbemehet. Az Ang II a sejtek 1-es típusú Angiotenzin II receptoraihoz (AT₁R) és 2-es típusú Angiotenzin II receptoraihoz (AT₂R) kötődik. Az Ang II a két receptoron ellentétes hatást vált ki, bár az AT₂R-aktiváló hatása elenyésző az AT₁R-hez képest. Az Ang II a kardiovaszkuláris rendszerben mind az artériák, mind a vénák AT₁ receptorain az intracelluláris inozitol út és a G-protein útvonal segítségével vazokonstrikciót vált ki. Az Ang II prothrombotikus hatással is rendelkezik: a vérlemezkék adhéziójára és aggregációjára is hat. Az Ang II számos hatása közül a legfontosabbak az alábbiak: a simaizom sejtek és szívmusculus sejtek hipertrófiáját okozza, fokozza a hipertónia, az ateroszklerózis progresszióját, endotél sérülések esetén a trombocita aktiváció által a thrombotikus kaszkád beindulását. Szintén AT₁R-on hatva fokozza a mellékvesekéreg aldoszteron elválasztását, utóbbi által fokozva a vese Na⁺-visszatartását, és a K⁺-kiválasztást. A vese artériáiban, afferens arteriolában gyenge, az efferens arterioláiban erősebb vazokonstrikciót okoz. A tubulo-glomeruláris feedback érzékenységet növeli, a vesemedulla vérátáramlását csökkenti. A mezangiális sejteket kontrahálja, így a kiválasztó felszínt csökkenti. Vizsgálatok igazolták, hogy AT₁R-on Ang II hatásra fokozódik a sejtek migrációja, növekedése, a szövetek kötőszövetes átépülése, azaz a fibrózis folyamata. AT₂R-on hatása ellentétes: fokozza a NO-termelést,

vazodilatációt vált ki. Az Ang II-t az aminopeptidáz A hasítja angiotenzin III-má, melyet az aminopeptidáz M tovább hasít biológiailag kevésbé hatékony angiotenzin IV-gyé. A RAAS egyik legfiatalabb tagja az angiotenzin konvertáz enzim 2 (ACE 2), mely az Ang I-t és II-t is képes hasítani, ezzel csökkentve a szubsztrátok mennyiségét. A keletkezett angiotenzin 1-7 (Ang 1-7) Mas receptorokon többnyire az Ang II AT1R-on mediált hatásával ellentétes válaszokat generál. Az Ang 1-7 különböző szervekben, így a tüdőben, vesében, májban javítja a gyulladásos és fibrotikus folyamatokat. Az anyagcserére is pozitív hatásai vannak: javítja a glükózfelvételt és a lipolízist, csökkentve az inzulinrezisztenciát és a dyslipidémiát.

A RAAS gyógyszeres befolyásolása

A fent vázolt szövevényes RAAS rendszer jelentősége élettani szempontból hatalmas. A rendszer különböző pontjainak befolyásolása már régóta foglalkoztatja a kutatókat. Ennek eredményeként született meg az ACE gátlók népes családja, majd az angiotenzin receptor blokkolók csoportja, legutóbb pedig a direkt renin inhibitorok, melyek közül az aliskiren a napi orvosi gyakorlatban is bevezetésre került.

Az első ACE gátló a captopril volt, melyet a '70-es évek végén ismertettek. Azóta világszerte legalább 16 ACE-gátló jelent meg a piacon. Kémiaiilag 3 csoportba sorolhatóak: 1., szulfhidril-csoportot, 2., dikarboxilát-csoportot és 3., foszfonát csoportot tartalmazó vegyületek. A kifejlesztett vegyületek nagy része pro-drug. A captopril és a lisinopril viszont aktív hatóanyagok. A különböző ACE gátlók a keringő ACE gátlásának időtartamában valamint a szöveti ACE gátlásának mértékében is eltérhetnek egymástól. Az ekvipotens dózisban alkalmazott ACE gátlók szöveti ACE gátló hatása több tényező függvénye. Ilyen a gátló molekula kötődésének erőssége az ACE C-terminálisához, a gátló molekula disszociációs kinetikája, valamint az ACE gátló szöveti penetranciája, lipofilitása. Bár kiterjedt információ áll rendelkezésünkre a vérkeringésben fellelhető RAAS elemeiről, működéséről, a RAAS moduláció orvosi jelentőségét sokak szerint a kevésbé ismert, már a '80-as években leírt szöveti renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer adja. Azonban míg 20%-os primer végpont csökkentést tudtak kimutatni a perindoprillal és ramiprillal végzett vizsgálatokban, a szekunder prevencióban adott, magasabb szöveti affinitású trandolaprillal és quinaprillal végzett vizsgálatok nem mutattak szignifikáns hatást a túlélésre és a koronária-események bekövetkezésének megelőzésére. Utóbbi esetben az ACE-gátlók szöveti affinitásában tapasztalt eltérései állhatnak a háttérben.

Az ACE gátlók hatékonyságát számos nagy klinikai vizsgálat is bizonyította: csökkentik a kardiovaszkuláris halálozást, a non-fatális miokardiális infarktust vagy a szívleállás előfordulási gyakoriságát stabil koronária betegségben, javítják a miokardiális infarktus prognózisát, gátolják a balkamrai remodelling folyamatát, késleltetik a hipertónia megjelenését és csökkentik balkamrai hipertrófiában a balkamrai tömeg-indexet, mérséklék diabéteszben a nefropátia kialakulásának valószínűségét, valamint a mikroalbuminuria incidenciáját és az újonnan diagnosztizált diabétesz valószínűségét. A legutóbbi terápiás útmutatók már mindezeket evidenciaként fogalmazták meg, és így az ACE gátlók a legnagyobb mortalitású megbetegedések primer és szekunder prevenciójára bázis terápiaként adható gyógyszerekké váltak.

Az ACE genotípus jelentősége

Az ACE gátlók klinikai hatékonysága genetikailag determináltnak tűnik, miután az ACE gátló kezelés az afro-amerikai betegcsoportban kevésbé hatékony a kaukázusi rasszba tartozó betegekkel összevetve. Genetikai vizsgálatok világítottak rá arra, hogy az ACE expressziója az ACE génállományában inszerciós/deléción (I/D) polimorfizmus által szabályozott, mely DD genotípusú egyéneknél kb. 50%-kal magasabb ACE expressziót eredményez, mint az II genotípus esetén. Eszerint a D allél jelenlétében megemelkedett ACE szérumszint felveti a D allél major kardiovaszkuláris rizikófaktor szerepét. A DD genotípusú betegek között a hipertónia gyakorisága 10%-kal nagyobb arányban, de nem szignifikáns mértékben volt kimutatható. A hipertónia kialakulásában a genetikai eltérések mellett a környezeti faktoroknak, az életmódbeli eltéréseknek és az etnikai eltéréseknek egyaránt meghatározó szerepük lehet. A kardiovaszkuláris betegcsoporton belül az iszkémiás stroke független prediktora a D allél jelenléte. A DD allélt hordozó diabéteszes betegek között a nefropátia kialakulásának valószínűsége nagyobb. Sayed-Tabatabaei 2003-ban publikálta 23 cikk, 9833 betegén elvégzett metaanalízisét, mely az *arteria carotis* intima-média vastagság aránya alapján vizsgálta az ateroszklerózis mértékét. Ebben a közleményben a DD genotípusú betegeknél szignifikánsan magasabb volt az ateroszklerózis mértéke. Az eredmények még szembetűnőbbek voltak cerebrovaszkuláris megbetegedés, diabétesz vagy hipertónia egyidejű fennállása esetén.

Endogén ACE szabályozás

Az endogén ACE gátlás lehetősége már az 1970-es évek végén megfogalmazódott. 1979-ben egymástól párhuzamosan két munkacsoport is közölte eredményeit. Ryan és munkatársai humán, tengerimalac és oposszum szérumból, valamint vizeletből mutattak ki egy kb. 10 kDa molekulaméretű ACE gátlásra képes anyagot. Klauser és munkacsoportja egy forgalomban lévő plazma készítményből a humán albumint és a tartósítószerként alkalmazott acetil-triptofánt azonosította endogén ACE gátlóként. Azt is igazolták, hogy az albumin C-terminális része önmagában jelentősebb endogén gátló hatással bír, mint a teljes fehérje. A'80-as években négy munkacsoport publikálta eredményeit az endogén ACE gátlás témakörében. Közülük Liebermann és munkatársainak eredménye emelhető ki, akik egy 50 kD tömeget meghaladó, reverzibilisen gátló molekulát izoláltak szarkoidózisos betegek szérumból, mely megnehezítette az ACE szérumszintjének mérését. A szérum kifejezett hígítása (8x) után a mérés kivitelezhetővé vált. A '90-es évek végén Thevananther és társai humán szérumból egy 14 kD molekulatömegű, ACE gátló hatással bíró fehérjét különítették el affinitás kromatográfia és poliakrilamid gélelektroforézis segítségével.

Az elmúlt időszakban megerősítette munkacsoportunk a humán szérum albumin (HSA) endogén ACE gátló tulajdonságait. A HSA $5,7 \pm 0,7$ mg/ml IC_{50} értékkel gátolta a szérum ACE aktivitást, míg az élettani humán szérum albumin koncentrációja 35-52 mg/ml sávban volt. Ezek az adatok azt jelzik, hogy a humán szérum albumin szignifikánsan képes gátolnii az angiotenzin konvertáz enzimet *in vivo*. Azt találtuk, hogy függetlenül az ACE expresszió szintjétől a humán szérum albumin nagyon alacsony szinten stabilizálja az angiotenzin konvertáz enzim (ACE) aktivitását.

A koronária bypass műtét jelentősége

A leggyakrabban elvégzett kardiovaszkuláris sebészeti eljárás a koronária bypass műtét (CABG), mely során új csatornákat létesítenek a beszűkült, illetve elzáródott erek mellett, hogy javuljon a nem megfelelő perfúziójú szövetek oxigén- és tápanyagellátása. Már az 1960-as évek óta használ a szívsebész társadalom *vena saphena* graftokat a koronária artériák áthidalása céljából. Jelentős elterjedésüket rugalmasságuk, könnyű hozzáférhetőségük, alacsony disszekciós rátájuk magyarázza. Sajnos a gyakorlatban hamar kiderült, hogy a vénás graftok élettartama nem túl hosszú, különböző degeneratív

folyamatok már a felhelyezést követő első évben úgynevezett korai degenerációt okozhatnak. Az első évben a saphena graftok 15-30%-a, 10 éven belül 70%-a záródik el. Ennek okai között találhatjuk a graftok ateroszklerotikus degenerációját, mely a natív erekben tapasztalt folyamatoktól időbeni lefolyásában, valamint az egyes etiológiai faktorokban eltérhet egymástól. A szakirodalom megkülönböztet korai, azaz a műtét után 1 évig tartó időszakot, valamint 1 év után tapasztalt, úgynevezett késői graft degenerációs periódust. A legfőbb károsodást előidéző tényezőnek a vénás endothelium elégtelen adaptálódását tartják az artériás rendszer magasabb vérnyomásához, mely egy fajta mechanikus stresszként hat a vénás rendszerre. A korai graft degeneráció mögött elsősorban technikai okok állnak, ilyen a vénás endotélium perioperatív sérülése (pl. felfújás okozta feszítő erők miatt), kanyargós vena graft lefutás (elősegíti a trombociták kitapadását, összezapzódását), a vénás graftok kiáramlási pályája és az artériák befogadó felülete közötti téraránytalanság (nehezített egyesítés, fokozódó lokális turbulencia nyíró hatása). Mindezek hatására az első hónapban a thrombotikus folyamatok, majd a 2-12. hónapban az intima hiperplázia játsszák a főszerepet. A posztoperatív első év után az ateroszklerózis folyamata válik a legfőbb károsító folyamattá.

Habár egyre magasabb rizikójú betegek esnek át CABG műtéten, a perioperatív mortalitási ráta csökken. Azonban azt is leírták, hogy az elmúlt 20 évben a bypass műtét után a betegek hosszú távú túlélése érdemben nem javult. Számos vizsgálat célozta meg az optimális gyógyszeres kezelés feltárását szekunder prevenciók céljával bypass műtött betegek esetén az ateroszklerózis progressziójának lassítása céljából. A posztoperatív szak kezelésére alapvonalbeli gyógyszernek minősül az acetilszalicilsav, béta-blokkolók, sztatinok és az ACE gátló vagy angiotenzin receptor blokkolók (ARB) csoportja.

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

fokozott graft degenerációt. Összevetve az *arteria mammaria interna* graftot és *vena saphena* graftot kapott betegek rövid távú eseménymentes túlélési időszakát, felmerül az igény a saphena graftok posztoperatív egyedi kezelésére a graft-túlélés javítása érdekében.

CÉLKITŰZÉSEK

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

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Etikai engedély

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

A vérminták gyűjtése, szérum és DNS izolációja

A vérmintáinkat kétféleképp gyűjtöttük. 151, a DE OEC Kardiológiai Klinika ambulanciáján gondozott önként jelentkezőtől szokványos aseptikus technika segítségével perifériás vénás vérmintát vettünk (betegenként 1x10 ml natív és 1x5 ml alvadásgátolt vér levétele történt). További vérmintákat (n=76) kaptunk a DE OEC Szívsebészeti Klinikáján by-pass műtétre kerülő betegektől (1x10 ml natív és 1x5 ml alvadásgátolt vérminta). A natív vérmintákból a szérum és sejtes frakciókat centrifugálva szétválasztottuk, majd -20 °C-on tároltuk. Genomi DNS-t antikoagulált vénás vérből preparáltunk, melyhez DNS szeparációs kit-et (Qiagen) használtunk.

Az ACE aktivitás mérése

Az ACE aktivitást Beneteau (Beneteau et al. 1986), valamint Murray és munkatársai (Murray et al. 2004) által leírt metodikák szerint mértük. Röviden, az ACE aktivitást mesterséges szubsztrát segítségével határoztuk meg 8,2-es pH-n az alábbi reagensben: 25 mM HEPES, 0,5 mM FAPGG, 300 mM NaCl és a szérum kívánt hígítása. A vizsgálatokat 96 lyukú plate-en (Greiner-Bio One) 37 °C-on végeztük. Az optikai denzitás (340 nm) változást 5 perces intervallumokban legalább 90 percig vizsgáltuk (NovoStar plate reader, BMG Labtech). Az optikai denzitási értékeket a reakciós idő függvényében ábrázoltuk, és lineáris regressziós egyenest illesztettünk rá. Az illesztést és az eredményt $r^2 > 0,90$ esetén fogadtuk el. Az ACE aktivitást az alábbi egyenlet segítségével számítottuk:

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

ahol S az optikai denzitás csökkenésének mértéke (1/perc), k az optikai denzitás változása a FAPGG 1 nmol-jának teljes hasításáig, D a szérum hígítása. Az ACE aktivitást egységben

(U) adtuk meg, ahol 1 U megfelel percenként 1 nmol FAPGG hasításának. A captopril (ACE gátló) humán szérum ACE-ra gyakorolt gátló hatását 0,1 nM-1,0 mM-os koncentrációs sávban vizsgáltuk.

A szérum ACE koncentrációjának mérése

A szérum ACE koncentrációt a kereskedelmi forgalomban kapható humán ACE ELISA kit-tel (R&D Systems) mértük. A plate-ek 80 ng/lyuk ACE elleni antitesttel voltak bevonva, a maradék kötőhelyek inert fehérjével voltak blokkolva Dulbecco's foszfát-puffer sóoldatában. Hígított reagenssel 100-szorosra hígított szérumot adtunk a felszínhez, majd biotinált detekciós antitesttel jelölt antigén-antitest komplexeket juttattunk a kádakba. Végül a komplexek mennyiségét 0,3 mg/ml tetrametil-benzidint, 0,1 μ M H_2O_2 -t és 50 mM ecetsavat tartalmazó szubsztrát oldattal detektáltuk. A reakciót 20 perc után 0,5 M sósav hozzáadásával állítottuk le. Az optikai denzitást 450 nm-en mértük. A szérum ACE expresszió eredményét ng ACE/ml szérum mennyiségben tüntettük fel.

Az ACE aktivitás számítása hígítatlan humán szérumban

Hígítatlan szérumban az ACE aktivitást az alábbi képlet alapján számítottuk:

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

K_i a HSA gátlási állandója (83 μ M). [Aktív ACE] - az ACE aktív formáinak koncentrációja. [Inaktív ACE] – az ACE gátolt formáinak koncentrációja. [HSA] – humán szérum albumin koncentráció kolorimetriás módszerrel meghatározva.

Számításaink során az alábbiakat vettük figyelembe:

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

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

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

Bypass műtét kapcsán humán szövetminták gyűjtése

Humán vaszkuláris szövetekben az angiotenzin konverzió vizsgálatára prospektív vizsgálatot végeztünk. Koronária bypass műtéten átesett betegektől nyertünk vérmintákat, valamint disztális *vena saphena* és *arteria mammaria* segmentumokat. A vizsgálatba 76 beteget vontunk be. A sebészeti csoportot 4 szívsebész szakorvos alkotta, akik azonos technikával nyerték a mintaként szolgáló ér-graftokat. A felesleges, műtétekből visszamaradó graft szöveteket jéghideg fiziológiás sóoldatba (KREBS oldat) helyezték a szívűtőben, onnan szállítottuk laboratóriumunkba. A szövetmintákat funkcionális mérésekre (izometriás kontraktilis erő mérése), és az ACE szöveti expressziójának meghatározására használtuk fel. 4 mm vastag körkörös, gyűrűszerű preparátumokra szeltük az érmintákat, és jéghideg, oxigenizált fiziológiás sóoldatba (KREBS) helyeztük további funkcionális vizsgálatok céljából, valamint szárítottuk és fagyasztottuk biokémiai meghatározásokra. A vérmintákat az ACE-genotípus és a szérum ACE meghatározása céljából gyűjtöttük.

Bypass graftok vazokonstriójának mérése

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

Bypass műtött betegek szöveti ACE expressziójának mérése

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

Az ACE I/D polimorfizmusának meghatározása

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

Statisztikai analízis

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

EREDMÉNYEK

A humán szérum albumin vizsgálatához nyert vérminták ACE genotípusai a morfometriás, laborparaméterek és az alkalmazott gyógyszerek függvényében

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

A szérum ACE koncentrációja és aktivitása közötti összefüggés

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

Az ACE genotípus meghatározó szerepe a szérum ACE koncentrációra és aktivitásra

Azon betegek esetén, akik homozigóták voltak az ACE gén D (deléció) alléljére, a szérumukban magasabb ACE koncentrációt tudtunk kimutatni, mint akik homozigóták voltak az I (inszerció) allélre (Inszerció, II= $47-194$ ng/ml, átlag: $94,5$ ng/ml, $n=28$, ID= $36-202$ ng/ml, átlag: $112,9$ ng/ml, $n=70$, DD= $74-288$ ng/ml, átlag: $154,9$ ng/ml, $n=53$). Az ACE

aktivitás szintén emelkedett DD homozigóta betegek esetében (II=15,6-55,4 U/ml, átlag: 32,74 U/ml, n=28, ID=15,2-59,3 U/ml, átlag: 35,94 U/ml, n=70, DD=27,3-59,8 U/ml, átlag: 42,95 U/ml, n=53). Összességében a DD genotípusú betegek esetén az ACE szérumszintjének 64%-os emelkedése csupán 31%-os ACE aktivitás emelkedéssel jár az II genotípusú betegekkel összevetve.

A szérumszint albumin koncentrációjának szerepe a szérumszint ACE aktivitás szabályozásában

Ezek az adatok azt sugallják, hogy az ACE aktivitás a humán szérumszint ACE koncentrációjával mellett további faktorok által is szabályozott. Korábbi eredményeink alapján azt gyanítottuk, hogy a humán szérumszint albumin egyfajta endogén ACE gátló, melynek koncentrációfüggő hatása van a szérumszint ACE aktivitásra. Megpróbáltunk összefüggést találni a szérumszint albumin koncentráció és a szérumszint ACE aktivitás között a humán szérumban *in vitro* kísérletes körülmények között. A specifikus ACE aktivitás magasabb volt, ha a szérumszint hígítása miatt a szérumszint albumin koncentráció csökkent. Az ACE aktivitás 56,13±1,17 U/ml-ről 38,55±0,78 U/ml-re csökkent, ha a HSA koncentráció 2,42±0,02 mg/ml-ről 12,12±0,12 mg/ml-re emelkedett. A humán szérumszint ACE-HSA összefüggésében a stabilitási állandó (K_i) 5,7±0,7 mg/ml volt, mely azt sugalmazta, hogy az ACE aktivitás 8,47±0,18 U/ml (kalkulált értékek) 48,46±0,46 mg/ml HSA jelenlétében.

A morfolometriás paraméterek és a szérumszint ACE koncentráció közötti összefüggések vizsgálata

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

A szérumszint lipid szintek és a szérumszint ACE koncentrációja közötti összefüggés vizsgálata

A totális koleszterin és triglicerid szinteket vizsgáltuk, ábrázoltuk a szérumszint ACE koncentráció függvényében (n=151 beteg). A pontokra lineáris regressziós egyenest

illesztettünk, hogy a lehetséges korrelációt az ábrázolt paraméterek között megkapjuk. A totál koleszterin normál értéke 5,2 mmol/l, a triglicerid esetében 1,7 mmol/l alatt volt. A szérum ACE koncentráció nem mutatott összefüggést az összkoleszterin és triglicerid szintekkel sem.

A szérum ACE koncentráció és a kardiovaszkuláris paraméterek közötti kapcsolat vizsgálata

A szérum ACE koncentráció függvényében ábrázoltuk a kardiovaszkuláris (ejekciós frakció, szívfrekvencia, szisztolés és diasztolés vérnyomás) paramétereket (n=151). Az ejekciós frakció 50% felett, a szívfrekvencia 60-100/min között, a szisztolés és diasztolés vérnyomás 90-140, illetve 60-90 Hgmm-es tartományban normális. A kardiovaszkuláris paraméterek (ejekciós frakció, szívfrekvencia, szisztolés és diasztolés vérnyomás) is függetlenek voltak a szérum ACE koncentrációjától pontatlan illeszkedés miatt (alacsony r^2 értékek alapján).

A szérum ACE koncentráció és a vesefunkciós paraméterek között összefüggés

A vesefunkciót az urea, kreatinin és húgysav szérumban mért átlag koncentrációjával és a glomeruláris filtrációs rátával (GFR) mértük. Az értékeket a szérum ACE koncentráció függvényében adtuk meg (n=151). Normál értékek: urea 3,6-7,2 mmol/l, kreatinin 44-97 $\mu\text{mol/l}$ (nő) és 62-106 $\mu\text{mol/l}$ (férfi), GFR 90 ml/min/1,73m² alatt, húgysav 140-340 $\mu\text{mol/l}$ (nő) és 220-420 $\mu\text{mol/l}$ (férfi). A vesefunkciós paraméterek (szérum urea, kreatinin és a glomeruláris filtrációs ráta) is jelentős szórást mutattak (alacsony r^2 értékek), ezzel cáfolva korrelációt a szérum ACE koncentrációval.

A betegek paraméterei és az ACE I/D genotípus közötti összefüggése

Különböző paramétereket (életkor, testtömeg, testtömeg index, totál koleszterin, triglicerid, ejekciós frakció, szívfrekvencia, szisztolés és diasztolés vérnyomás, urea, kreatinin, glomeruláris filtrációs ráta és húgysav) hasonlítottunk össze a betegek genotípusával (inszerciós: II, n=28, deléciós: DD, n=53 és heterozygota: ID, n=70). Hasonlóan nem találtunk összefüggést a klinikai paraméterek és az ACE genotípus között, illetve az individuális ACE expressziós szintek között.

Vena saphena és arteria radialis érminták megoszlásának vizsgálata a morfometriás, laborparaméterek és az alkalmazott gyógyszerek függvényében

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

Az angiotenzin I-re és angiotenzin II-re adott kontrakciós válaszok

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

A szöveti Ang I » Ang II konverzió vizsgálata céljából megmértük az Ang I-re adott válaszokat. Az Ang I félmaximális hatása $\text{EC}_{50}=31 \pm 6 \text{ nM}$, ($n=26$) volt *radialis* artérián, és $30 \pm 4 \text{ nM}$ *vena saphena*-n ($n=40$). Tekintettel arra, hogy az Ang I szöveti hatása Ang II-vé történő konverziója után jön létre, ezen kísérleti eredmények jelentős szöveti Ang I » Ang

II átalakulásra utalnak a vizsgált erekben. Számítottuk az Ang II és Ang I hatás (EC_{50}) arányát is, hogy mennyiségileg kifejezhessek az Ang I » Ang II konverzió mértékét. Ez az arány szignifikánsan alacsonyabb volt ($p=0,02$) az *arteria radialis* mintákban ($0,17\pm0,03$, $n=23$), mint *vena saphenákon* ($0,51\pm0,14$, $n=24$). Ezek az eredmények háromszor hatékonyabb Ang I konverziót mutatnak saphena vénákban, mint radiális arteriákon.

Az angiotenzin kiváltotta vazokonstrikció mechanizmusai

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

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

Részletesen vizsgáltuk a captopril mind a keringő, mind a szöveti ACE-ra kifejtett gátló hatását. Először az ACE gátló kezelés keringő ACE-ra kifejtett gátló hatását erősítettük meg. Az ACE gátló kezelésben részesülő betegeknél szignifikánsan alacsonyabb ($p<0,01$) szérumszintű ACE aktivitást tudtunk mérni ($7,0\pm1,0\text{ U/l}$, $n=15$) összevetve az ACE gátló kezelésben nem részesülő betegek szérumszintű ACE aktivitásával ($22,0\pm2,0\text{ U/l}$, $n=15$). Következőekben humán szöveti ACE-n teszteltük in vitro a captopril hatását. Eredményeink alapján a humán szérumszintű ACE-t a captopril 15 nM -nál (IC_{50}) teljesen gátolta. A captopril szöveti angiotenzin I-re gyakorolt konverziós hatását is vizsgáltuk, hogy megbecsüljük ezen gyógyszer szöveti ACE-ra gyakorolt gátló potenciálját. A captopril $1\text{ }\mu\text{M}$ -os koncentrációiban hatástalan volt, míg a $10\text{ }\mu\text{M}$ -os és $100\text{ }\mu\text{M}$ -os koncentrációnak non-kompetitív gátló hatását sikerült kimutatnunk.

A vérkeringésben (szérum) és a szövetekben (*vena saphena*) fellelhető angiotenzin konvertáz enzim expressziója

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

A szöveti és a keringő ACE expressziója az ACE genotípus függvényében

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

DISZKUSSZIÓ

Az 5. leggyakrabban felírt gyógyszercsoport az angiotenzin konvertáz enzim (ACE) gátlók csoportja, melyek a kardiovaszkuláris (hipertónia, szívelégtelenség) terápia alapját képezik. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai arra mutattak rá, hogy a szérumban egy endogén ACE gátló, mely koncentráció-függő mértékben képes gátolni az ACE-t (K_i érték $5,7 \pm 0,7$ mg/ml humán szérumban ACE-n), hasonlóan a felírt ACE gátló gyógyszerekhez.

Az ACE inszerciós-deléciós (I/D) polimorfizmusát már több mint 20 éve azonosították, és ezen polimorfizmust a keringő ACE expressziós szintek közötti 20-50%-os interperszonális variabilitás alapjának tekintették. Ennek megfelelően a humán szérumban ACE expresszió széles tartományban mozog (47-288 ng/ml), és a DD genotípusú betegeknél saját vizsgálatunkban is 64%-kal magasabb ACE expressziót találtunk, mint az II genotípusúaknál. A kardiovaszkuláris paraméterek és az ACE expresszió (genotípus) közötti nyilvánvaló korreláció hiánya érdekes, különösen annak fényében, hogy az ACE gátlók kardiovaszkuláris hatékonyságát számos nagyszámú klinikai vizsgálat és elfogadott guideline is alátámasztja. Korábbi adatokra való tekintettel feltételeztük, hogy az ACE expresszióban észlelt különbség, mely az ACE I/D polimorfizmusából adódik, szerepet játszhat a miokardiális infarktus, a koronária megbetegedések, a koronária artériák meszesedése, a szívelégtelenség és a hipertenzió előfordulásában. Mi ilyen összefüggést nem tudtunk kimutatni, mely megegyezett egy több mint 30000 beteget vizsgáló meta-analízis eredményeivel.

Jelen vizsgálatunkban közvetlenül teszteltük hipertóniás betegek szérumban az ACE expresszió és ACE aktivitás közötti összefüggést. Azt találtuk, hogy ugyan a DD genotípusú hipertóniás betegek szérumban az ACE koncentrációja 64%-kal magasabb volt, mint az II genotípusú betegek esetén, azonban az ACE aktivitásban csak 31%-os különbséget tapasztaltunk. Ez azt sugallja, hogy a magasabb ACE expresszió élettani körülmények között puffert. Észrevételeink összecsengenek azzal a megfigyeléssel, hogy a helyi angiotenzin I » angiotenzin II átalakulás és az angiotenzin II/I arány független az I/D genotípustól humán mintákban.

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

Jelen vizsgálatunk legnagyobb újdonsága az, hogy klinikai körülmények között mutat rá a szérum albumin ACE gátló hatására. A betegek szérumában 4,1-szeresére emelkedett ACE koncentráció mellett 2,1-szeresre emelkedett ACE aktivitás azt sugallja, hogy a szérum ACE aktivitás szabályozott. Az enzim koncentrációján kívül is hozzájárulnak faktorok az ACE aktivitáshoz. Ezen túl egy ilyen faktor elnyomhatja az ACE aktivitását különböző ACE expressziós szinteken, feltételezve egy endogén ACE aktivitást stabilizáló mechanizmus meglétét. Ez a szuppressziós hatás klinikailag szignifikáns lehet akkor is, ha a keringő ACE szint genetikai faktorok (pl. az ACE I/D polimorfizmusa) vagy megbetegedés következtében megemelkedik. Az ACE gén *saar* régiójában létrejövő pontmutáció például 5-szörösére emeli a keringő ACE koncentrációját. Az ACE gén számos egyéb mutációjához társul az ACE koncentráció enyhe emelkedése a kardiovaszkuláris megbetegedések incidenciájának erősödése nélkül. Mindezen megfigyelések azt sugallják, hogy az ACE koncentrációban kialakuló jelentős különbségek *in vivo* jól tolerálhatóak. Ez a tolerabilitás azzal magyarázható, hogy az ACE aktivitást endogén faktorok alacsonyabb szinten stabilizálják. A munkacsoport korábbi eredményei a HSA-t azonosították, mint egy ilyen endogén ACE inhibitort. Jelen tanulmányunkban pedig azt vizsgáltuk, hogy a humán szérum mintákban a szérum albumin milyen mértékben felelős az ACE endogén gátlásáért. Az ACE aktivitás mértéke meghatározható adott mennyiségű HSA jelenlétében (például 56 ± 14 U/ml $2,4 \pm 0,3$ mg/ml HSA mellett), de csökken, ha a HSA koncentrációját növeljük, összhangban a HSA ACE gátló képességével.

Sajnos hígítatlan szérumban az ACE aktivitás direkt meghatározása nem volt kivitelezhető. Az ACE aktivitását 4-szeres hígítás után mértük, mert a szérum 340 nm-en jelentős fény abszorpcióval rendelkezik, amely lehetetlenné teszi az alkalmazott szubsztrát

átalakulásának mérését. Mindazonáltal az ACE aktivitást hígítatlan szérumban becsültük meg a szérum albumin és az ACE koncentráció mérésével, illetve 20-szoros hígításnál mért ACE aktivitás és a korábban humán szérumban meghatározott HSA gátló konstans ($K_i = 5,7 \pm 0,7$ mg/ml) felhasználásával. Ezeket a méréseket és számításokat figyelembe véve - eredményeink alapján - a hígítatlan humán szérum ACE aktivitása $8,5 \pm 2,2$ U/ml körül lehet.

A humán szérum mintákban általunk is mért ACE (127 ng/ml) és szérum albumin (48 mg/ml) koncentrációk felvetik, hogy az ACE koncentráció eltérései mögött a HSA pufferoló hatása áll. A szérum albumin 10-szer magasabb koncentrációban van jelen, mint a HSA ACE gátló K_i mennyisége. Ezek a mért értékek felvetették annak lehetőségét, hogy az ACE jelentős mértékben HSA-hoz kötött, gátolt formában van a vérkeringésben. A szérum ACE aktivitás megfigyelt szuppressziója gyakorlatilag jelentős következtetések alapjául szolgálhat. Nagy fokú in vivo endogén ACE gátlás esetén ugyanis a fiziológiás angiotenzin II koncentrációt az angiotenzin II eliminációja jelentősen befolyásolhatja. Ebben az esetben a RAAS aktivációját, mely a kardiovaszkuláris megbetegedések (mint pl. hipertónia, szívelégtelenség) alapját képezi, az angiotenzin II csökkenő eliminációja is okozhatja. Az ACE2 az egyik legjobban karakterizált enzim, mely az angiotenzin II eliminációjában is szerepet játszik, ismereteink szerint aktivációja védelmet nyújt a hipertónia, miokardiális fibrózis, remodelling és vesekárosodással szemben. Ezzel összhangban kutatócsoportunk is igazolta az ACE2 szerepét a hipertónia és a szív szisztolés funkciója között.

A másik következtetés szerint a szérum albumin koncentráció hathat a RAAS funkciójára az ACE aktivitás modulációján keresztül. Eredményeink azt vetik fel, hogy az ACE jól szupprimált, amíg a szérum albumin koncentráció legalább 30 mg/ml. Mindazonáltal a humán szérum albumin koncentráció a fenti szint alá csökkenhet pl. fehérje malnutríció és veseelégtelenség esetén is. Eredményeink alapján felmerül, hogy humán szérum albumin infúzió adásával az ACE gátlás fokozódhat, melyet az a megfigyelés is alátámaszt, miszerint posztoperatív használt humán szérum albumin infúzió gyakorta okozott hipotenziót ACE gátló terápiában részesülő betegeknél.

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

A bypass műtött betegek hosszú távú túlélését jelentősen meghatározza a felvarrt ér konduktivitása, amely viszont az érszövet típusától is függ. Az artériás graftok élethossza kedvezőbb a *vena saphena* graftokénál. A *vena saphena* graftok rövid túlélése miatt felmerül az igény egy graft-specifikus kezelésre, mellyel a CABG-n átesett betegek eseménytelen posztoperatív időszakát megnyújthatnánk. Ahhoz, hogy kialakítsunk egy graft-specifikus kezelést, meg kell értenünk a *saphena* graftok *arteria radialis*-szal szembeni fokozott vulnerabilitását befolyásoló tényezőket. A bypass műtét utáni első hónap során a *saphena* graft korai degenerációját thrombotikus oklúziós folyamatok okozzák. Később pedig a neointimális hiperplázian alapuló ateroszklerotikus, obstrukciós folyamatok dominálnak. Az angiotenzin konvertáz enzim (ACE) mindezen folyamatokban szerepet játszhat, mivel az ACE gátlás csökkenti a trombocita aggregációt, javítja az endothel funkciót, és mérsékli a neointima képződést. Számos korábbi vizsgálat is jelentős javulást mutatott az ACE gátló kezelés hatására (QUO VADIS, APRES, HOPE vizsgálat). Az IMAGINE vizsgálat viszont megkérdőjelezte az ACE gátló hasznosságát bypass műtött betegek terápiájában. Mindezen ellentmondásos eredmények tovább sarkalltak minket vizsgálataink pontos megtervezésére, kivitelezésére.

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

További erőfeszítéseket tettünk a vérkeringésben fellelhető és a szövetekben kötött angiotenzin konvertáz enzim összehasonlítására. Feltételeztük, hogy a keringő ACE aktivitás meghatározása segíthet az egyedi rizikó felmérésében és a személyre szabott kezelés felállításában. Érdekes módon nem találtunk összefüggést a keringő és a szöveti lokalizációjú ACE expressziója között. Ennek a feltűnő megfigyelésnek az lehet a

magyarázata, hogy míg a keringő ACE expressziója genetikai polimorfizmus által determinált, addig a szöveti ACE expresszió esetében ilyen háttérrel nem sikerült kimutatni. Ez a megfigyelés is magyarázhatja azt, hogy a szérumban ACE szinteknek (ACE polimorfizmusnak) a különböző kardiovaszkuláris betegségekben nincs szignifikáns jelentőségük, míg ugyanazon betegcsoportban az ACE gátlók jelentős terápiás eszköztárként szolgálnak. Ezen túl szembeötlő különbséget találtunk a keringő (szérumban) és a szöveti (*vena saphena*) ACE mennyisége között captoprillal történő gátlás után. A szérumban ACE-t a captopril már 15 nM-nál, míg a szöveti ACE-t csak az 1000-szer nagyobb dózisban, 10 μ M-os mennyiségnél tudta gátolni.

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

Legvégül vizsgálatunk korlátairól is szót kell ejtenünk. A legfőbb limitáló tényezőt a kísérleti eredmények klinikai környezetbe történő átültetése jelentheti. Míg a captopril hatékonyan gátolja a keringő ACE aktivitást a fizioológiának megfelelő tartományon belül, a szöveti ACE gátlásra kevésbé volt hatékony. Ezen megállapításaink azt sugallják, az ACE gátlók közül némelyiknek nincs hatása a *vena saphena* graft szöveti ACE aktivitásának gátlására. Így elfedi, elhomályosítja a *vena saphena* graftok degenerációjának megelőzése céljából végzett klinikai vizsgálatok eredményeit. Ezen túl a graftok átjárhatóságára jótékonyan hathat a magasabb ACE aktivitás: a fokozott angiotenzin II mediálta értónus miatt emelkedik a véredényen történő vérátáramlás sebessége, csökken a lokális sztázis. A másik oldalon azonban az emelkedett angiotenzin II szint aktiválhatja a lokális neurohormonális mechanizmusokat, tovább bonyolítva a képet. Végül, de nem utolsósorban a koronária keringésbe implantálása után a *saphena* vénák átjárhatósága, illetve véráramlási sajátossága jelentősen megváltozik. Valószínűleg specifikusabban megvilágítaná az ACE gátló hatására változó, javuló *vena saphena* graftok átjárhatóságának kérdését, ha tovább tudnánk tesztelni kétféle ACE gátló összehasonlító vizsgálatával, melyek közül az egyik szelektívebben hat a *saphena* vénában fellelhető ACE-re. Ezen felállásban a szisztémás ACE gátlás jótékony hatásai okozta komplikációk (pl.

volumen háztartásra, vese anyagcserére kifejtett hatás következményei) elkerülhetőekké válnak.

ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

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

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

Köszönetnyilvánítás

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



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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





További Közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16,009

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

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

Debrecen, 2015.03.13.