

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Angiotenzin-konvertáló enzim:
endogén gátlás mechanizmusa
és a gyógyszeres terápia hatékonysága

dr. Fagyas Miklós

Témavezető: dr. Tóth Attila



Debreceni Egyetem

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2014

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	1
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
BEVEZETÉS	4
ELMÉLETI ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer	5
Az angiotenzin-konvertáló enzim	6
ACE-gátló gyógyszerek	8
Természetes ACE-gátló vegyületek	10
Endogén ACE-gátlás	11
CÉLKITŰZÉS	13
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	14
Vérminták gyűjtése, szérumminta készítése	14
Szérum ACE-aktivitás meghatározása spektrofotometriás módszerrel	14
Domén-specifikus ACE-aktivitás meghatározása	15
ACE-mediált angiotenzin I-hasítás közvetlen mérése	15
A szérum ACE mennyiségének meghatározása	16
A humán szérum fehérjéinek elválasztása	17
A humán szérumalbumin koncentrációjának meghatározása	17
A tisztított humán szérumalbumin tulajdonságai	18
Humán vena saphena szegmensek izometrikus kontraktilis erejének mérése	19
A humán rekombináns ACE termelése és tisztítása	20
Az ACE molekuláris interakcióinak vizsgálata	20
ACE-általi bradikinin hasítás közvetlen mérése	22
Etikai engedély	23
Statisztikai analízis	23
EREDMÉNYEK	24
Az endogén ACE-gátló jelenlétének kimutatása	24
Az ACE-aktivitás mérés validálása	25
Az endogén ACE-gátlás jellemzése	28
Az endogén ACE-gátló azonosítása és hatásai a szérum ACE-ra	33
A HSA angiotenzin-mediált vaszkuláris válaszokra gyakorolt hatása	37

A szérum hígítása, mint az ACE-gátló terápia megítélésére alkalmas technika	40
MEGBESZÉLÉS	42
ÖSSZEFOGLALÁS	50
SUMMARY	51
IRODALOMJEGYZÉK.....	52
Hivatkozott közlemények jegyzéke.....	52
Saját közlemények jegyzéke	59
TÁRGYSZAVAK.....	61
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	62

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACE	angiotenzin-konvertáló enzim (angiotensin-converting enzyme)
ACE2	angiotenzin-konvertáló enzim 2 (angiotensin-converting enzyme 2)
ACE-gátló	angiotenzin-konvertáló enzim gátló (angiotensin-converting enzyme-inhibitor)
ACN	acetonitril
AMPA	aminopeptidáz A
AMPM	aminopeptidáz M
Ang	angiotenzin
AT-receptor	angiotenzin II-receptor
bp	bázispár
CD	differenciálódási antigén (cluster of differentiation)
ECE	endotelin-konvertáló enzim (endothelin-converting enzyme)
EDTA	ethylén-diamin-tetraecetsav (ethylene-diamine-tetraacetic acid)
ELISA	enzim-kötött immunoszorbens vizsgálat (enzyme linked immunosorbent assay)
FAPGG	N-[3-(2-furil)akriloil]-L-fenilalanil-glicil-glicin
GnRH	gonadotropin-serkentő hormon (gonadotropin-releasing hormone)
HEPES	N-2-hidroxietyl-piperazin-N-2-etánszulfonsav
HSA	humán szérumalbumin (human serum albumin)
K _D	disszociációs állandó
mp	másodperc
mtsi	munkatársai
NEP	neprilizin, neutrális endopeptidáz
NS	nem szignifikáns (not significant)
PBS	foszfát-puffer (phosphate buffered saline)
RAAS	renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (renin-angiotensin-aldosterone system)
RIPA	radioimmunoprecipitációs assay puffer (radioimmunoprecipitation assay buffer)
SDS	nátrium-dodecil-szulfát (sodium-dodecyl-sulfate)
SEM	átlag közepes hibája (standard error mean)
SF9	Spodoptera frugiperda 9 sejt
TFA	trifluoro-acetát

BEVEZETÉS

A kardiovaszkuláris megbetegedések vezető halálokok a fejlett- és a fejlődő országokban egyaránt, az összhalálozás mintegy 30%-áért ez a betegcsoport a felelős¹. A World Health Organization adatai szerint 2008-ban 17,3 millió ember halt meg valamilyen kardiovaszkuláris megbetegedésben, és ez a szám 2030-ra elérheti az évi 23,3 millió főt.

Sajnos a magyarországi adatok sem kecsegtetnek derűlátással. A „European Health for All” adatbázisa szerint csak az iszkémiás szívbetegség korra-standardizált halálozási aránya az összhalálozáson belül is 23,7% volt 2011-ben². Bár ez a szám mutatott némi javulást az elmúlt években, mégis messze meghaladja a 13%-os Európai Unió átlagot.

A kardiovaszkuláris megbetegedések többségében - ideértve a hipertóniát, a szisztolés szívelégtelenséget, a heveny koronária szindrómát, valamint a perifériás verőérbetegséget -, a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszerre (RAAS) ható gyógyszereket sikeresen alkalmazzák. Ez azt sugallja, hogy a RAAS-nak fontos szerepe van a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában, progressziójában. A RAAS-ra ható gyógyszerek közül a leggyakrabban alkalmazott gyógyszerek egyike az angiotenzin-konvertáló enzim gátlószerei (ACE-gátlók). A preventív jelleggel adott ACE-gátlók akár 20%-kal is csökkenthetik a kardiovaszkuláris halálozás mértékét³ stabil koronária szindrómás betegeknél, mely tovább csökkenthető, ha az ACE-gátlókat vérnyomáscsökkentőként is alkalmazzuk. Ebben az esetben egy átlag 10/5 Hgmm-es vérnyomáscsökkenés 40%-kal csökkenti a stroke, és 30%-kal csökkenti az iszkémiás szívbetegség okozta halálozás kockázatát⁴. Ezek a tények a RAAS elemein belül az ACE kiemelt szerepére hívják fel a figyelmet.

Annak ellenére, hogy a RAAS első tagjának leírása több mint 100 éve történt, napjainkban is újabbnál újabb elemeit fedezik fel, és tárják fel addig ismeretlen szerepét. Az ACE-gátló gyógyszerekkel elért sikerek árnyékában viszonylag keveset tudunk az ACE endogén szabályozásáról, ezen belül is az endogén ACE-gátló molekulák jelenlétéről, vagy hiányáról. Eddigi kutatómunkám során megkíséreltem kimutatni egy endogén ACE-gátló molekula jelenlétét a vérből, azonosítani azt, biokémiaileg karakterizálni és vaszkuláris hatásait leírni.

ELMÉLETI ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

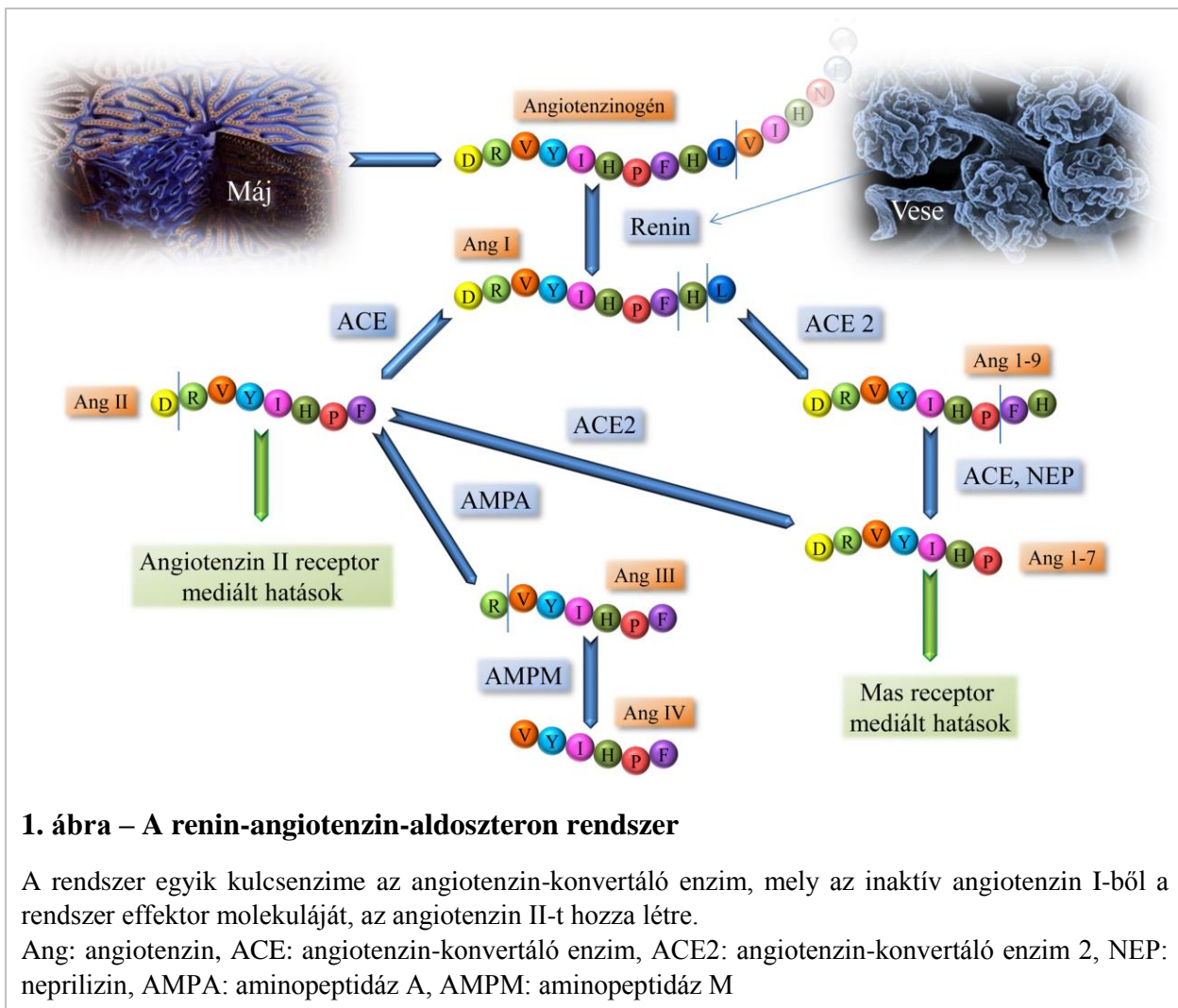
A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer múltja a XIX. század végéig nyúlik vissza. 1898-ban Tigerstedt és Bergman olyan anyagra bukkant a nyúl vese kéregállományában, melyet az állatnak intravénásan adva presszor hatást fejtett ki⁵. Ezt az anyagot reninnek nevezték el. A következő évszázadban sorra fedezték fel a rendszer egyes tagjait: 1940-ben E. Braun-Menendez és mtsi. valamint I. H. Page és mtsi. egyidőben a hypertensin II-t^{6,7} (mai nevén angiotenzin II-t), 1953-ban Simpson és mtsi. az aldoszteront⁸, 1954-ben Skeggs és mtsi. a hypertensin I-et⁹ (angiotenzin I), 1956-ban a hypertensin konvertáló enzimet¹⁰ (angiotenzin konvertáló enzim) majd 1957-ben a renin szubsztrátot¹¹ (angiotenzinogén). Habár a RAAS „klasszikus” elemei az 50-es évek végére már ismertek voltak, csupán a 60-as évek közepére vált nyilvánvalóvá, hogy ezek az anyagok egy rendszert alkotnak¹².

A májban termelődő α_2 -globulin angiotenzinogén N-terminális végéről a vese juxtaglomeruláris apparátus granuláris sejtjei által előállított renin hasít le egy 10 aminosavból álló peptidet, az angiotenzin I-et. A renin elválasztásának legfőbb ingerei a veseperfúzió csökkenése (nyomásesés a glomerulus vas afferensének területén), a nátrium-klorid koncentráció csökkenése a tubulusban, valamint a szimpatikus aktivitás fokozódása a juxtaglomeruláris apparátushoz futó szimpatikus idegvégződésekben. Az inaktív, közvetlen hatásokkal nem rendelkező angiotenzin I C-terminálisáról az angiotenzin-konvertáló enzim hasít le két aminosavat, ezzel előállítva a RAAS legfőbb effektor molekuláját, a nyolc aminosavból álló angiotenzin II-t (1. ábra). Az angiotenzin II hatásait az 1-es (AT₁) és 2-es (AT₂) típusú angiotenzin II receptorokon keresztül fejt ki. Az AT₁-receptoron keresztül fokozza az aldoszteron és a vazopresszin szekréción, vazokonstriktiót hoz létre, szomjúságot okoz, elősegíti a fibrózist, a sejtnövekedést és a migrációt, stb. Az AT₂-receptoron keresztül mediált hatásai többnyire ellentétesek az 1-es receptoron keresztül kifejtett hatásokkal: vazodilatációt okoz, fokozza a nitrogén-monoxid keletkezését és gátolja a sejtnövekedést. Az angiotenzin II-t az aminopeptidáz A angiotenzin III-má katabolizálja, mely az angiotenzin II hatásaival, de jelentősen rövidebb fél-életidővel rendelkezik. Az angiotenzin III-t az aminopeptidáz M angiotenzin IV-gyé hasítja, melynek már sokkal kisebb biológiai hatása van.

A RAAS rendszer fő útvonalának leírását követően egyre újabb elemeket fedeztek fel, melyek aktív szerepet játszanak a rendszer szabályozásában. A 2000-ben publikált¹³ angiotenzin-konvertáló enzim 2 (ACE2) az angiotenzin I és az angiotenzin II hasítása révén csökkenti az angiotenzin receptorokon mediált hatások mértékét¹⁴. Sőt, a keletkező angiotenzin 1-7 G-

fehérjéhez kapcsolt Mas receptorokon kifejtett hatásai többnyire ellentétesek az angiotenzin II kardiovaszkuláris AT₁-receptorokon leírt kedvezőtlen hatásaival: csökkenti a remodellinget, a miokardiális oxidatív stresszt¹⁵, vazoprotektív és antiproliferatív hatásai vannak. Másrészt a Mas receptor hetero-oligomert képez az AT₁-receptorral, így gátolva az angiotenzin II hatásainak kifejlődését¹⁶.



Az angiotenzin-konvertáló enzim

1967-ben Yang és mtsi. leírták egy újabb bradikininbontó enzim jelenlétét a humán plazmában, melyet kinináz II-nek nevezték el¹⁷. Három évvel később derült fény arra, hogy a kinináz II nem más, mint Skeggs és mtsi. által már 1956-ban felfedezett hipertenzin-konvertáló enzim¹⁸. A későbbiekben ezt az enzimet közös néven, angiotenzin-konvertáló enzim névvel illették.

Az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE, CD 143) a RAAS egyik kulcsenzime, mely cink-függő endodipeptidázként az angiotenzin I C-terminális végéről 2 aminosavat lehasítva az

angiotenzin I – II átalakulást katalizálja. Az ACE-gén a 17. kromoszóma hosszú karján található (17q23). A 21 000 bp hosszúságú gén 26 exont és 25 intront tartalmaz.

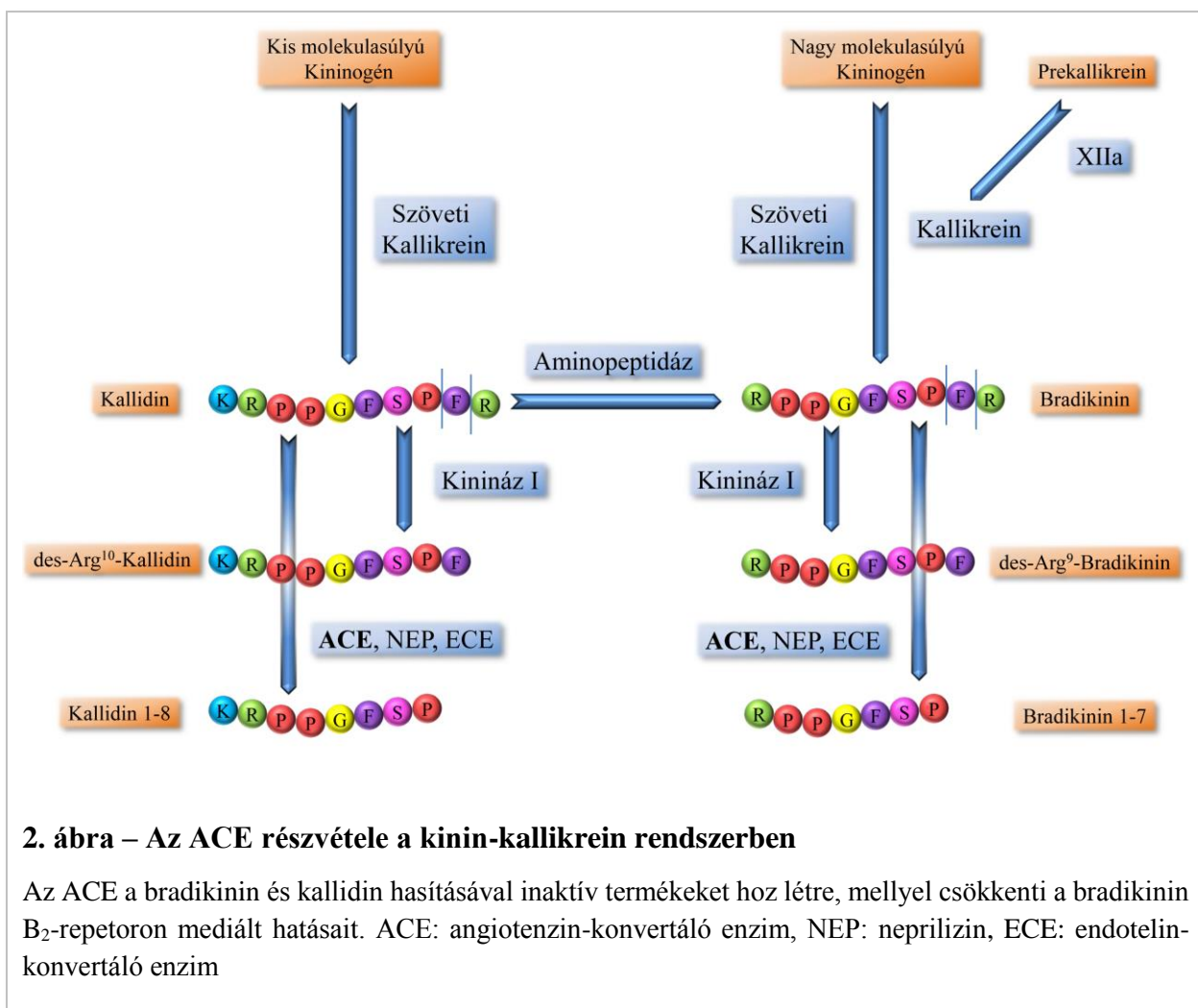
Az ACE-nak két izoenzimje ismert¹⁹. A szomatikus ACE - mely a nagyobb méretű forma (150-180 kDa) - számos szövetben megtalálható, többek között az endotél sejtek felszínén, a kardiovaszkuláris rendszer elemeiben, a vesékben, a májban, stb. Szerkezetére jellemző, hogy egy rövid C-terminális citoplazmatikus domént követően egy hidrofób transzmembrán rész található benne, mely biztosítja az ACE megfelelő kihorgonyozását a sejt felszínére²⁰. A katalitikus centrumokat tartalmazó hatalmas, 1249 aminosavból álló nagymértékben glikozilált globuláris domén a sejten kívül helyezkedik el. A szomatikus ACE két aktív centrummal rendelkezik, melyek feltehetően génduplikáció következtében jöttek létre. Az aktív centrumok kialakításában résztvevő aminosavak sorrendje azonos (HEMGH), mégis részben eltérő tulajdonságokkal és szubsztrát specificitással rendelkeznek²¹⁻²³. A C-terminális aktív centrum jobban függ a Cl⁻ ionok jelenlététől és kevésbé hőstabil, mint a nagyobb mértékben glikozilált N-terminális. Mindkét aktív centrum hasonló hatékonysággal bontja a bradikint, míg az angiotenzin I hasítás a C-domén aktív centrumon a hatékonyabb²². Az ACE-szekretáz a transzmembrán régió extracelluláris oldalán hasítva az enzimet biztosítja annak keringésbe történő jutását^{24,25}.

A tesztikuláris, vagy germinális ACE csak a herékben expresszálandó forma (95-105 kDa), mely egyetlen aktív centrummal rendelkezik. Ez az izoenzim az ACE-gén második felében van kódolva, és a gén 12. intronjában elhelyezkedő here-specifikus promóter szabályozza annak kifejeződését²⁶. Az ACE-knockout egerek jelentősen csökkent fertilitással rendelkeznek²⁷, mely rávilágít a tesztikuláris ACE kiemelt szerepére a reprodukció biztosításában.

A keringésben megtalálható ACE mennyisége jelentős egyének közötti variabilitást mutat. Ennek hátterében az ACE inzerció/deléción (I/D) polimorfizmusa áll²⁸, mely egy 287 bázispár hosszúságú nem kódoló repetitív szekvencia inzertálódása (I), vagy deléciónja (D) az ACE-gén 16. intronjába. Az I/D polimorfizmus következtében a D-alléllal rendelkező egyének esetében nagyobb szérums ACE koncentrációt mérhetünk, mint az I-alléllal rendelkező egyének esetében. Az egyének közötti variabilitás mértékét eltérően írták le a különböző kutatócsoportok, az első megjelent közleményben 50%-os, később 20%-os^{29,30}, vagy csak 8%-os variabilitást találtak³¹.

Az ACE nemcsak az angiotenzin I, II átalakulást katalizálja, hanem más peptidek metabolizmusában is részt vesz. Többek között hasítja a P-anyagot, a neurotenzint³², a gonadotropin-serkentő hormont (GnRH), az amiloid- β peptidet²², de talán a bradikinin inaktiválása az egyik legfontosabb funkciója ezek közül (2. ábra). Az ACE bradikinin 1-7-é hasítja

a kinin-kallikrein rendszer fő effektor molekuláját, ezzel csökkenti annak a B₂-receptoron kiváltott hatásait. Így csökkenti a vazodilatációt, az NO-, valamint a prosztaglandin termelés mértékét.



2. ábra – Az ACE részvétele a kinin-kallikrein rendszerben

Az ACE a bradikinin és kallidin hasításával inaktív termékeket hoz létre, mellyel csökkenti a bradikinin B₂-receptoron mediált hatásait. ACE: angiotenzin-konvertáló enzim, NEP: neprilizin, ECE: endothelin-konvertáló enzim

ACE-gátló gyógyszerek

Az ACE-gátló gyógyszerek az egyik legszélesebb körben alkalmazott terápiás szerek, többek között a magasvérnyomás-betegség, szívelégtelenség és a diabéteszes nefropátia kezelésében. Elterjedt, gyakori használatát az is jelzi, hogy az 5. leggyakrabban felírt gyógyszer az Amerikai Egyesült Államokban, 2009-ben összesen 162,8 millió recepten szerepelt valamilyen típusú ACE-gátló gyógyszer³³.

Az ACE-gátlók fejlesztésének története 1965-ig nyúlik vissza, amikor Ferreira egy, a bradikinin hatását fokozó faktorra bukkant a *Bothrops jararca* vipera mérgeiben³⁴. Későbbiekben ezt egy 9 aminosavból álló peptidként, a teprotidként azonosították, melynek jelentős ACE-gátló és vérnyomáscsökkentő hatása van. A teprotid klinikai alkalmazhatósága limitált, mivel csak intravénásan elérhető, viszont kitűnő kiindulópontként szolgált az szájon át szedhető ACE-gátlók

fejlesztéséhez. 1975-re sikeresen kifejlesztették az első stabil, aktív ACE-gátló gyógyszert, a captopril, melyet 1981-től az Amerikai Egyesült Államokban bevezettek a hipertónia gyógyszeres kezelésébe.

Ezt követően újabb gyógyszerek jelentek meg a betegellátásban, melyeket kémiai szerkezetük szerint 3 csoportba sorolhatunk: (1) szulfhidril-csoportot tartalmazó gyógyszerek (captopril, zofenopril), (2) dikarboxilát-csoportot tartalmazó gyógyszerek (enalapril, ramipril, perindopril, lizinopril stb.) és a (3) foszfonát-csoportot tartalmazó gyógyszer (fozinopril). Csupán a captopril és a lizinopril az aktív hatóanyag, a többi ACE-gátló gyógyszer „pro-drugként” kerül a szervezetbe és a májban metabolizálódik aktív hatóanyaggá. Az eltérő kémiai szerkezetük miatt az ACE-gátlók zsírolékonysága, ezáltal szöveti affinitása is különböző. A perindopril, quinapril és trandolapril nagyobb szöveti affinitással rendelkezik, mint a hidrofil lizinopril vagy enalapril³⁵.

Ezek a gyógyszerek a RAAS egyik kulcsenzimének, az ACE-aktivitásának gátlásával csökkentik az angiotenzin I – II átalakulás mértékét, ezzel létrehozva terápiás hatásait. Az ACE-gátlók számos klinikai tanulmányban bizonyították hatékonyságukat, melyek alátámasztották, hogy az ACE-gátlók csökkentik a kardiovaszkuláris halálozást, a stabil koronária betegségben fellépő nem végzetes miokardiális infarktus és szívmegállás rizikóját³, javítják a prognózist³⁶ és az 5-hetes mortalitást³⁷ miokardiális infarktus után, csökkentik a bal kamrai remodelláció mértékét³⁸, késleltetik a hipertónia kialakulását³⁹, csökkentik a bal kamrai tömegindexet bal kamra hipertrófiában⁴⁰, csökkentik a mikroalbuminuria mértékét és a diabéteszes nefropátia kockázatát 2-es típusú diabéteszben⁴¹.

A legújabb terápiás irányelvek is ajánlják és magukba foglalják az ACE-gátlókat mind a heveny koronária szindróma⁴², a krónikus szívelégtelenség⁴³, a diabétesz⁴⁴, a perifériás verőérbetegségek⁴⁵ kezelésében, mind pedig a kardiovaszkuláris prevenció⁴⁶ kialakításában és a miokardiális revaszkularizációban⁴⁷. Az ACE-gátlókat arra is érdemesnek tartják, hogy a primer prevencióban alkalmazható hipotetikus többkomponensű tablettá (polypill) egyik hatóanyaga legyen. A polypill szedésével akár 80%-kal csökkenteni lehetne az egészséges emberek kardiovaszkuláris megbetegedéseinek kialakulását⁴⁸.

Az ACE-gátlók kedvező hatásaikon túl változó mértékű, olykor súlyos mellékhatásokat is okozhatnak. A jelentősebb és kedvezőtlenebb mellékhatások között a köhögést, az angioödémát (Quincke-ödéma) és a vesefunkció romlását emelhetjük ki. Az állandó jellegű száraz köhögés oka még ma sem teljesen tisztázott. A legelfogadottabb magyarázat szerint az ACE-gátlás miatt létrejövő magasabb lokális bradikinin-koncentráció proinflammatorikus peptidek (P anyag, prosztaglandinok, neuropeptid Y) megjelenéséhez, ezáltal fokozott hisztamin felszabaduláshoz

vezet a légutakban, így kiváltva a száraz köhögést^{49,50}. A különböző típusú ACE-gátló gyógyszerek eltérő mértékben gátolják a bradikinin lebontását. A bradikinin/angiotenzin I szelektivitási arány a perindopril esetében nagyobb (1,44), mint a ramipril (1,16), quinapril (1,09) vagy a trandolapril (1,08) esetében, az enalapril pedig ugyanolyan mértékben gátolja a bradikinin lebontását, mint az angiotenzin I hasítását (1,00)⁵¹.

Az angioödéma a bőr és/vagy a nyálkahártya mélyebb rétegeiben az erek dilatációja és fokozott permeabilitása következtében kialakuló duzzanat, mely rendszerint a kezek, a nyak és a nemi szervek területén jelenik meg. A nagymértékű nyaki duzzanat a légutak beszűkítése révén életveszélyes állapottá válhat. Ennek hátterében a lokális bradikinin, illetve a bradikinin bomlástermékeinek (des-Arg⁹-bradikinin, 2. ábra) felszaporodása állhat⁵². Az EUROPA tanulmányban a perindopril alkalmazásakor az angioödéma incidenciája 0,3% volt³, más típusú ACE-gátlók esetében az incidenciát 0,1 és 1% közé teszik. Németországban 6,5 millió beteg szed ACE-gátlót, esetükben a megfigyelt angioödéma incidenciája 0,5% körüli⁵³. Ezek az adatok kaukázusi betegekre vonatkoznak. Megfigyelték, hogy az angioödéma relatív kockázata megközelítőleg 4,5-szer magasabb fekete-bőrű betegek esetében⁵⁴, melynek következtében az angioödéma incidenciája akár 1% feletti is lehet.

ACE-gátló kezelés hatására csökken a vesék vérátáramlása, mely társult betegségek esetén (pl. vese artéria szűkület) a vesefunkció romlását, esetenként heveny veseelégtelenséget okozhat.

A széleskörű alkalmazhatóságuk mellett relatíve kevés kontraindikációjuk van ezeknek a gyógyszereknek. Az ACE-gátlóval szembeni túlérzékenység, az ACE-gátló szedésével összefüggésbe hozható korábbi angioödéma vagy a kétoldali súlyos vese artéria szűkülete az abszolút kontraindikációk közé sorolandók. Érdeemes mérlegelni az ACE-gátlók alkalmazását például csökkent vesefunkció vagy hipovolémia (dehidráció) esetében. A terhesség alatt alkalmazott ACE-gátló kezelés súlyos veleszületett malformációkkal járhat⁵⁵, így az első trimeszterben alkalmazásuk nem javasolt, a második és harmadik trimeszterben pedig kontraindikált.

Természetes ACE-gátló vegyületek

Az első azonosított ACE-gátló vegyületet viperaméregből izolálták, azonban nem ez az egyedüli természetben is előforduló, az angiotenzin I – II konverziót befolyásoló szer. Az utóbbi két évtizedben egyre több, a táplálékból származó, peptid típusú ACE-gátló vegyületet azonosítottak, melyek klinikai jelentősége még kérdéses.

A tejben megtalálható kazein, illetve a tejsavó egyéb fehérjéi között számos ACE-gátló hatású vegyületet azonosítottak^{56,57}. Ezek közül a laktokininek és a kazokininek vérnyomáscsökkentő hatását igazolták spontán hipertóniás patkányok esetében⁵⁸⁻⁶⁰, valamint humán kísérletes vizsgálatokban is hasonló hatásról számoltak be^{61,62}.

Spanyol kutatók kakukkfű és gesztenyefa virágjának nektárjából készült méz ACE-gátló tulajdonságát írták le az antibakteriális és antioxidáns hatások mellett⁶³.

Számos tengeri állatfaj fehérjéinek hidrolizátumából nyertek ki ACE-gátló hatással rendelkező oligo- és polipeptid típusú vegyületeket⁶⁴. Ezek a peptidek a táplálék megemésztése során is keletkezhetnek, azonban felszívódásuk, keringésbe kerülésük még bizonyításra vár. Annak ellenére, hogy a természetes ACE-gátló molekulák klinikai kipróbálása még nem történt meg, illetve primer prevencióban betöltött szerepe még tisztázásra vár, ezek az újabb megfigyelések tovább lendíthetik a funkcionális élelmiszerek fejlesztését, és kipróbálását.

Endogén ACE-gátlás

Az endogén ACE-gátlás lehetőségét már 1979-ben felvetették. Ryan és mtsi. egy 10 kDa-nál kisebb molekulatömegű gátlószert találtak az ember, a tengerimalac, valamint a patkány szérumban és vizeletében⁶⁵. Ennek az inhibitornak a pontos azonosítása azonban nem járt sikerrel.

Ugyanebben az évben Klauser és mtsi. a humán szérumalbumint és az acetyl-triptofánt (egy tartósítószer) azonosították ACE-gátlóként egy, a kereskedelmi forgalomban kapható plazma preparátumból⁶⁶. Megállapították, hogy az albumin C-fragmentje - mely az albumin 124. és 298. aminosavai közötti szakasz -, jelentősen nagyobb gátlóhatással rendelkezik, mint a teljes fehérje.

Snyder és mtsi. 1986-ban a des-Leu¹⁰-angiotenzin I-et, mint szubsztrát analógot jelölték meg endogén ACE-gátlóként⁶⁷. Ez a peptid angiotenzin I-ből keletkezik a trombocitákhoz és hízósejtekhez köthető karboxipeptidáz-szerű enzimaktivitások révén, és az ACE kompetitív antagonistája. Elméletük szerint ennek a peptidnek szerepe lehet az angiotenzin I-mediált lokális vaszkuláris hatások szabályozásában.

1986-ban Lieberman és mtsi. egy 50 kDa-nál nagyobb molekulatömegű inhibitorot találtak a humán szérumban, mely megnehezítette a szarkoidózisban szenvedő betegek ACE-aktivitásának meghatározását⁶⁸. Az inhibitor azonosítása nem sikerült, a gátlóhatást viszont reverzibilisnek találták, így a szérumminták 8-szoros hígítását javasolták a zavaró tényező kiküszöbölésére.

Rogerson és mtsi. 1989-ben a P-anyag N-terminális fragmentjeiről mutatták ki, hogy ACE-gátló hatással rendelkeznek⁶⁹. A P-anyag N-terminális 1-7 heptapeptidje, 1-6 hexapeptidje, 1-4 tetrapeptidje és 3-4 dipeptidje egyaránt gátolta a patkány agyi- és tüdőszövetekben lokalizálódó ACE-t, míg az 1-3 tripeptid csak az agyi ACE aktivitását gátolta, a tüdőét nem. Ebből arra következtetett, hogy a patkány tüdejében és agyában lévő enzimek különböző izoenzimek lehetnek.

Ikemoto és mtsi. 1989-ben patkány szív tanulmányozásakor találtak egy szulfhidril-proteint, mely kompetitív módon gátolta az ACE aktivitását⁷⁰. A protein 10 kDa-nál kisebb méretű volt, hatását pedig szulfhidril-csoportot blokkoló ágensekkel fel lehetett függeszteni. Habár a molekula azonosítása nem járt sikerrel, mégis szerepet tulajdonítottak neki a patkány szív ACE-mediált folyamatainak szabályozásában.

Az 1990-es években is tovább folyt a kutatás az endogén ACE-gátlók jelenlétének igazolására. Brecher és mtsi. 1996-ban publikált eredményeikben két ACE-inhibitorról - egy nagyobb és egy kisebb méretű reverzibilis gátlóhatást mutató fehérjéről - számoltak be patkányok esetében⁷¹. Szintén 1996-ban a C-típusú nátriuretikus peptidet is egy endogén ACE-gátló peptidként azonosította Davidson és munkacsoportja⁷². Thevananther és mtsi. 1999-ben pedig affinitás kromatográfiás módszerrel izoláltak egy körülbelül 14 kDa méretű, ACE-gátló hatással rendelkező fehérjét a humán szérumból⁷³.

Annak ellenére, hogy az elmúlt évtizedekben számos próbálkozás történt endogén ACE-gátlók kimutatására, máig sincs egységes álláspont azok meglétére és jelentős élettani szerepükre. Tovább árnyalja a helyzetet, hogy az ACE-gátlók jelentős hatása mellett az endogén gátlóhatást csupán csekély mértékűnek, elhanyagolhatónak tartják.

CÉLKITŰZÉS

Az ACE-gátlók előkelő helyet foglalnak el a kardiovaszkuláris megbetegedések kezelésében. Az elmúlt 2 évtizedben több, sok ezer beteget felölelő randomizált, kontrollált, kettős vak tanulmányban bizonyították hatékonyságukat. Az ACE-gátlók több, mint 20%-kal is csökkenthetik a kardiovaszkuláris mortalitást^{3,4}, melynek eredményeként az erről szóló legfrissebb terápiás irányelvek többsége ajánlja ezeket a gyógyszereket. Az ACE-gátlók sikerességét az is mutatja, hogy közel 48 000 találatot ad a Medline „ACE inhibitor” (ACE-gátló) kifejezésre. Az ACE-gátlók sikerei háttérbe szorították az endogén ACE-gátlással foglalkozó kutatások eredményeit. Csupán elenyésző számú közlemény született a témában, melyek nem alkotnak egységes képet a lehetséges endogén inhibitorokról, sem azok potenciális élettani hatásairól.

Kutatási eredményeink szerint egy magyar hipertóniás betegekből álló vizsgálati populáció szérum ACE-koncentrációja az I/D polimorfizmus genetikai kontrollja alatt áll. A DD-genotípussal rendelkező betegeknek 64%-kal magasabb az ACE-koncentrációjuk, mint az II-genotípussal rendelkező betegeknek⁷⁴. Ez az eredmény összhangban van a Rigat és mtsi. által leírtakkal²⁸. Ezzel szemben a betegek ACE-aktivitásának tekintetében a különbség lényegesen kisebbnek, csupán 32%-nak adódott. Az eltérésnek legalább két magyarázata lehet: (1) nem megfelelő az ACE-mennyiség és aktivitás mérésére használt módszerünk, (2) endogén ACE-gátló jelenléte miatt találunk kisebb különbséget az aktivitás tekintetében.

Munkámban célul tűztem ki, hogy:

- a kísérleteink során használt ACE-aktivitásmérést az ACE fiziológiás szubsztrátjával szemben validáljam,
- kimutassam endogén ACE-gátló jelenlétét a szérumban,
- azonosítsam az endogén ACE-inhibitort,
- biokémiaiilag jellemezzem az endogén ACE-gátlást, és
- megvizsgáljam az endogén ACE-gátló vaszkuláris hatásait.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vérminták gyűjtése, szérumminta készítése

A vérmintákat egészséges és magasvérnyomás-betegségben szenvedő önkéntesektől gyűjtöttük aseptikus technikával. Összesen 502 hipertóniás beteget vontunk be vizsgálatainkba, 289 férfit (átlagéletkor: 61 ± 10 év) és 213 nőt (átlagéletkor: 62 ± 11 év). A natív vérmintákat 60 percig szobahőmérsékleten tartottuk, majd a szérumot 15 perces, 1 500 g erősségű centrifugálással elválasztottuk a sejtes elemektől. Az így kapott szérum mintákat felhasználásig -20°C -on fagyasztva tároltuk.

Szérum ACE-aktivitás meghatározása spektrofotometriás módszerrel

A szérumminták ACE-aktivitását Beneteau és mtsi. módszerének átdolgozott változata szerint határoztuk meg⁷⁵. Ennek alapja a 340 nm-en magas fényelnyelő képességű mesterséges ACE-szubsztrát, a FAPGG (*N*-[3-(2-furil)akrilóil]-*L*-fenilalanil-glicil-glicin; Sigma-Aldrich, K_M : 310 μM) hasítását követő optikai-denzitáscsökkenés. A reakcióelegy 25 mM HEPES (*N*-2-hidroxietil-piperazin-*N*-2-etánszulfonsav) pufferben 0,5 mM FAPGG-t, 300 mM NaCl-ot és szükséges mennyiségű humán, vagy állati eredetű szérumot tartalmazott 8,2-es pH-n. A méréseket 96 lyukú lemezekben (Greiner-Bio One), 37°C -on végeztük. Az 340 nm-es hullámhosszon bekövetkező optikai-denzitásváltozást NovoStar plate-readerrel (BMG Labtech) 5 perces időközönként rögzítettük legalább 90 percen keresztül. Az optikai-denzitásváltozást az idő függvényében ábráztuk és a pontokra egyenest illesztettünk. Az illesztést akkor fogadtuk el, ha az illeszkedés mértéke (r^2) meghaladta a 0,9-et. A minták ACE-aktivitását az alábbi képlet alapján számoltuk:

$$\text{Aktivitás} = (S/k) * D,$$

ahol S az illesztés meredeksége (1/min), k az 1 μmol FAPGG hasítását követő optikai-denzitáscsökkenés, D a szérum hígításának mértéke. Az ACE-aktivitás értékét U/l-ben fejeztük ki, ahol 1 U annak az enzimaktivitásnak a mértéke, amely mellett 1 perc alatt 1 μmol FAPGG hasítása következik be.

Domén-specifikus ACE-aktivitás meghatározása

Az aktív centrum-specifikus ACE-aktivitásmérést Carmona és mtsi. által leírtak szerint végeztük⁷⁶. Quenchelt peptid-szubsztrátokat használtunk, melyek közül az Abz-SDK(Dnp)P-OH (Sigma-Aldrich, K_M : 22 μ M) szubsztrátot az N-terminális aktív centruma, az Abz-LFK(Dnp)-OH (Sigma-Aldrich, K_M : 32 μ M) szubsztrátot a C-terminális aktív centruma képes specifikusan hasítani, míg az Abz-FRK(Dnp)P-OH (Sigma-Aldrich, K_M : 4 μ M) quenchelt peptidet mindkét aktív centrum képes bontani. A reakcióelegy 100 mM *tris*(hidroximetil)-aminometán hidrokloridot (TRIS HCl, Sigma-Aldrich), 50 mM NaCl-t, 10 μ M ZnCl₂-t, 40 μ M Abz-SDK(Dnp)P-OH, vagy 50 μ M Abz-LFK(Dnp)-OH, vagy 10 μ M Abz-FRK(Dnp)P-OH peptid-szubsztrátot és szükséges mennyiségű szérumot tartalmazott 7-es pH-n. A mérések kivitelezése 96 lyukú fekete platekben (Greiner-Bio One) 37°C-on történt. A gerjesztési hullámhossz $\lambda=340$ nm, az emissziós hullámhossz $\lambda=405$ nm volt. A fluoreszcens jelintenzitásban bekövetkező változást a domén-specifikus szubsztrátok esetében 4 perces időközönként rögzítettük legalább 90 percen keresztül, a nem specifikus szubsztrát esetében 1,5 perces időközönként legalább 30 percen keresztül rögzítettük NovoStar plate-readerrel (BMG Labtech). A fluoreszcens jelintenzitás változását az idő függvényében ábrázoltuk és a pontokra egyenest illesztettünk. Az illesztést akkor fogadtuk el, ha jósága (r^2) meghaladta a 0,95-öt. A minták ACE-aktivitását az alábbi képlet alapján számoltuk ki:

$$\text{Aktivitás} = (S/k) * D,$$

ahol S az illesztett egyenes meredeksége (1/min), k az 1 μ mol fluoreszcens szubsztrát hasítását követő fluoreszcencia intenzitás növekedés, D a szérum hígításának mértéke. Az ACE-aktivitás értékét U/l-ben fejeztük ki, ahol 1 U annak az enzimaktivitásnak a mértéke, amely mellett 1 perc alatt 1 μ mol fluoreszcens szubsztrát hasítása következik be.

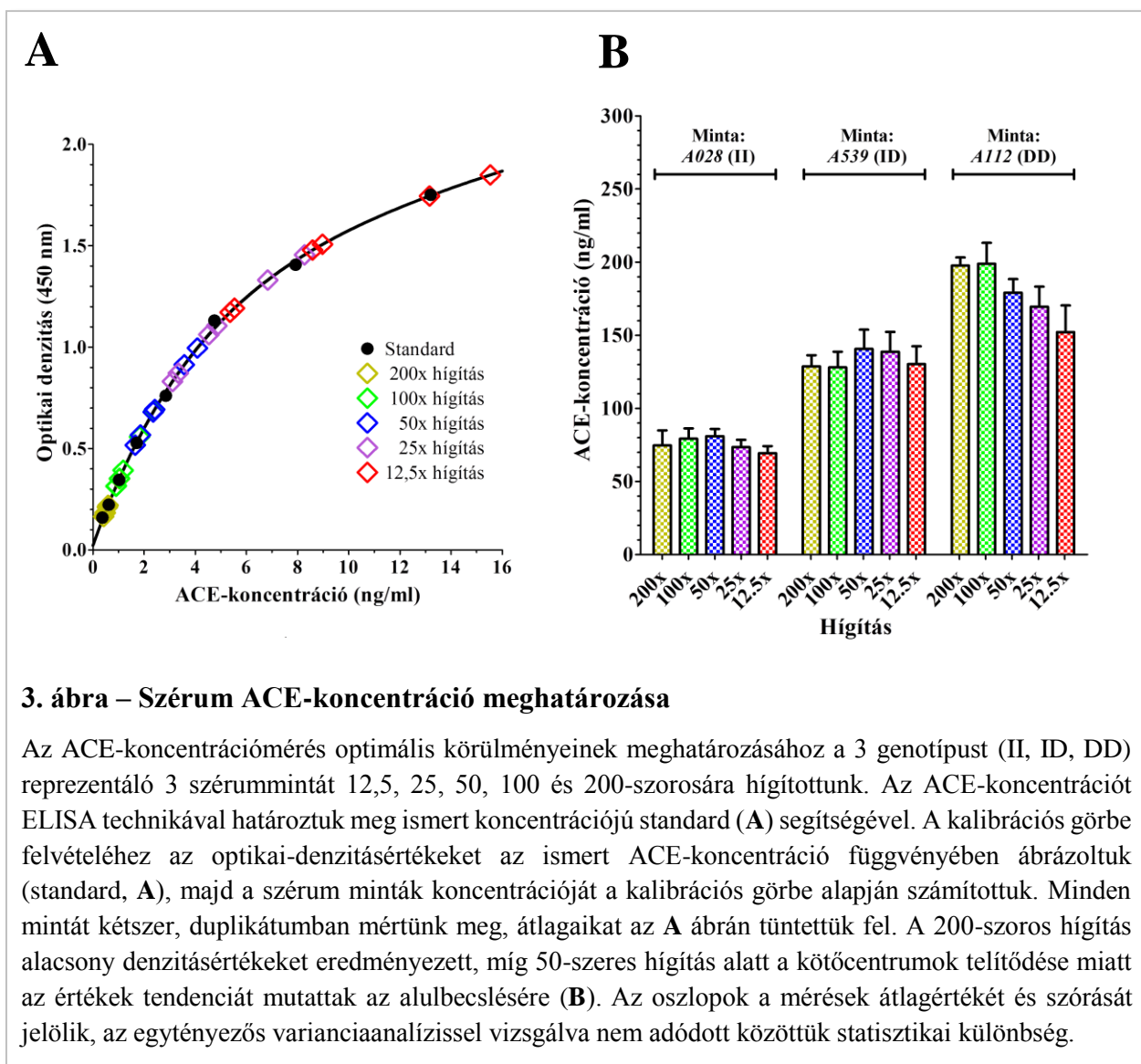
ACE-mediált angiotenzin I-hasítás közvetlen mérése

A szérummintákat, melyek 0,5 mM angiotenzin I-et és 300 mM NaCl-ot tartalmaztak 8,2-es pH-jú HEPES pufferben, 37°C-on inkubáltunk. Az elegyekhez 5 mM EDTA-t adtuk a reakció végén, hogy leállítsuk az ACE-katalizált angiotenzin I-hasítást. A keletkezett angiotenzin peptidek mennyiségét HPLC technika segítségével mértük, miután a mintákat átszűrtük egy 10 kDa pórusméretű filteren. Az analízis reverz fázisú C18 oszlopon (Hypersil Gold, Thermo Scientific) történt, az A eluens 0,01% trifluoroacetát (TFA, Sigma-Aldrich) vizes oldata, míg a B eluens 0,01% TFA-t tartalmazó acetonitril (ACN, Sigma-Aldrich) volt. Az angiotenzin peptideket 22%

ACN-ről 55% ACN-re növekvő gradiens elúciós profillal szeparáltuk, és diódasoros detektorral detektáltuk 230 nm-en. A peptidekre jellemző csúcsok görbe alatti területe alapján kalibrációs görbe segítségével számoltuk ki a peptidek mennyiségét. A kapott értékeket az idő függvényében ábrázoltuk, melyre egyenest illesztettünk. Az angiotenzin I-átalakulás sebességét a szérumból hígítással kivont minták hígítási fokával korrigáltuk, és az ACE aktivitást az 1 liter szérumból 1 perc alatt hasított angiotenzin I μmol -ban kifejezett mennyiségével jellemeztük.

A szérumból ACE mennyiségének meghatározása

A szérumból ACE mennyiségét a kereskedelmi forgalomban kapható humán „ACE development kittel” (R&D Systems) határoztuk meg a gyártó utasításai szerint, kisebb módosításokkal. 96-lyukú ELISA-lemezt (Greiner Bio-One) lyukanként 80 ng ACE-ellenes antitesttel fedtünk le (capture antitest), majd a lemez szabad kötőhelyeit reagens hígítóval (10 mg/ml borjú



szérumalbumin oldat [BSA, Sigma-Aldrich] Dulbecco-féle foszfát pufferben [PBS, Gibco]) blokkoltuk. Reagens hígítóban 12,5-200-szorosára hígított szérumot adtunk a lyukakba, majd az antitest-antigén komplexet biotinilált detekciós antitesttel (20 ng/lyuk) jelöltük.

Ezt követően reagens hígítóban 200-szorosára hígított streptavidinnel konjugált torma-peroxidázt pipettáztunk a lyukakba. Végül az ELISA lemezhez kötött komplex mennyiségét szubsztrát oldattal határoztuk meg, amely 0,3 mg/ml tetrametil-benzidint, 0,1 μM H_2O_2 -t és 50 mM ecetsavat tartalmazott. A reakciót 20 perc elteltével 0,5 M sósavval leállítottuk, majd lemértük a minták optikai denzitását 450 nm-en plate readerrel (BMG Labtech). Az ACE-koncentrációt rekombináns ACE-standard sor segítségével számoltuk ki. A méréseket legalább háromszor ismételtük meg, hogy a szórás legfeljebb 15% legyen. Az optimális szérumhígítás meghatározása érdekében egy-egy DD, ID és II ACE-genotípusú beteg szérumából sorozat hígításokat készítettünk, melyekben meghatároztuk az ACE- mennyiségét. A százszoros szérumhígítás tűnt a legalkalmasabbnak a mérések kivitelezéséhez, mivel ebben a hígításban a mért értékek a kalibrációs görbe egyenes szakaszára estek (összehasonlítva az 50-szeresnél kisebb hígításokkal), valamint már elég erős jelet adtak a mérések pontos elvégzéséhez (3. ábra).

A humán szérum fehérjéinek elválasztása

Egy egészséges önkéntestől származó, 25 mM-os HEPES-ben (pH=8,2) 250-szeresére hígított szérummintákat egyszer használatos ultraszűrőkkel szűrtük mindaddig, amíg a hígított szérumminták el nem érték a kiindulási térfogatukat. A szűrők (Vivaspin 500, Sartorius Stedim Biotech) pórusmérete 50 és 100 kDa-os volt, a szűrést 4°C-on, 15 000 g erősségű centrifugálással 6 perces ciklusokban végeztük. Egy szérummintánál a kiindulási és a 100 kDa-os pórusméretű szűrővel kivitelezett szűrés után visszanyert frakció ACE-koncentrációját megmértük (ACE specifikus ELISA-kittel), így meg tudtuk becsülni a minta hígulását vagy töményedését. Nem találtunk különbséget a kiindulási és a szűrés utáni frakciók ACE-koncentrációi között (az értékek rendre $119,5 \pm 12,0$ ng/ml, $n=3$; $111,8 \pm 11,0$, $n=3$, $p=0,459$ voltak).

A humán szérumalbumin koncentrációjának meghatározása

A humán szérumalbumin-koncentrációjának mérését brómkrezol-zöld diagnosztikai reagens (BCG, Dialab) segítségével határoztuk meg a gyártó utasítása szerint. 1 ml brómkrezol-zöld reagenshez (260 μM brómkrezol-zöld 30 mM citrát pufferben, pH=4,2) 10 μl szérummintát

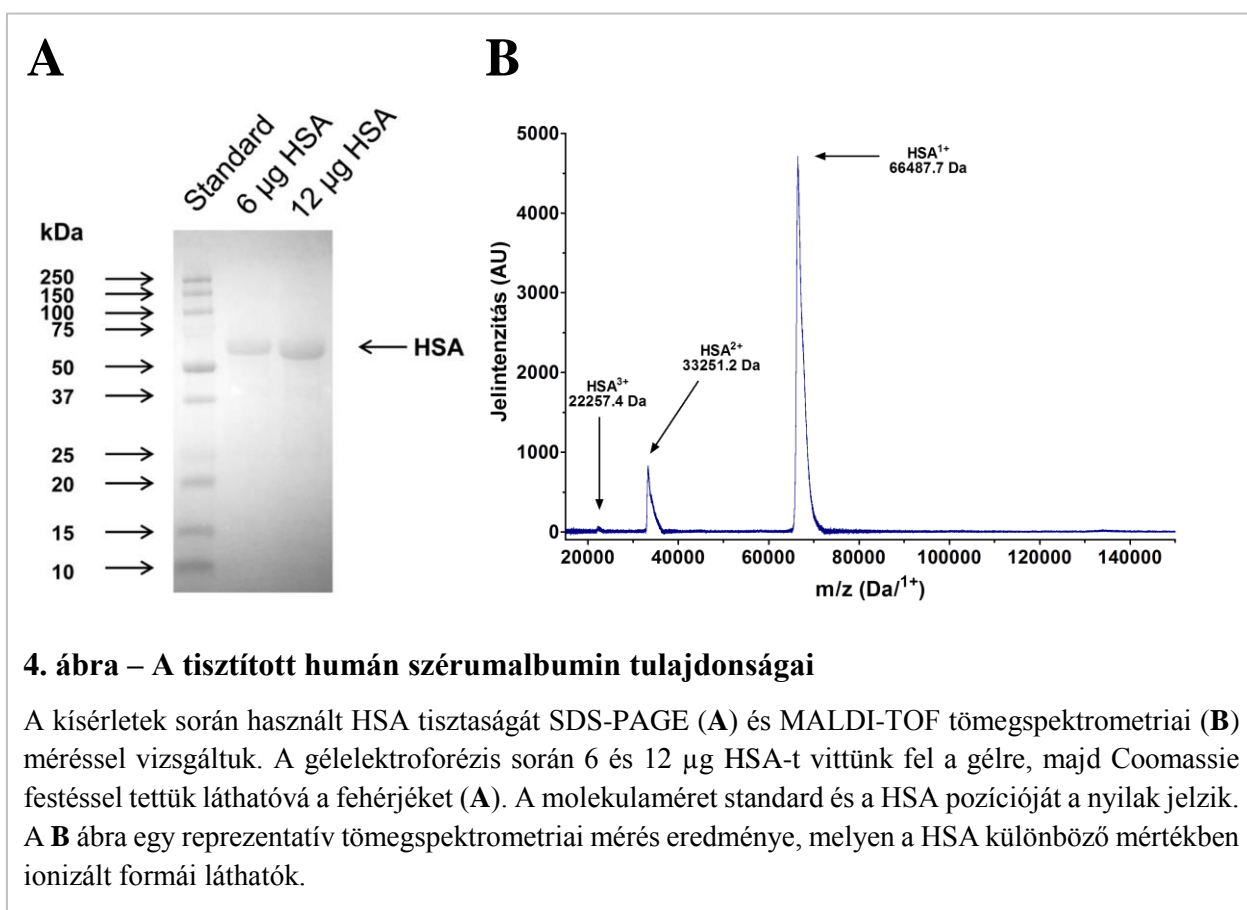
adtunk, majd a keveréket 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az elegyek abszorbanciáját spektrofotométerrel (U-2900, Hitachi) mértük 546 nm-en egyszer használatos küvetákban reagens vakkal szemben. A HSA-koncentrációt a következő képlet szerint számítottuk:

$$\text{HSA-koncentráció} = (A_{\text{minta}}/A_{\text{standard}}) * C_{\text{standard}},$$

ahol A az 546 nm-en mért abszorbancia, C_{standard} pedig a standard oldat HSA koncentrációja (Albumin standard, Dialab).

A tisztított humán szérumalbumin tulajdonságai

Néhány kísérletben az ACE-aktivitás meghatározását HSA jelenlétében végeztük. A HSA oldat tisztaságát SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (4. A ábra) és MALDI-TOF tömegspektrometriai méréssel ellenőriztük (4. B ábra). Mindkét kísérlet szerint megfelelő tisztaságú volt a HSA.

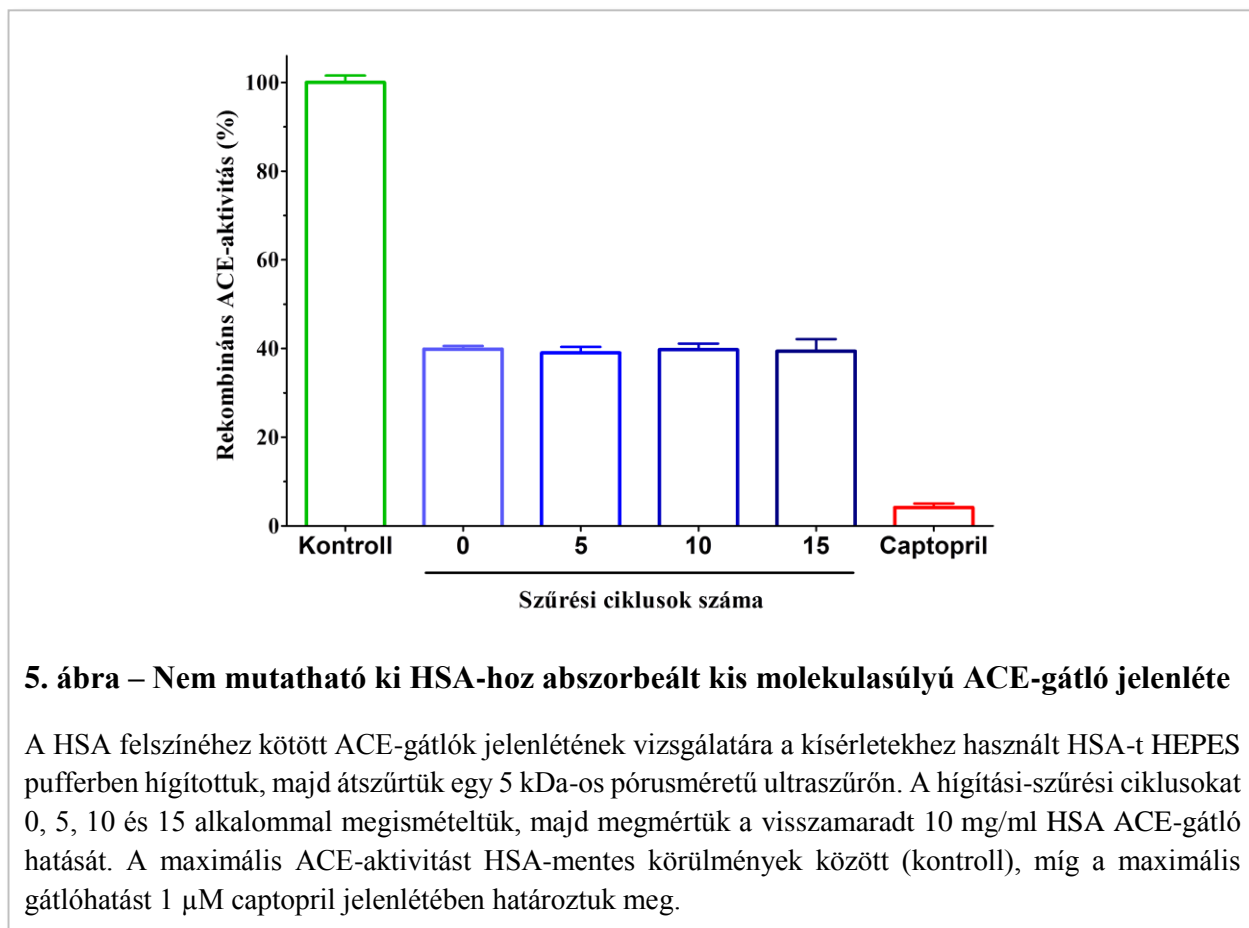


4. ábra – A tisztított humán szérumalbumin tulajdonságai

A kísérletek során használt HSA tisztaságát SDS-PAGE (A) és MALDI-TOF tömegspektrometriai (B) méréssel vizsgáltuk. A gélelektroforézis során 6 és 12 µg HSA-t vittünk fel a gélre, majd Coomassie festéssel tettük láthatóvá a fehérjéket (A). A molekulaméret standard és a HSA pozícióját a nyilak jelzik. A B ábra egy reprezentatív tömegspektrometriai mérés eredménye, melyen a HSA különböző mértékben ionizált formái láthatók.

A kísérletek során használt HSA-t kis molekulasúlyú, albuminhoz abszorbeált ACE-gátlók jelenlétére is megvizsgáltuk. 25 mM HEPES pufferben 20 mg/ml-re hígított HSA-t használtunk kiindulási oldatként, melyet HEPES pufferben ciklusonként további 10-szeresére hígítottunk. Az

így kapott hígított albumin oldatot 5 kDa pórusméretű szűrőn keresztül szűrtük mindaddig, amíg az oldat a kiindulási 20 mg/ml koncentrációra töményedett vissza. Ezt újra a 10-szeresére hígítottuk, majd leszűrtük. A hígítási-, szűrési lépéseket 5, 10, 15-ször ismételtük meg. Legvégül a szűrt albuminból készített 10 mg/ml-es oldat ACE-gátló hatását vizsgáltuk rekombináns ACE és FAPGG szubsztrát segítségével. Pozitív kontrollként 1 μ M captopril oldatot használtunk (5. ábra).



5. ábra – Nem mutatható ki HSA-hoz abszorbeált kis molekulású ACE-gátló jelenléte

A HSA felszínéhez kötött ACE-gátlók jelenlétének vizsgálatára a kísérletekhez használt HSA-t HEPES pufferben hígítottuk, majd átszűrtük egy 5 kDa-os pórusméretű ultraszűrőn. A hígítási-szűrési ciklusokat 0, 5, 10 és 15 alkalommal megismételtük, majd megmértük a visszamaradt 10 mg/ml HSA ACE-gátló hatását. A maximális ACE-aktivitást HSA-mentes körülmények között (kontroll), míg a maximális gátlóhatást 1 μ M captopril jelenlétében határoztuk meg.

Humán vena saphena szegmensek izometrikus kontraktilis erejének mérése

Koronária bypass műtéteken felhasználásra nem került 20 vena saphena mintát 35 szegmensre vágunk szét. A véna darabokat jéghideg fiziológiás pufferben (110 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM KH₂PO₄, 5 mM D-glükóz, 24 mM NaHCO₃, pH=7,4) tartottuk a kétcsatornás myograph rendszerre (DMT 510A; Danish Myotechnology) történő felhelyezés előtt. A szervfürdő oxigenizált (10% O₂, 5% CO₂, 85% N₂) fiziológiás pufferrel volt feltöltve, mely 2,5 mM CaCl₂-ot is tartalmazott. A véna szegmenseket 15 mN erővel megfeszítettük, majd izometriás körülmények között 60 percig 37°C-on pihentettük. Az érgyűrűk életképességét 50 mM KCl és 10 μ M norepinefrin hozzáadásával teszteltük. Ezt követően mostuk az érgyűrűket, majd megmértük az 1 μ M angiotenzin I vagy angiotenzin II kiváltotta kontrakciók nagyságát 20 mg/ml humán

szérumalbumin jelenlétében és hiányában is. A kísérlet végén megismételtük a KCl- és norepinefrin kezeléseket az angiotenzin peptidek folyamatos jelenlétében, ezzel igazoltuk az erek életképességét. Néhány kísérletben az albumint captoprilrel együtt alkalmaztuk.

A humán rekombináns ACE termelése és tisztítása

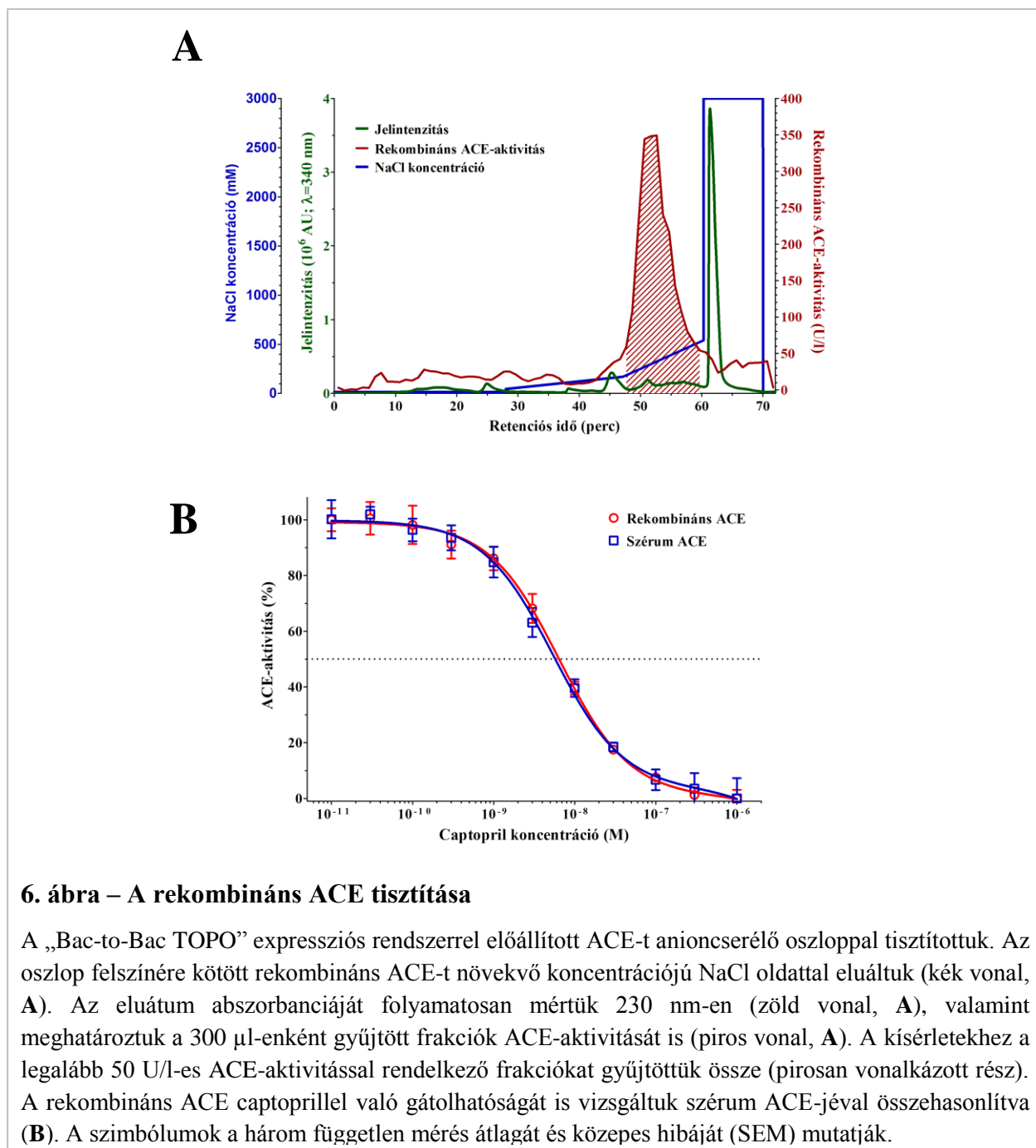
A humán rekombináns ACE-t a „Bac-to-Bac TOPO” expressziós rendszerrel (Invitrogen) termeltük a gyártó utasításai szerint. Egy kémiaiilag kompetens *E. coli* törzset (Invitrogen) transzformáltunk az ACE-gént tartalmazó cDNS plazmiddal (GeneCopoeia). Az antibiotikum-szelekciót követően plazmidot izoláltunk, majd az ACE-gént tartalmazó pFastBac konstruktot DH10Bac kompetens *E. coli* törzsbe transzformáltuk bacmid készítése céljából. A bacmid DNS-t *SF9* (Invitrogen) rovarsejt kultúrába transzfektáltuk, melyben baculovírus generálódott. További *SF9* sejteket fertőztünk meg az így nyert baculovírusokkal. A fertőzést követő 4. napon az rovarsejteket lecentrifugáltuk (1 000 g, 10 perc, 4 °C) és a pelletet PBS-sel mostuk, hogy eltávolítsuk a tenyésztő folyadékot. A tiszta pelletet radioimmunoprecipitációs assay pufferben (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1% Triton X 100, 0,1% SDS, 1% deoxikolát; RIPA puffer) szonikátorral homogenizáltuk (Bandelin Electronic). 10 perces 15 000 g erővel 4°C-on történő centrifugálást követően a felülúszót leszívtuk, majd anion-cserélő oszlopra (Knauer, Biofox Q) injektáltuk 15 mM NaCl-ot tartalmazó 25 mM-os 8,2-es pH-jú HEPES pufferben (6. A ábra). Az ACE-t 168 mM-ról 540 mM-ra lineárisan emelkedő koncentrációjú NaCl-oldattal eluáltuk az oszlopról. Az eluátumokat 300 µl-es frakciókban gyűjtöttük, az ACE-csúcsot pedig ACE-aktivitásméréssel határoztuk meg. A legalább 50 U/l aktivitással rendelkező frakciókat összegyűjtöttük (vonalkázott rész a 6. A ábrán). A rekombináns ACE farmakológiai tulajdonságait összehasonlítottuk a szérum ACE-jével. Nem találtunk különbséget a szérum- és a rekombináns ACE-aktivitás (FAPGG szubsztrátot használva) captoprilrel történő gátolhatóságában (6. B ábra).

Az ACE molekuláris interakcióinak vizsgálata

ACE keresztkötése a szérumban

Az ACE molekuláris interakcióit keresztkötő ágensekkel stabilizáltuk. Elsőként a szérumban létrejövő kölcsönhatásokat tanulmányoztuk. 25 mM-os HEPES pufferben (pH=7,2) 4-szeresére hígított szérum mintákhoz növekvő mennyiségben succinimidil-[(*N*-maleimidopropionamido)-dodekaetileneglikol]-észtert (SM(PEG)₁₂, Thermo Scientific) és succinimidil-[(*N*-

maleimidopropionamido)-hexaetilenglicol]-észtert (SM(PEG)₆, Thermo Scientific) adtunk (16. ábra, +: 1,25 mM, ++: 2,5 mM, +++: 5 mM).



A keveréket szobahőmérsékleten inkubáltuk 60 percig, majd az el nem reagált funkciós csoportokat 50 mM TRIS-sel blokkoltuk 30 percig szobahőmérsékleten. Ezt követően immunprecipitáltuk az ACE-t a hozzá kötött fehérjékkel. Biotinilált humán ACE elleni antitestet (R&D Systems, 22,6 ng/ml) vagy kecske IgG-t (22,6 ng/ml, kontroll) valamint immobilizált streptavidint tartalmazó gyantát (Pierce) adtunk az elegyhez, hogy a keresztkötött termékeket a gyanta felszínéhez kössük. Az elegyet egy éjen át inkubáltuk állandó kevergetés mellett, majd

másnap ötször átmostuk a gyantát 7,2-es pH-jú 25 mM HEPES pufferrel. Ezt követően 10 percig főztük a gyantát kétszeres SDS mintapufferben (Sigma-Aldrich). A mintákat 5-15%-os gradiens géltre vittük fel (Mini-Protean TGX precast Gel, Bio-Rad Laboratories), majd a gélelektroforézist és a blottolást követően a membránon lévő ACE-t 1 000-szeresen hígított, kecskében termeltetett humán ACE-ellenes antitesttel jelöltük (R&D Systems). A másodlagos antitest 40 000-szeresére hígított kecske-IgG-ellenes, peroxidázzal jelölt antitest volt. A blotot zöld színre érzékeny röntgen filmre (Primax Berlin) hívtuk elő Western Lightning Plus-ECL reagenssel (Perkin Elmer Life Sciences).

A szérum ACE és a tisztított HSA kölcsönhatásának vizsgálata

A szérum ACE és a tisztított HSA molekuláris interakcióit is vizsgáltuk. Elsőként egy 100 kDa-os szűrő segítségével eltávolítottuk a szérumból a 100 kDa-nál kisebb fehérjéket, majd 5 mM SM(PEG)₆-t adtunk a szűrt szérumhoz. A reakcióelegyek a fent említett komponenseken túl 24 mg/ml és 48 mg/ml HSA-t (16. ábrán + és ++-szal jelölve) is tartalmazott, a kontrollhoz nem adtunk HSA-t. A fent leírtak szerint elkészített blotot elsőként ACE-ellenes antitesttel hívtuk elő, majd a membrán „strippingelését” (20 perces inkubáció 65°C-on 1% SDS-t, 20 mM DL-ditiotreitolt (Sigma-Aldrich) és 62,5 mM TRIS-t tartalmazó oldatban, pH=7,5) követően 5 000-szeresen hígított biotinilált HSA ellenes antitesttel is előhívtuk.

A rekombináns ACE és a tisztított HSA keresztkötése

A rekombináns ACE és a tisztított HSA interakcióját ELISA lemezen is megvizsgáltuk. Elsőként PBS-ben hígított 1%-os HSA-t adtunk a lyukakhoz (300 µl/lyuk), amit egész éjszaka szobahőn inkubáltunk. Másnap ötször átmostuk a lyukakat, majd 625-625 µM SM(PEG)₆-t és SM(PEG)₁₂-t adtunk a lyukakhoz 30 percre. Alapos mosás után 100 µl 260 ng/ml rekombináns ACE-t adtunk a lyukakhoz 1 órára, majd mosás után a HSA-hoz kötött ACE-t vizualizáltuk (17. ábra).

ACE-általi bradikinin hasítás közvetlen mérése

A rekombináns ACE-t tartalmazó oldatot - mely 1 mM bradikinin (Sigma-Aldrich), 300 mM NaCl-ot tartalmazott 7,4-es pH-jú HEPES pufferben - 37°C-on inkubáltuk önmagában vagy 40 mg/ml HSA jelenlétében. 5 mM EDTA-t adtuk az elegyekhez, hogy leállítsuk az ACE által katalizált bradikinin hasítást. A keletkezett bradikinin peptidek mennyiségét HPLC segítségével mértük meg, miután átszűrtük a mintákat egy 10 kDa pórusméretű szűrőn. Az analízis reverz fázisú C18 oszlopon (Hypersil Gold, Thermo Scientific) történt, az A eluens 0,01% trifluoroacetát (TFA,

Sigma-Aldrich) oldat, míg a B eluens 0,01% TFA-t tartalmazó acetonitril (ACN, Sigma-Aldrich) oldat volt. Az bradikinin peptideket 18% ACN-ről 44,2% ACN-re növekvő grádiens elúciós profillal eluáltuk és diódasoros detektorral detektáltuk 230 nm-en. A peptidcsúcsok görbe alatti területe alapján kalibrációs görbe segítségével kiszámoltuk a peptidek mennyiségét, melyet az idő függvényében ábrázoltunk és egyenessel illesztettünk. A bradikinin átalakulás sebességét a háttérre korrigáltuk (rekombináns ACE és 1 μ M captopril) és összevetettük a HSA-t nem tartalmazó kontroll mintákkal.

Etikai engedély

Minden egyes kísérlet a Regionális- és Intézményi Kutatásetikai Bizottság (DEOEC REC/IEC: 2894-2008) és az Egészségügyi Tudományos Tanács engedélyével készült. A vizsgálatokba bevont betegek írásos, tájékozott beleegyezésüket adták adataik és mintáik felhasználásához.

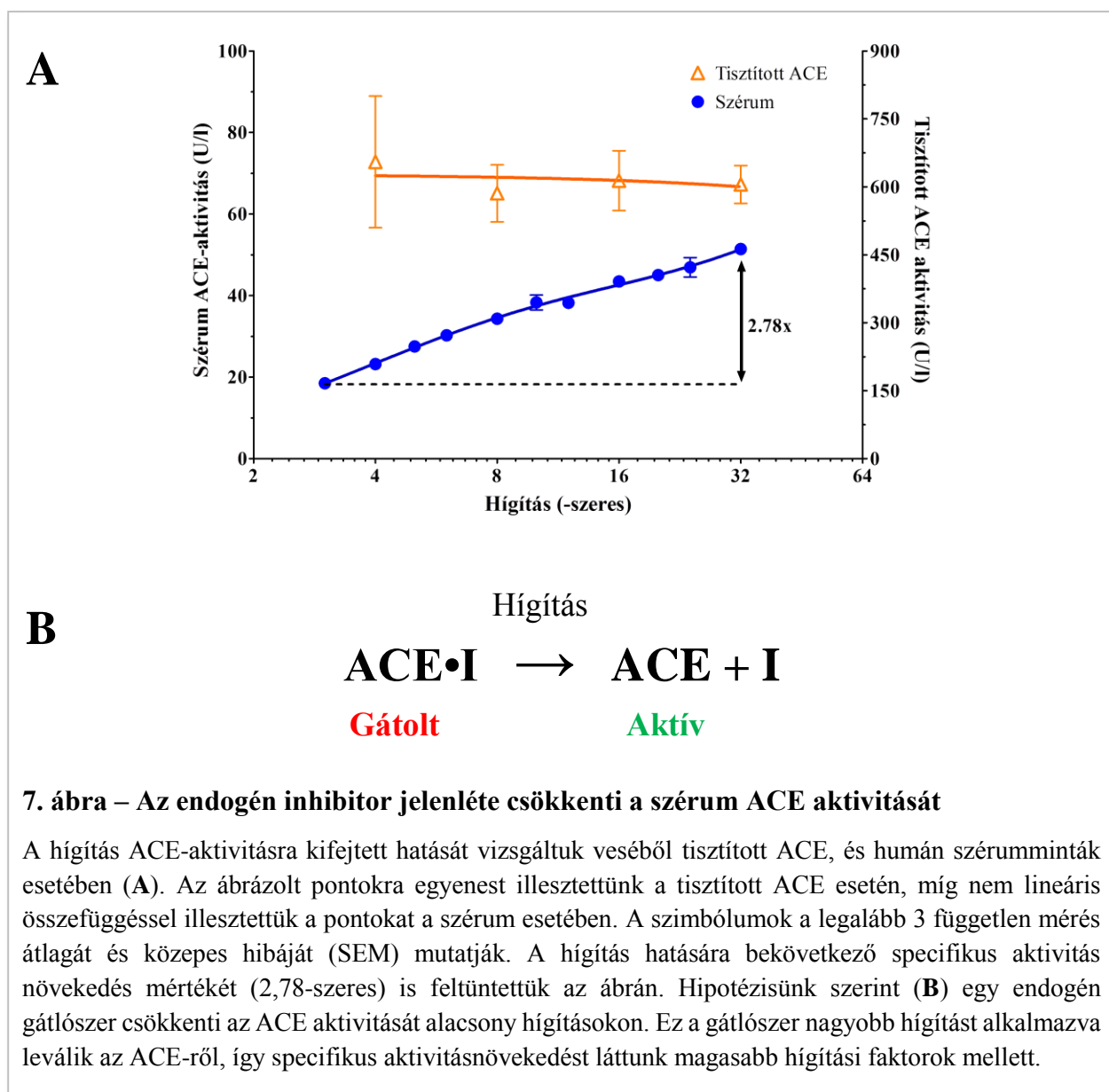
Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism 5.0 szoftverrel végeztük az alábbi próbák felhasználásával: páratlan t-teszt (9; 10. A,B,C; 11. A,B; 13. A,B, 14. C; 15; 20. B; 22. A; 24. B; 25. B ábra), páros t-teszt (18. A ábra) és egytényezős varianciaanalízis (3. ábra). Jelentős különbségnek a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

EREDMÉNYEK

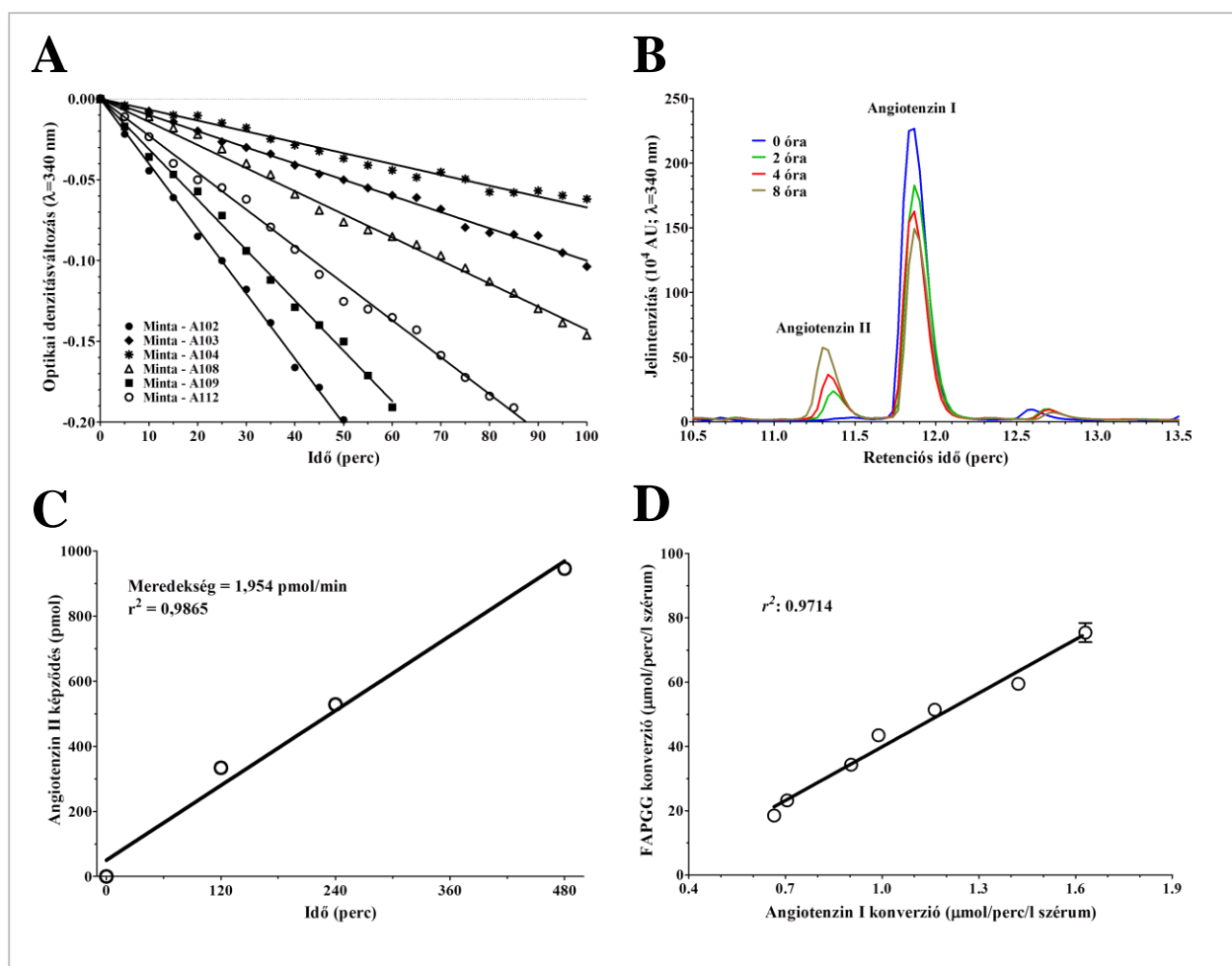
Az endogén ACE-gátló jelenlétének kimutatása

A szérumban ACE-aktivitásának mértéke jelentősen függ a mérés során alkalmazott hígítás mértékétől. Ezt szemlélteti a 7. A ábra, ahol a szérumban hígítással korrigált ACE-aktivitása 18,5 U/l-ről (3-szoros hígításban mérve) 51,4 U/l-re növekedett (32-szeres hígításban mérve). Ez az összefüggés azonban nem figyelhető meg amikor a tisztított szöveti ACE-aktivitását határozzuk meg különböző hígításokban. Ez azt sugallja, hogy a szérumban ACE-aktivitását egyéb tényezők is befolyásolják. Feltételezésünk szerint a megfigyelt jelenségért egy reverzibilis endogén gátlószer a felelős, mely a mintahígítás során leválik az ACE-molekuláról, így annak növeli a specifikus aktivitását (7. B ábra).



Az ACE-aktivitás mérés validálása

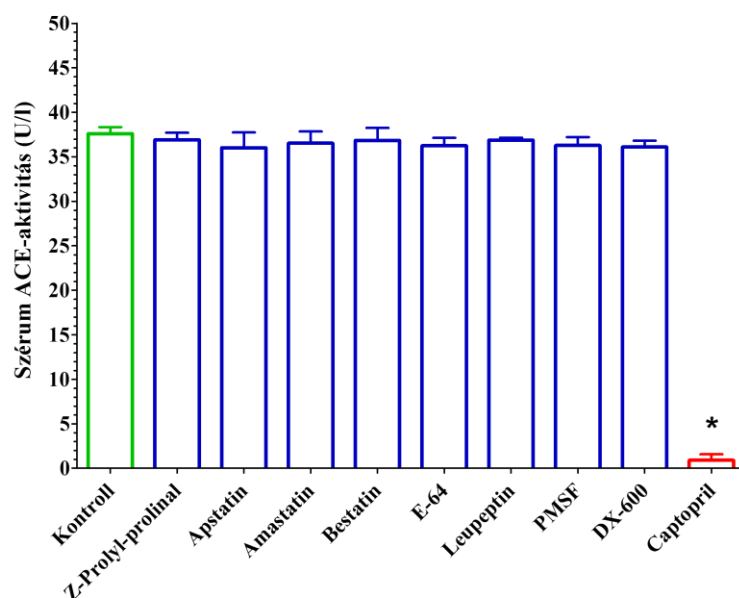
Az ACE hasítási sebességét hasonlítottuk össze mesterséges- (FAPGG, spektrofotometriás mérés, 8. A ábra) és természetes szubsztrát (angiotenzin I, HPLC, 8. B-C ábra) esetén *in vitro*, független kísérletekben. A FAPGG szubsztrát felhasználásával meghatározott ACE-aktivitás egyenesen arányos az angiotenzin I - II konverzió sebességével (8. D ábra), a FAPGG hasítás azonban nagyjából 30-szor gyorsabb és a mérés kivitelezése is könnyebb volt.



8. ábra - A FAPGG-hasítás sebessége egyenesen arányos az angiotenzin I átalakítás sebességével

Egy reprezentatív ACE-aktivitásmérés látható az A panelen. A FAPGG hasítása a 340 nm-en mért optikai denzitás (OD) csökkenését eredményezi. Ezt a csökkenést a reakcióidő függvényében ábrázoltuk (maximum 100 perc) és a pontokat egyenessel illesztettük. A egyenesek meredekségét használtuk fel az aktivitás kiszámításához, melyet minden minta esetében legalább háromszor meghatároztunk. Az ACE-aktivitást az ACE élettani szubsztrátjával, az angiotenzin I-gyel is meghatároztuk HPLC segítségével (reprezentatív kísérlet; B, C). A görbe alatti területek nagyságából (B) kalibrációs görbék segítségével kiszámoltuk a peptidek mennyiségét, melyet a reakcióidő függvényében ábrázoltunk (C). A pontokra illesztett egyenes meredekségét felhasználásával kiszámítottuk a minta ACE-aktivitását. Egy mintánál több párhuzamos mérést is végeztünk hogy összehasonlítsuk az ACE FAPGG- és angiotenzin I hasító aktivitását (D). A FAPGG-konvertáló aktivitást az angiotenzin I-konvertáló aktivitás függvényében ábrázoltuk és a pontokra egyenest illesztettünk. A pontok 3 független mérés átlagát és közepes hibáját mutatják, valamint feltüntettük az illeszkedés mértékét is (r^2).

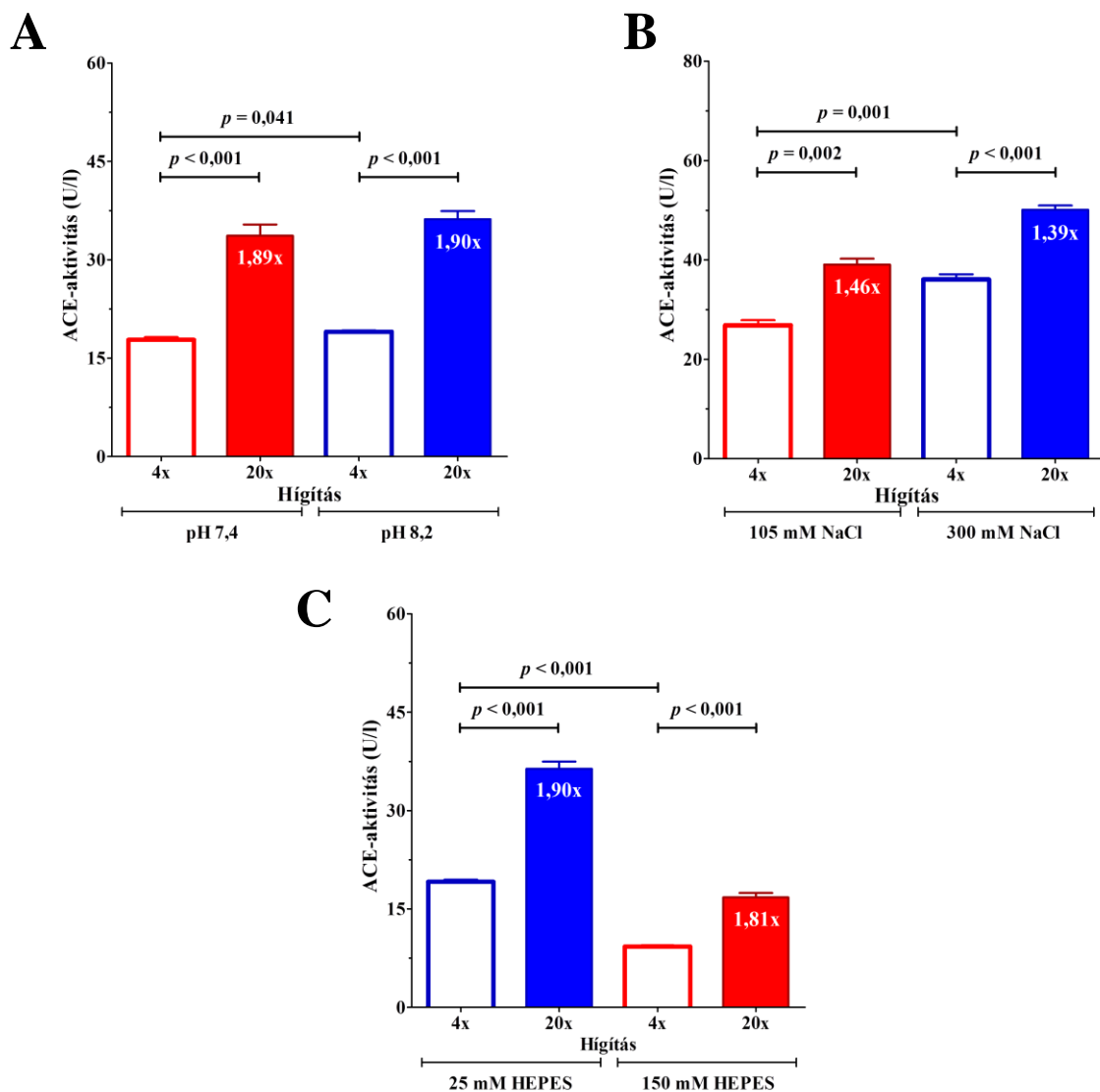
Az ACE-mediált FAPGG-hasítás specifikusságát vizsgáltuk különböző proteáz-inhibitorok segítségével (9. ábra). A z-prolyl-prolinal, apstatin, amastatin, bestatin, E-64, leupeptin, fenilmetánszulfonil-fluorid (PMSF) és a DX-600 proteáz-inhibitoroknak nem volt hatása a 8-szorosan hígított szérum ACE aktivitására. Ezzel szemben az ACE-gátló captopril 1 μ M-os koncentrációban jelentősen gátolta a szérum ACE-aktivitását (az enzimaktivitás $37,6 \pm 0,4$ U/l (kontroll) értékről $0,9 \pm 0,4$ U/l-re csökkent, 9. ábra).



9. ábra – Különböző proteáz-inhibitorok hatása a FAPGG ACE-mediált hasítására

8-szorosan hígított humán szérumot inkubáltunk z-prolyl-prolinal (prolyl-endopeptidáz-inhibitor, 1 μ M), apstatinnal (aminopeptidáz-P-inhibitor, 10 μ M), amastatinnal (aminopeptidáz-inhibitor, 10 μ M), bestatinnal (leucin-aminopeptidáz és aminopeptidáz-B-inhibitor, 1 μ M), E-64-gyel (cisztein-proteáz-inhibitor, 1 μ M), leupeptinnel (szerin- és cisztein-proteáz-inhibitor, 10 μ M), PMSF-fel (szerin- és cisztein-proteáz-inhibitor, 100 μ M), DX-600-zal (ACE-2 inhibitor, 1 μ M) és captoprillel (ACE-gátló, 1 μ M) 15 percig. Megmértük az elegyek ACE-aktivitását FAPGG szubsztráttal, majd a kapott értékeket oszlopdiaagramon ábráztuk abszolút egységekben (U/l). Az oszlopok 3 független mérés átlagát és közepes hibáját mutatják; a kontroll - gátlószeret nem tartalmazó elegy – aktivitásához képest jelentős mértékű különbséget csillaggal (*) jelöltük.

Különböző reakciókörülmények között vizsgáltuk a hígítás hatására bekövetkező ACE-aktivitás változást (10. ábra). Az aktivitásnövekedés megfigyelhető fiziológiás pH-n (aktivitásnövekedés pH 7,4-en 1,89-szeres, pH 8,2-en 1,90-szeres, 10. A) és fiziológiás Cl⁻ ion koncentráció mellett (a Cl⁻ ionok alapvető fontosságúak az ACE enzimaktivitásához; aktivitás növekedés 105 mM NaCl mellett: 1,46-szeres, 300 mM mellett 1,39-szeres, 10. B). Az ACE-aktivitásnövekedés nem függ a reakcióban használt puffer koncentrációjától (aktivitásnövekedés 25 mM HEPES használatakor: 1,90-szeres, 150 mM használatakor: 1,81-szeres, 10. C).

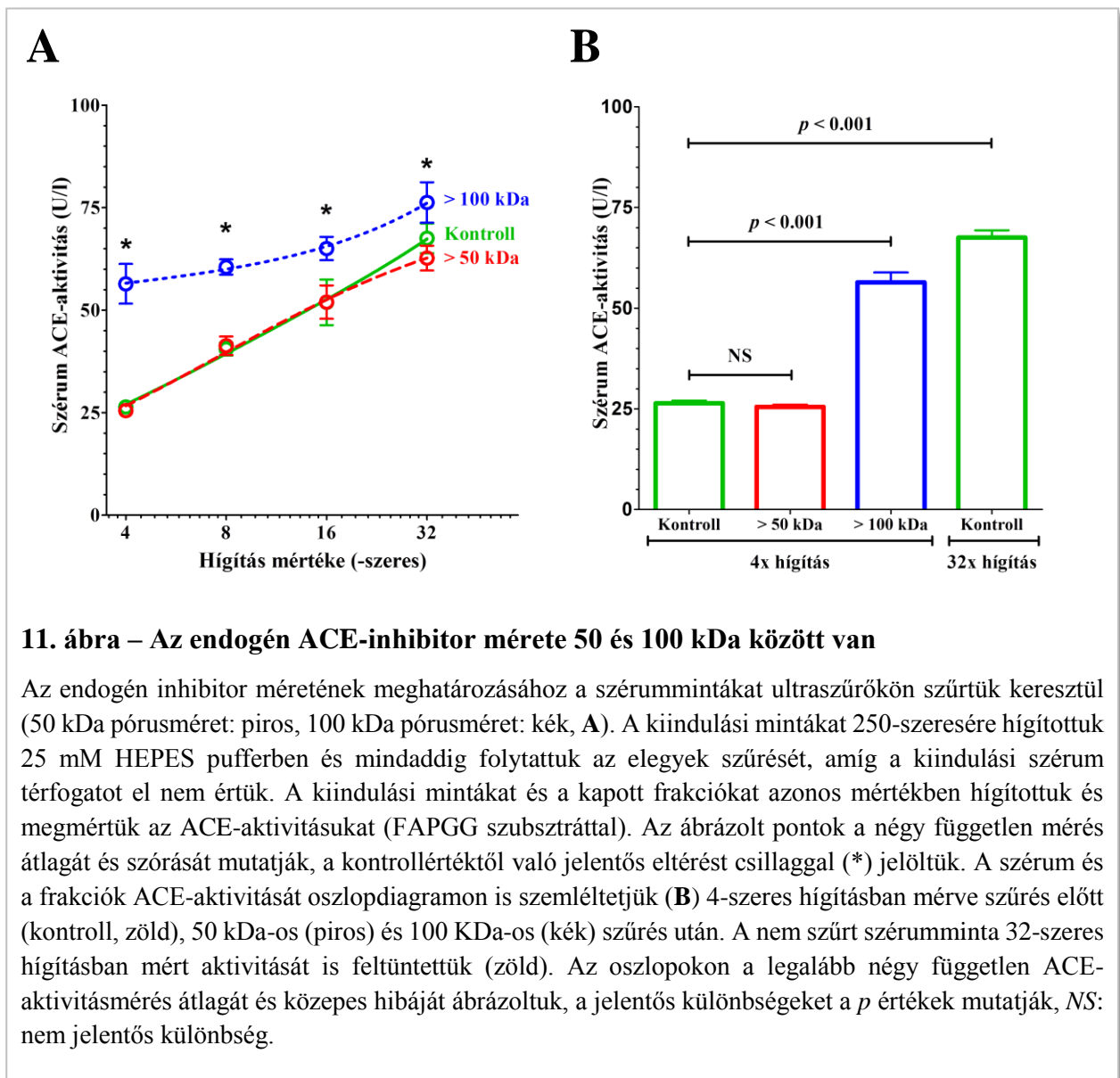


10. ábra – A pH-változás, az ionerősség és a pufferkoncentráció nem befolyásolja a hígítás hatására bekövetkező ACE-aktivitásnövekedést

A hígítás hatására (4- és 20-szoros hígítás) bekövetkező ACE-aktivitásnövekedést vizsgáltuk különböző reakciókörmények között. Az ACE-aktivitásnövekedés fiziológias pH-n (A), fiziológias Cl⁻ ion koncentráció mellett (B) és magasabb pufferkoncentráció használatakor (C) is megfigyelhető volt. A kék oszlopok a dolgozatban bemutatott egyéb kísérletek során is használt optimális reakciókörményeket mutatják. Az oszlopok legalább 3 független mérés átlagát és közepes hibáját mutatják. A jelentős különbségeket *p* érték mutatja. A specifikus aktivitásnövekedés mértéke minden oszloppárnál feltüntetésre került.

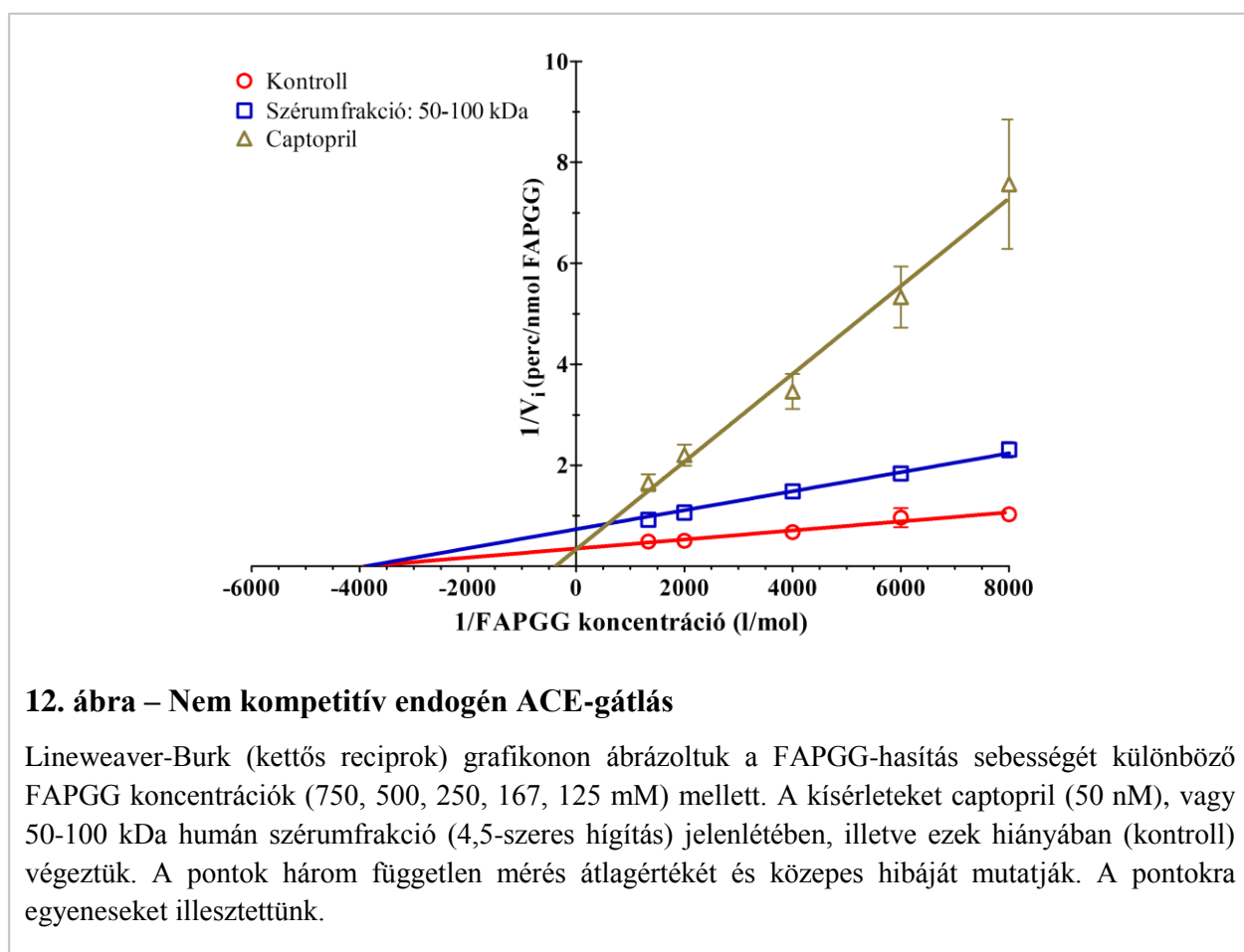
Az endogén ACE-gátlás jellemzése

Megkíséreltük igazolni az endogén inhibitor jelenlétét. Ennek érdekében különböző pórusméretű ultraszűrőkön szűrtük keresztül a szérummintákat. Az 50 kDa-nál kisebb molekulatömegű fehérjék és ionok eltávolítása nem volt hatással az ACE-aktivitásra, tehát az inhibitor látszólagos mérete nagyobb, mint 50 kDa (>50 kDa, 11. ábra). Ezzel szemben a 100 kDa alatti fehérjék eltávolítása után (>100 kDa) jelentősen növekedett az ACE-aktivitás és nagymértékben csökkent a hígítás hatására bekövetkező aktivitásnövekedés a kontrollhoz képest. A legkisebb (4-szeres) hígításban mért ACE-aktivitás 2,2-szer nagyobb volt a kontrollhoz képest azokban a szérummintákban, melyekből eltávolítottuk a 100 kDa-nál kisebb molekulákat (56,4±2,4 U/l vs. 26,4±0,7 U/l, $n=4$, $p<0,001$, 11. B ábra). Sőt, a 100 kDa-nál nagyobb molekulaméretű fehérjéket tartalmazó frakció 4-szeres hígításban mért ACE-aktivitása



hasonlónak adódott a kontrollminta 32-szeres hígításban mért specifikus aktivitásához, mely hígítás mellett az endogén inhibitor már leválik az ACE-ről (az értékek rendre: $56,4 \pm 2,4$ és $67,5 \pm 1,8$ U/l, $n=4$).

Az endogén gátlás típusát Lineweaver-Burk szerinti ábrázolásban készített grafikon segítségével határoztuk meg. Ehhez ACE aktivitást mértünk állandó inhibitor koncentrációk és különböző FAPGG szubsztrát-koncentrációk mellett (12. ábra). Az endogén gátlószert a kiindulási szérumhoz viszonyítva 4,5-szeres hígítású 50-100 kDa-os szérumfrakció tartalmazta, kontrollként az ACE-gátló gyógyszer, a captopril 50 nM-os végkoncentrációjú oldatát használtuk. A captopril esetében kompetitív gátlást mértünk (a captopril és a kontrollminta közös metszéspontja azonos az Y-tengelyen), míg az endogén gátlószert esetében nem-kompetitív gátlást (a szérumfrakció és a kontrollminta metszéspontja azonos az X-tengelyen) tapasztaltunk.

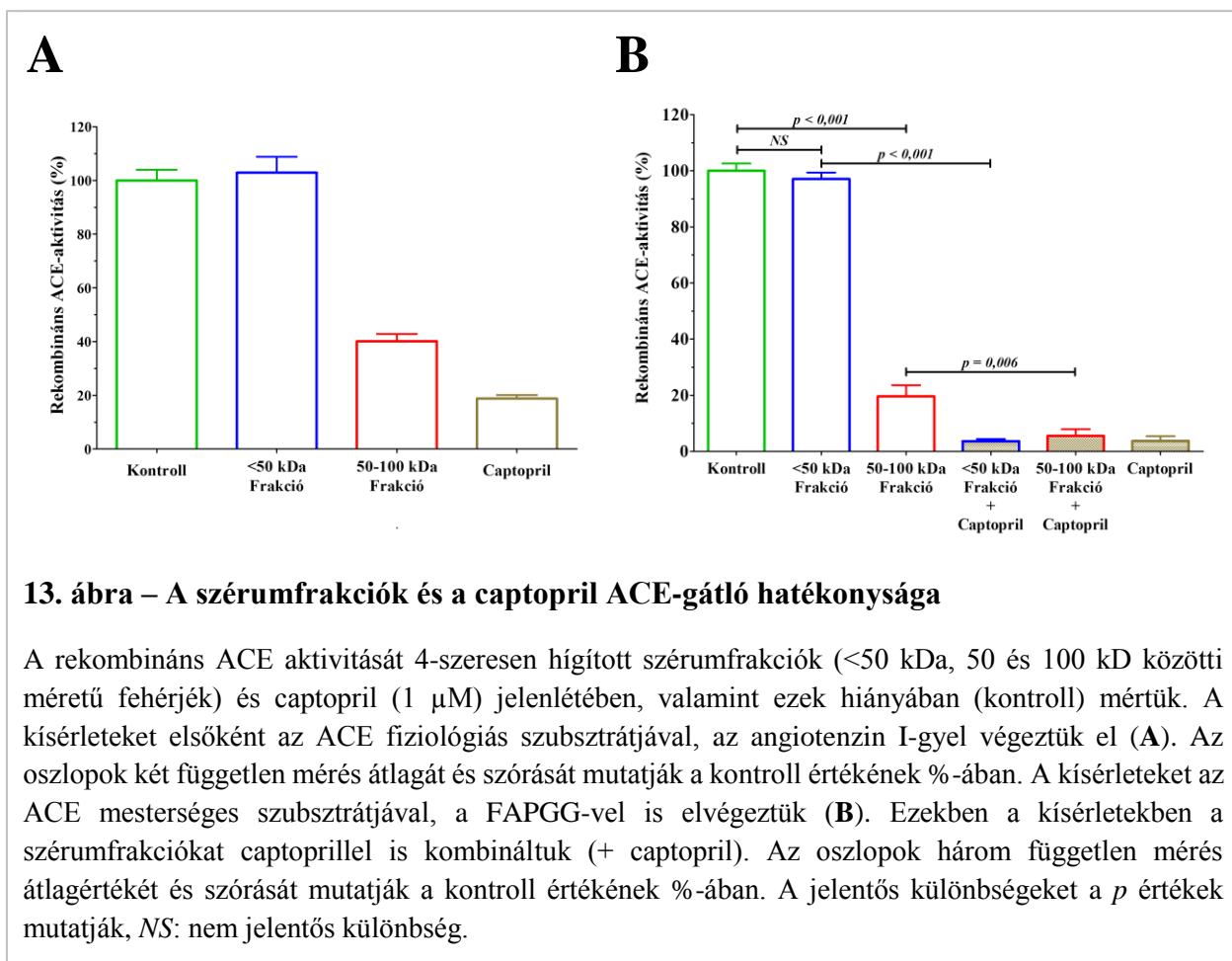


12. ábra – Nem kompetitív endogén ACE-gátlás

Lineweaver-Burk (kettős reciprok) grafikonon ábrázoltuk a FAPGG-hasítás sebességét különböző FAPGG koncentrációk (750, 500, 250, 167, 125 mM) mellett. A kísérleteket captopril (50 nM), vagy 50-100 kDa humán szérumfrakció (4,5-szeres hígítás) jelenlétében, illetve ezek hiányában (kontroll) végeztük. A pontok három független mérés átlagértékét és közepes hibáját mutatják. A pontokra egyeneseket illesztettünk.

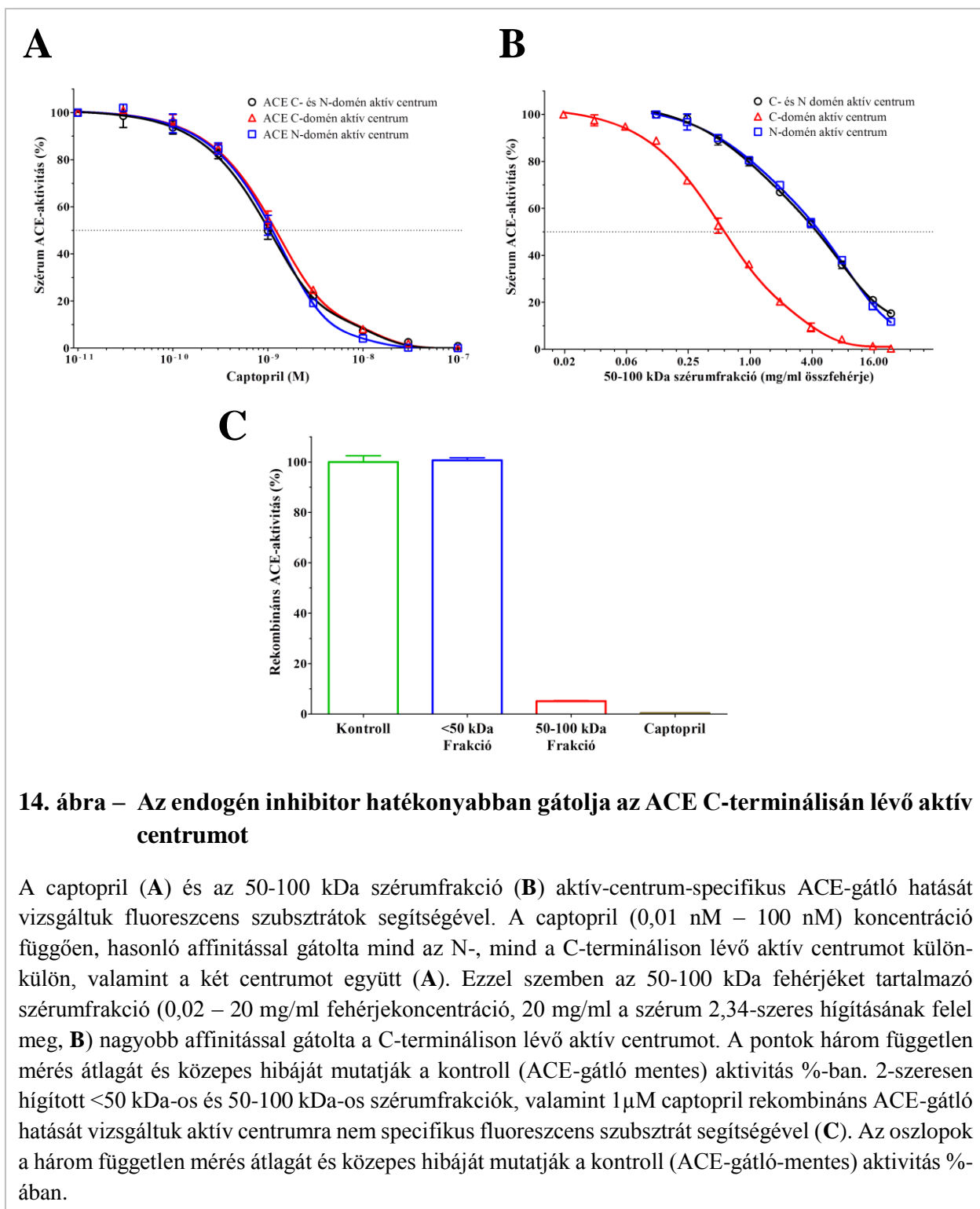
A captopril nagyobb mértékben volt képes gátolni a rekombináns ACE-mediált angiotenzin I – II konverziót, mint a 4-szeresen hígított endogén inhibitor tartalmazó szérumfrakció (50-100 kDa frakció) HPLC technikával mérve (13. ábra). Az 50 kDa-nál kisebb méretű fehérjéket tartalmazó szérumfrakciónak viszont nem volt kimutatható ACE-gátló hatása (<50 kDa, 13. A ábra). Ugyanezt az összefüggést figyelhettük meg a FAPGG hasításán alapuló

kísérletekben is (13. B ábra), sőt a captopril gátló hatását a <50 kDa és az 50-100 kDa méretű fehérjéket tartalmazó frakciók nem befolyásolták. A captopril és az endogén inhibitort tartalmazó frakció (50-100 kDa) együtt nagyobb mértékben gátolta az ACE-aktivitást, mint az 50-100 kDa frakció önmagában.



A szérumban található angiotenzin-konvertáló enzimnek két aktív centruma van. Ezen aktív centrumokra specifikus fluoreszcens szubsztrátok segítségével kimutattuk, hogy a captopril ugyanolyan hatékonyan gátolja mindkét katalitikus centrumot (14. A ábra). Ezzel szemben az endogén ACE-gátlószer hatékonyabban gátolta a C-terminális aktív centrumot, mint az N-terminális katalitikus centrumot (14. B ábra). Érdekes módon az endogén inhibitor esetében a nem aktív-centrum-specifikus fluoreszcens szubsztráttal mért (Abz-FRK(Dnp)P) aktivitás értéke hasonlóan adódott az N-terminálison lévő aktív centrumra specifikus szubsztráttal mért értékhez. A nem aktív-centrum-specifikus fluoreszcens szubsztráttal végzett mérés azt mutatta, hogy a rekombináns ACE-aktivitás is gátolható mind az endogén inhibitort tartalmazó szérumfrakcióval (50-100 kDa frakció), mind pedig captoprillel (14. C ábra). Ez összhangban van a FAPGG és az angiotenzin I ACE-mediált hasításakor megfigyelt gátlóhatással (13. ábra), mely azt igazolja, hogy a gátlóhatás nem szubsztrát-, hanem enzimspecifikus tulajdonság. Az 50 kDa-nál kisebb fehérjéket

tartalmazó szérumfrakciónak nem volt gátló hatása a nem aktív-centrum-specifikus fluoreszcens szubsztráttal mért rekombináns ACE-aktivitásra (14. C ábra), mint ahogyan az angiotenzin I és FAPGG hasítására sem (13. ábra).

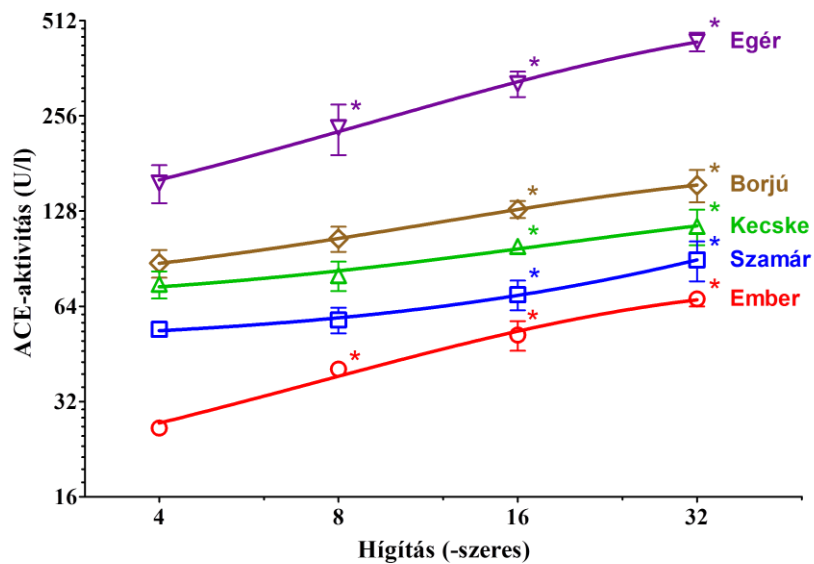


14. ábra – Az endogén inhibitor hatékonyabban gátolja az ACE C-terminálisán lévő aktív centrumot

A captopril (A) és az 50-100 kDa szérumfrakció (B) aktív-centrum-specifikus ACE-gátló hatását vizsgáltuk fluoreszcens szubsztrátok segítségével. A captopril (0,01 nM – 100 nM) koncentráció függően, hasonló affinitással gátolta mind az N-, mind a C-terminálison lévő aktív centrumot külön-külön, valamint a két centrumot együtt (A). Ezzel szemben az 50-100 kDa fehérjéket tartalmazó szérumfrakció (0,02 – 20 mg/ml fehérjekoncentráció, 20 mg/ml a szérum 2,34-szeres hígításának felel meg, B) nagyobb affinitással gátolta a C-terminálison lévő aktív centrumot. A pontok három független mérés átlagát és közepes hibáját mutatják a kontroll (ACE-gátló mentes) aktivitás %-ban. 2-szeresen hígított <50 kDa-os és 50-100 kDa-os szérumfrakciók, valamint 1 μ M captopril rekombináns ACE-gátló hatását vizsgáltuk aktív centrumra nem specifikus fluoreszcens szubsztrát segítségével (C). Az oszlopok a három független mérés átlagát és közepes hibáját mutatják a kontroll (ACE-gátló-mentes) aktivitás %-ában.

Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy az endogén inhibitor fehérje természetű és 50-100 kDa közötti molekulatömeggel rendelkezik. Megvizsgáltuk, hogy ez a gátlóhatás csak az emberekre jellemző vagy egy evolúciósan megőrzött tulajdonság. Egér, borjú, kecske és szamár

szérummintákat hasonlítottunk össze emberi szérummintával. Habár a szérumok ACE aktivitása jelentősen különbözött az egyes fajoknál ($26,4 \pm 0,7 - 157,2 \pm 12,5$ U/l-es tartományon belül) 4-szeres hígításban mérve, a hígítás hatására bekövetkező aktivitásnövekedés minden fajnál megfigyelhető volt (egér: 2,8-szeres; borjú: 1,8-szeres; kecske: 1,5-szeres; szamár: 1,7-szeres; ember: 2,6-szeres aktivitásnövekedés a minta 4-szeresről 32-szeresre történt hígításakor, 15. ábra).

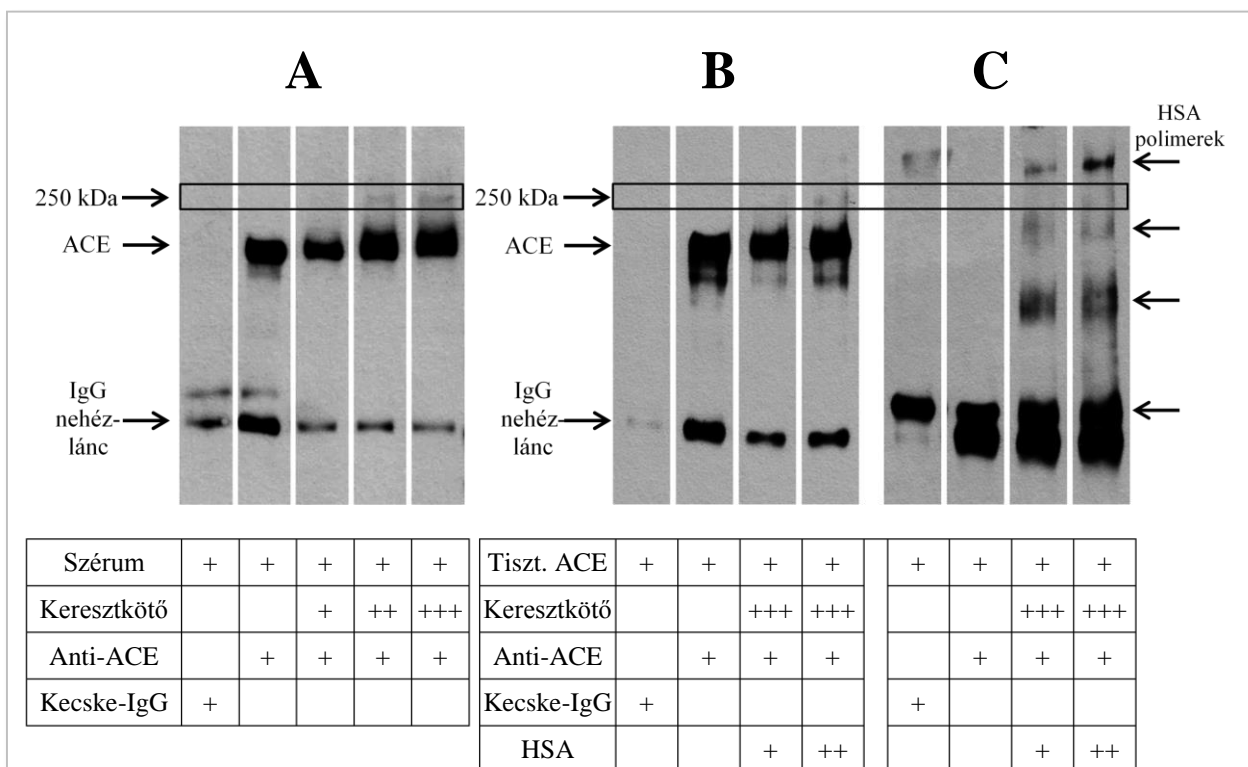


15. ábra – Az endogén szérum ACE-gátlás evolúciósan megőrzött tulajdonság

A hígítás hatására bekövetkező ACE aktivitásnövekedést vizsgáltuk különböző állatfajoknál. A specifikus aktivitást a szérumhígítás mértékében ábrázoltuk. A pontok legalább három független mérés átlagértékét és közepes hibáját mutatják. A 4-szeres hígításban mért ACE-aktiváshoz viszonyítva jelentős különbségeket csillaggal (*) jelöltük.

Az endogén ACE-gátló azonosítása és hatásai a szérum ACE-ra

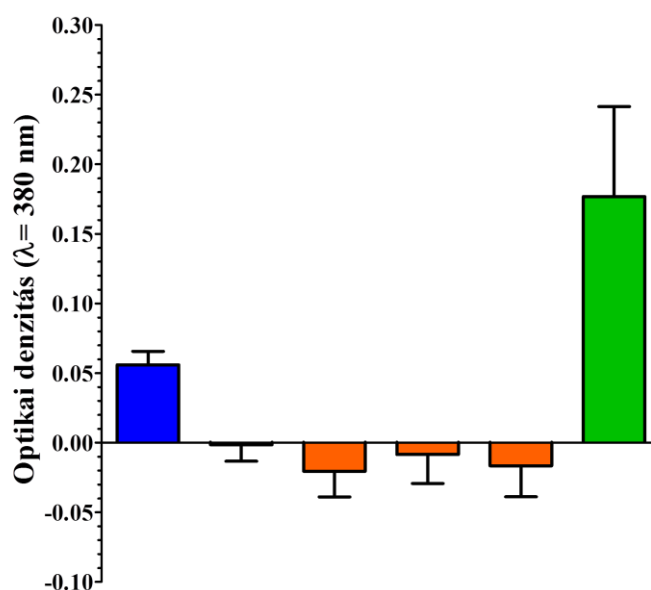
Az ACE és a feltételezett endogén inhibitor közötti kapcsolatot keresztkötő ágensek segítségével amino- és karboxil-csoportok között stabilizáltuk (a keresztkötő ágens által átért távolság: 5,3 nm). Ezt követően az ACE-t tartalmazó fehérje-komplexet immunprecipitáltuk, majd Western-blottal ACE-ellenes antitesttel láthatóvá tettük (16. ábra). Az ACE-t tartalmazó 180 kDa-os sáv felett egy plusz sáv jelent meg 250 kDa körüli magasságban (A), ez alapján az ACE-val komplexben lévő fehérje mérete 70 kDa körül lehet. Ebben a molekulatartományban a legnagyobb mennyiségben jelenlévő szérum fehérje a humán szérumalbumin (HSA, 66 kDa). A HSA és az ACE közötti feltételezett kölcsönhatást ultraszűrési technikával tisztított ACE és HSA felhasználásával közvetlenül is megvizsgáltuk (16. B és C ábra). A 250 kDa körüli sávot ilyen körülmények között is sikerült kimutatni, mely pozitívan festődött mind ACE- (B), mind HSA- (C) ellenes antitesttel Western-blot analízis során.



16. ábra – A humán szérumalbumin keresztköthető a szérum ACE-val

A szérum fehérjéi között kialakuló kölcsönhatásokat keresztkötő ágensek segítségével stabilizáltuk, majd a fehérjéket immunprecipitáltuk (anti-ACE antitesttel) és Western-blot analízis segítségével ugyanezen ACE-ellenes antitest hozzáadásával tettük láthatóvá (A). A kísérletet tisztított ACE-val (>100 kDa szérumfrakció, Tiszt. ACE) és HSA elegyével is megismételtük, a keresztkötött fehérjéket ACE ellenes (B) majd HSA ellenes (C) antitesttel tettük láthatóvá. A különböző kísérletekben az egyes reagensek eltérő koncentrációját „+” jelek szimbolizálják. Az IgG-nehézlánc, az ACE, valamint a 250 kDa molekulaméretnek megfelelő tartomány a blot bal oldalán, a HSA polimerek pozíciója a blot jobb oldalán van feltüntetve.

A HSA és ACE közötti kapcsolatot ELISA technikával is igazoltuk. HSA-t, zselatint vagy ACE-specifikus antitestet immobilizáltunk ELISA-lemez aljára, majd keresztkötő ágensekkel (SM(PEG)₆ és SM(PEG)₁₂) kezeltük. A megfelelő lyukakba rekombináns ACE-t pipettáztunk, végezetül a keresztkötött komplexet ACE ellenes antitesttel mutattuk ki. (17. ábra). A kontroll kísérletekben blokkoltuk, vagy kihagytuk a keresztkötő ágenszt. Jelentős mennyiségű HSA-hoz keresztkötött ACE-t mutattunk ki sikeres keresztkötést követően (1. oszlop), míg a blokkoló ágens alkalmazásakor, vagy a keresztkötő ágens hiányában az ACE kötődése a HSA felszínéhez nem volt kimutatható (2. és 3. oszlop). Az ACE-t nem lehetett keresztkötni zselatinhoz (4. és 5. oszlop). Végezetül immobilizált anti-ACE antitest segítségével megbecsültük a felszín maximális ACE-kötő képességét (6. oszlop).

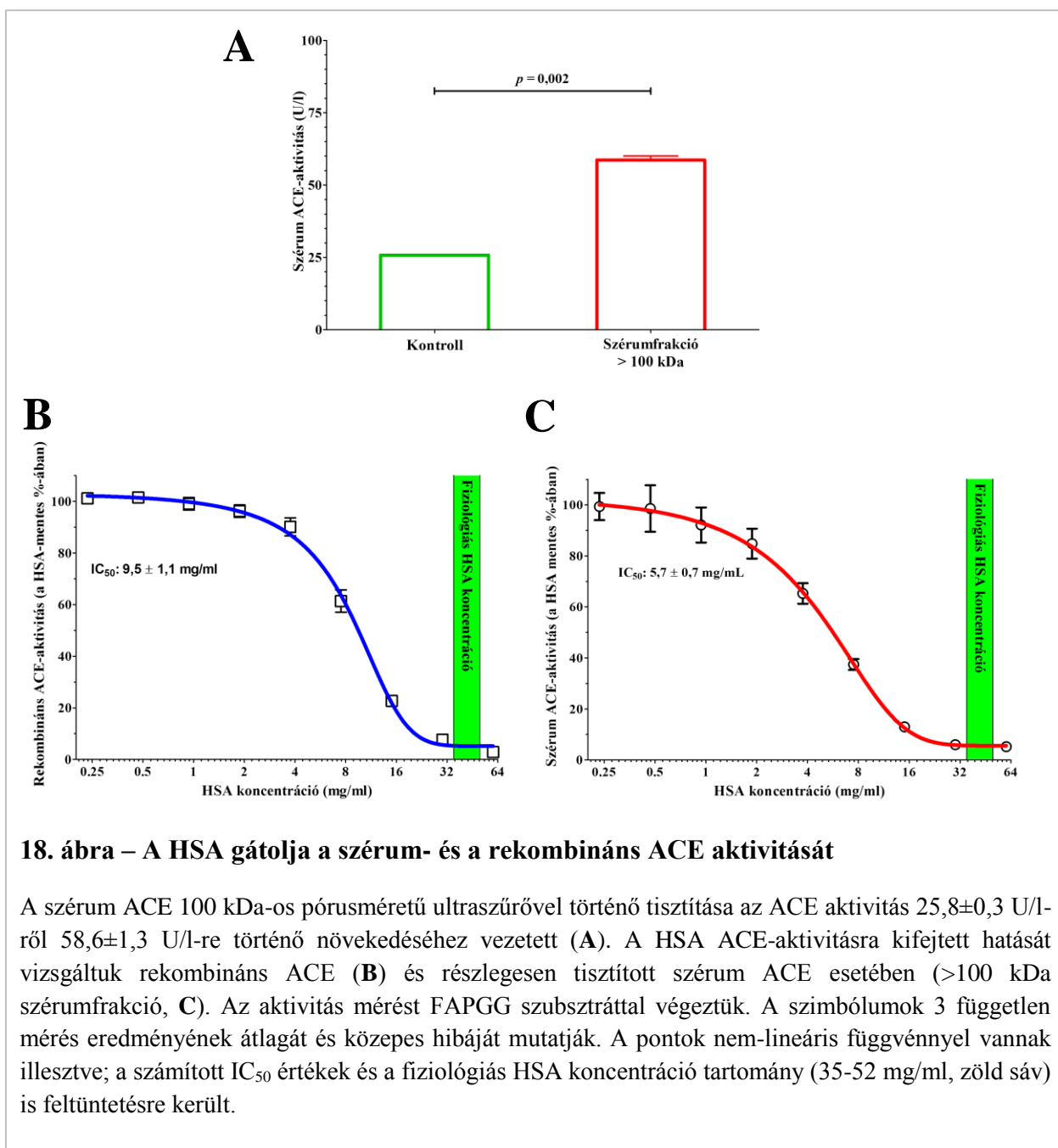


Kötő-partner	Rekombináns ACE	+	+	+	+	+	+
	Keresztkötő	+++	+++		+++	+++	
	Blokkoló ágens		+			+	
Immobilizált fehérje	Anti-ACE						+
	Zselyatin				+	+	
	HSA	+	+	+			+

17. ábra – A HSA keresztköthető a rekombináns ACE-val ELISA-lemez felszínén

A HSA és ACE között kialakuló kapcsolatot tovább vizsgáltuk ELISA technika segítségével. 96-lyukú ELISA-lemezre HSA-t, zselatint, vagy ACE-ellenes antitestet immobilizáltunk, majd esetenként az immobilizált fehérjéket keresztkötő reagenssel kezeltük. Az így kialakult komplexhez rekombináns ACE-t adtunk végezetül kimutattuk a felszínhez kötött ACE jelenlétét. Az oszlopok négy, triplikátumban végzett független kísérlet átlagát és közepes hibáját mutatják.

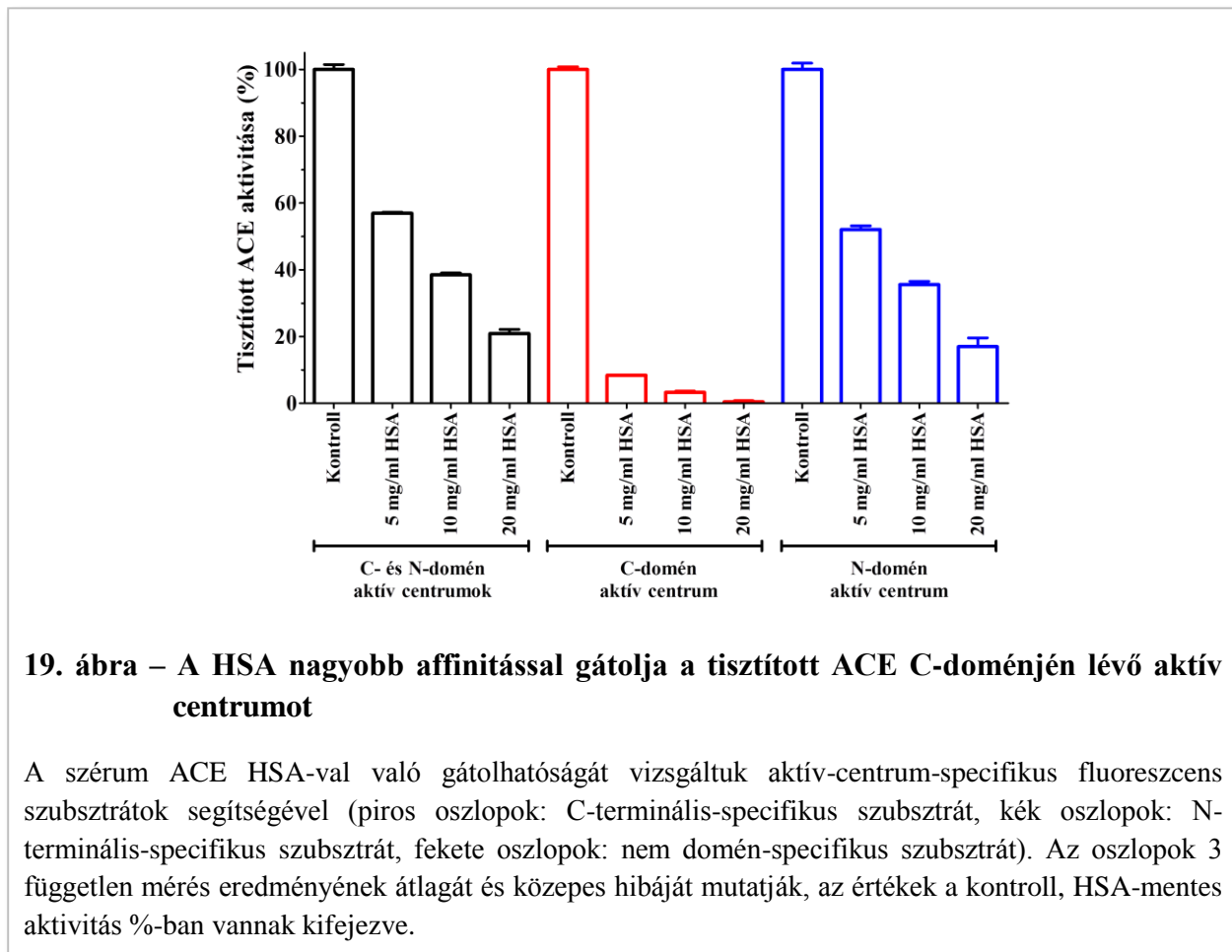
A HSA lehetséges ACE-gátló hatását rekombináns és szérumból részlegesen tisztított ACE-n is vizsgáltuk. A szérum ACE elválasztása a humán szérumalbumintól (100 kDa-os pórusméretű ultraszűrő segítségével) az ACE-aktivitásnövekedéséhez vezetett (18. A ábra az aktivitásértékeket mutatja a legkisebb hígításban). A humán szérumalbumin mind a rekombináns (B), mind a részlegesen tisztított szérum ACE-aktivitását (C) képes dózis-függő módon gátolni; a fél-maximális gátlószer koncentrációk rendre $9,51 \pm 1,1$ és $5,7 \pm 0,7$ mg/ml voltak.



Az ACE-gátlók leggyakoribb klinikai mellékhatása a köhögés, melyet a legelfogadottabb elmélet szerint a megemelkedett bradikinin szint okoz. 40 mg/ml HSA hatását (a FAPGG hasításakor ez a telítő koncentráció, 18. ábra) vizsgáltuk a rekombináns ACE-mediált bradikinin

bontására. A HSA csupán részlegesen gátolta a bradikinin lebontását (a gátolt aktivitás $70,4 \pm 11,4\%$ -a a kontrollnak).

Az ACE két aktív centrumának kissé eltérő a szubsztrát specificitása. Katalitikus doménre specifikus fluoreszcens szubsztrátok segítségével megvizsgáltuk a HSA gátlóhatását az aktív centrumokon. A HSA nagyobb hatékonysággal képes gátolni az ACE C-doménjén található aktív centrumot, mint az N-doménen lévő (19. ábra).

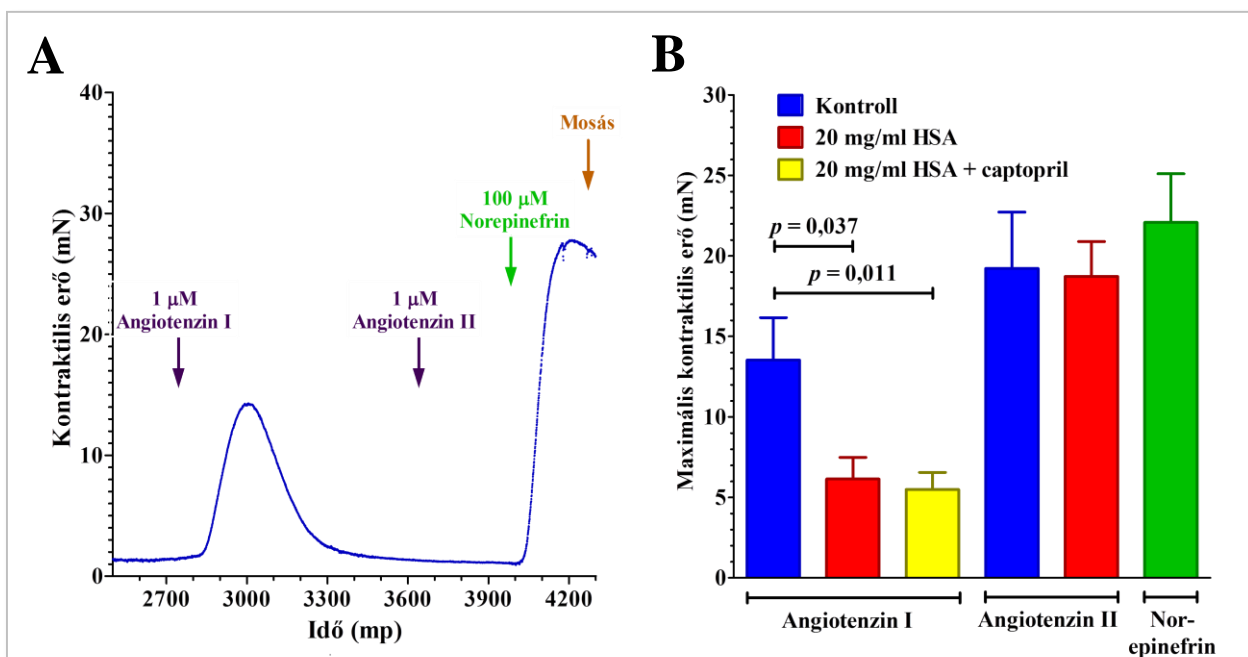


19. ábra – A HSA nagyobb affinitással gátolja a tisztított ACE C-doménjén lévő aktív centrumot

A szérum ACE HSA-val való gátolhatóságát vizsgáltuk aktív-centrum-specifikus fluoreszcens szubsztrátok segítségével (piros oszlopok: C-terminális-specifikus szubsztrát, kék oszlopok: N-terminális-specifikus szubsztrát, fekete oszlopok: nem domén-specifikus szubsztrát). Az oszlopok 3 független mérés eredményének átlagát és közepes hibáját mutatják, az értékek a kontroll, HSA-mentes aktivitás %-ban vannak kifejezve.

A HSA angiotenzin-mediált vaszkuláris válaszokra gyakorolt hatása

A HSA ACE-gátló hatását vaszkuláris preparátumokon, membrán-kötött ACE esetében is vizsgáltuk (humán vena saphena, reprezentatív kísérlet: 20. A ábra, statisztika: 20. B ábra). Angiotenzin I-et vagy angiotenzin II-t adtunk az erekhez 20 mg/ml HSA jelenlétében vagy hiányában (kontroll). A 20 mg/ml HSA és a 10 μ M captopril együttes hatását is megvizsgáltuk az angiotenzin I mediált érösszehúzódsra. Nem találtunk jelentős különbséget az angiotenzin I vagy II által kiváltott maximális kontrakciós erő tekintetében a HSA mentes körülmények között (rendre: $13,5 \pm 2,6$ mN, $n=7$ és $19,2 \pm 3,5$ mN, $n=7$, 20. B ábra). Az angiotenzin I által kiváltott maximális kontrakció mértéke $6,1 \pm 1,3$ mN-ra ($n=6$, $p=0,037$) csökkent, míg az angiotenzin II-mediált összehúzóds erejét nem befolyásolta a HSA jelenléte ($18,7 \pm 2,2$ mN, $n=7$, 20. B ábra). A captopril hozzáadása a 20 mg/ml HSA-hoz nem befolyásolta jelentősen az angiotenzin I válasz nagyságát a 20 mg/ml HSA hatásához képest ($5,5 \pm 1,1$ mN, $n=8$, 20. B ábra).

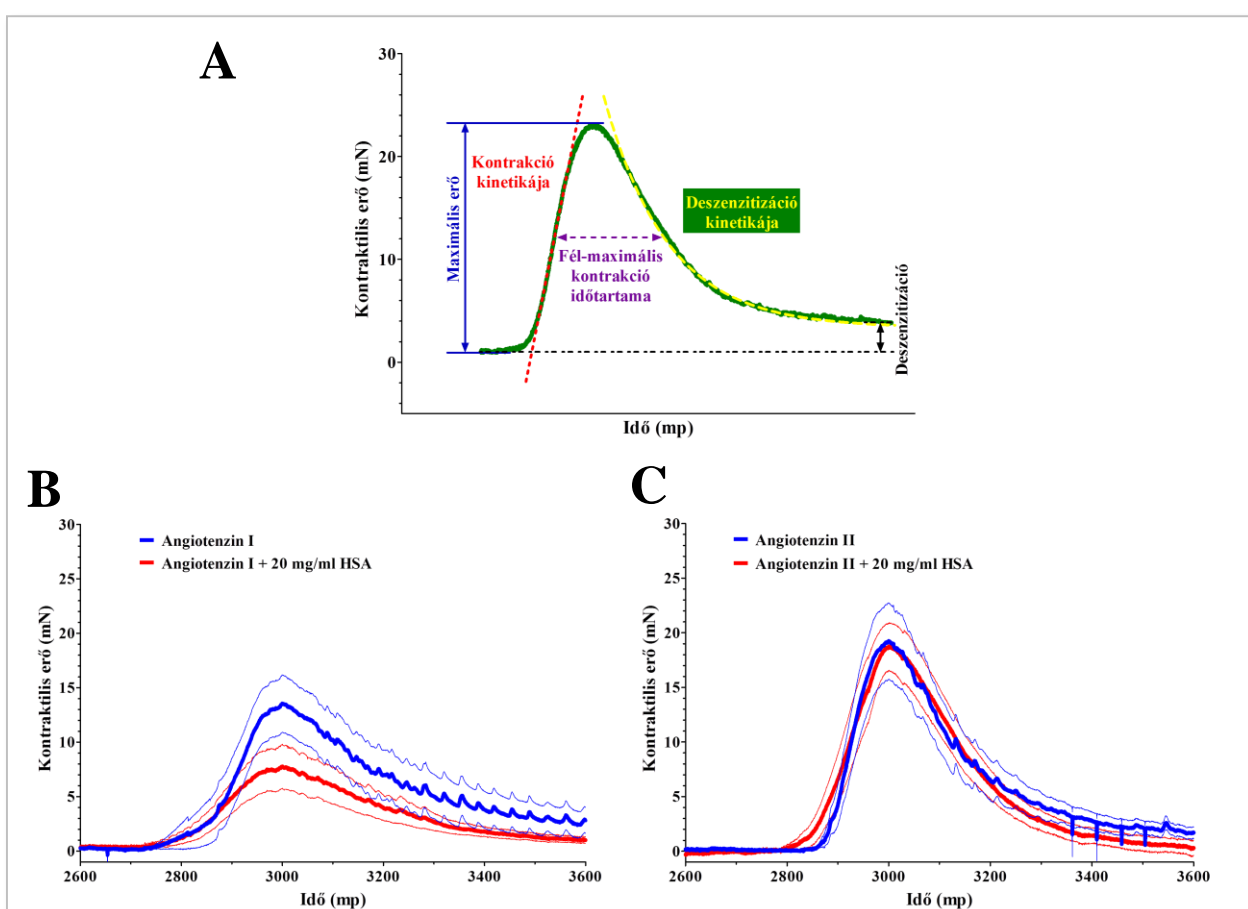


20. ábra - A HSA gátolja az erekben a membrán-kötött ACE-t

A humán vena saphena gyűrűket izometrikus kontraktilis erőmérő rendszerre helyeztünk fel, majd 1 μ M angiotenzin peptiddel kezeltük őket (A ábrán angiotenzin I-gyel). Az érgyűrű kezdetben kontrahált (a kontraktilis erő növekedett), majd kis idő múlva relaxált az angiotenzin peptid folyamatos jelenléte mellett. A kísérlet végén 1 μ M angiotenzin II-t adtunk az érhez a deszenzitizáció igazolása végett, majd leellenőriztük az ér viabilitását 100 μ M norepinefrin hozzáadásával. Az A ábrán egy reprezentatív kísérlet látható, melyen az erőt 0,5 mp-ként rögzítettük. A HSA hatását külön érgyűrűkön vizsgáltuk. A maximális kontraktilis erők átlagát és közepes hibáját ábrázoltuk az oszlopdiaagrammon (B), melyet angiotenzin peptidek 20 mg/ml HSA jelenlétében (piros) vagy hiányában (kék), vagy angiotenzin I + 20 mg/ml HSA + 10 μ M captopril (sárga), vagy a norepinefrin (zöld) jelenlétében generáltak. A jelentős különbségeket a p értékek mutatják.

Az angiotenzin peptidek által kiváltott vaszkuláris válaszok átmenetiek voltak, 10-15 perccel a peptidek hozzáadása után eltűntek, annak ellenére, hogy a peptidek folyamatosan jelen voltak (20. A ábra). Ez alatt az időszak alatt 1 μ M angiotenzin II már nem képes újabb összehúzódást kiváltani (komplett deszenzitizáció), míg a norepinefrin igen. A norepinefrinnel kiváltott maximális érösszehúzódás nagysága $22,1 \pm 3,0$ mN-nak adódott.

Az átmeneti, angiotenzin peptidek által kiváltott válaszokat részleteikben is vizsgáltuk (21. A ábra). Minden individuális mérési eredményt egymáshoz igazítottunk a maximális kontrakció pillanatában, majd a mért erőértékeket átlagoltuk mind az angiotenzin I- (21. B ábra), mind az angiotenzin II-mediált (21. C ábra) válaszok esetében 20 mg/ml HSA jelenlétében (piros) vagy

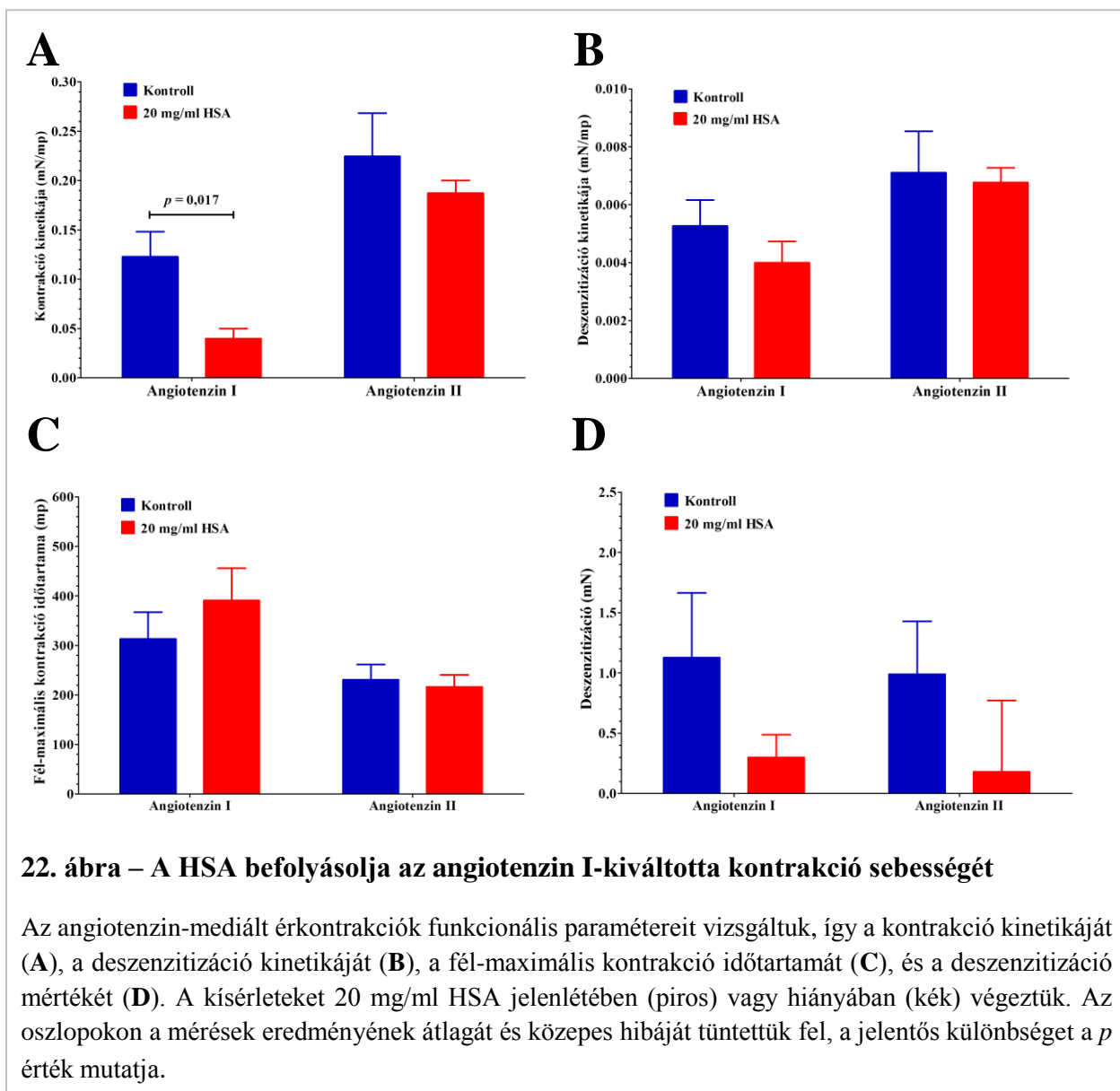


21. ábra – A HSA lassítja és gátolja az angiotenzin I által kiváltott érösszehúzódást vena saphena mintákon

Az angiotenzin peptidek által kiváltott átmeneti kontrakció néhány paraméterét részletesen vizsgáltuk: a maximális erőt, a kontrakció kinetikáját, a fél-maximális kontrakció időtartamát, a deszenzitizáció kinetikáját és a deszenzitizáció mértékét (A). Az angiotenzin I- (B) és angiotenzin II-mediált (C) válaszokat 20 betegtől származó 35 érszegmensen vizsgáltuk 20 mg/ml HSA jelenlétében (piros) vagy hiányában (kék). A rögzített adatokat a maximális válaszok pillanatában egymáshoz igazítottuk, majd az egyes időpontokban mért erők nagyságát átlagoltuk és a közepes hibával együtt ábrázoltuk (vastag vonalak: átlagok, vékony vonalak: átlagok közepes hibái, B és C ábra).

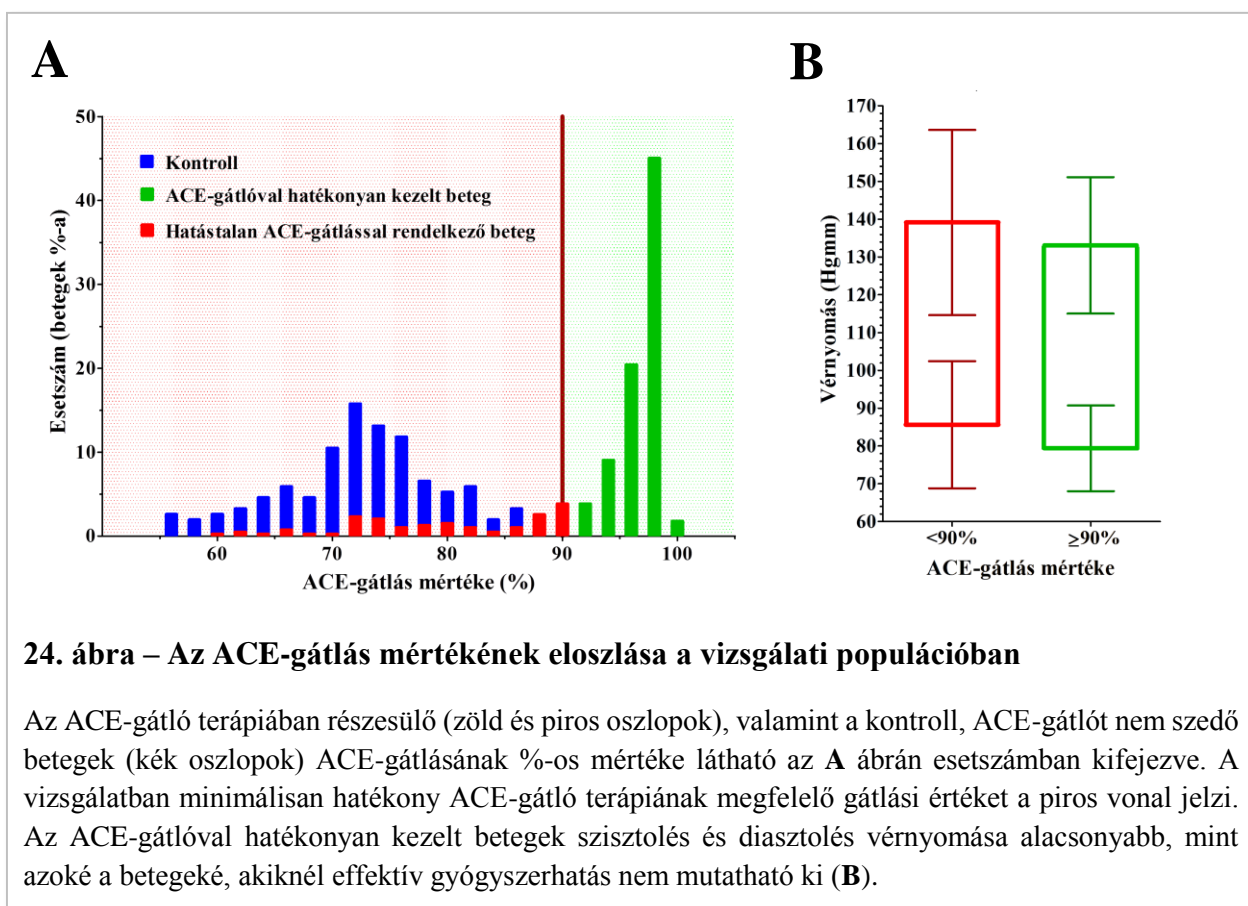
hiányában (kék). Nem láttunk jelentős különbséget az angiotenzin II-kiváltotta válaszokban, míg a HSA jelenléte jelentősen befolyásolta az angiotenzin I-mediált kontrakciót.

A szemmel látható különbségek miatt az angiotenzin peptidek által kiváltott átmeneti kontrakció néhány paraméterét részletesen is vizsgáltuk minden egyes mérés esetében, így a kontrakció kinetikáját, a fél-maximális kontrakció időtartamát, a deszenzitizáció kinetikáját, a deszenzitizáció mértékét is (22. ábra) a már említett maximális erő nagysága mellett (20. B ábra).



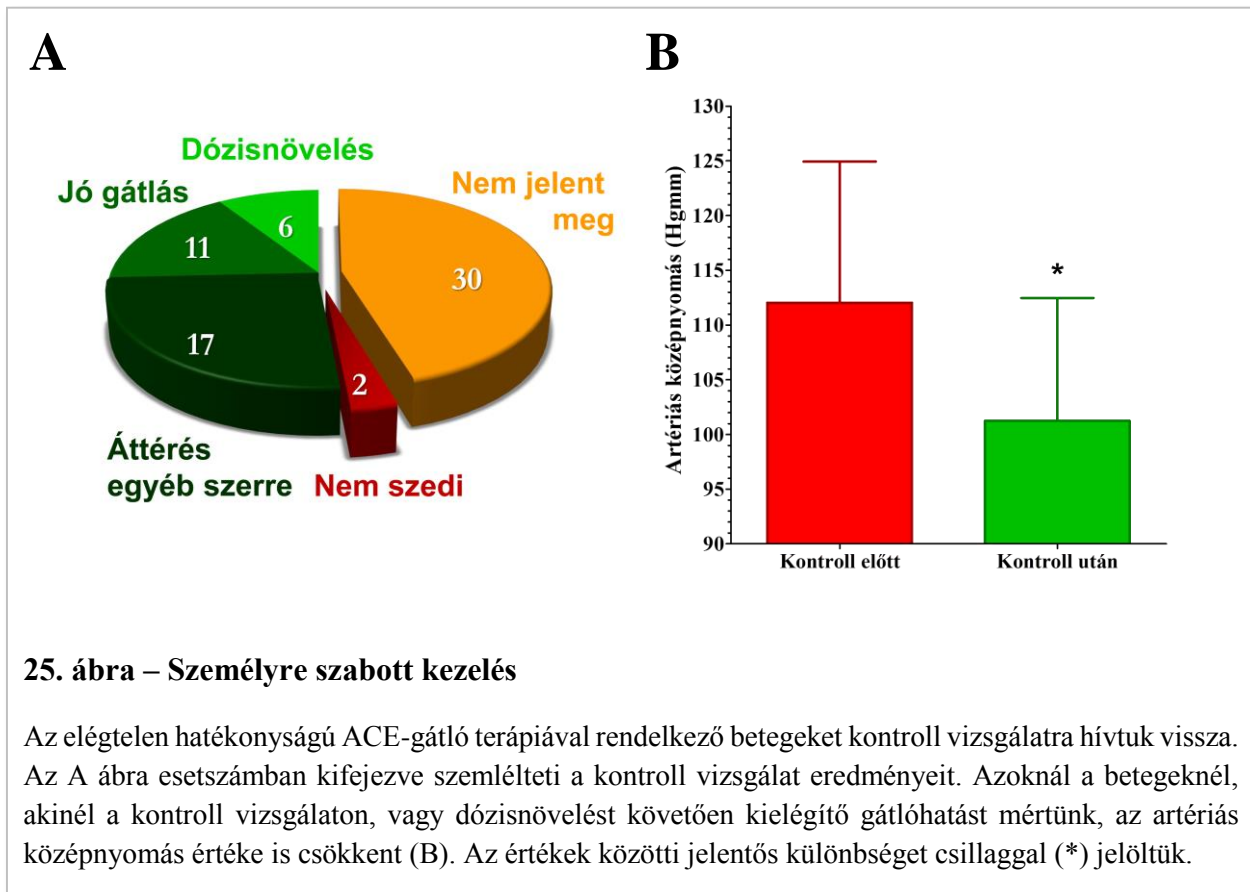
Az angiotenzin I-mediált kontrakció kinetikája körülbelül háromszor lassabb volt a HSA jelenlétében ($40 \pm 10 \mu\text{N}/\text{mp}$, $n=6$), mint hiányában ($123 \pm 30 \mu\text{N}/\text{mp}$, $n=7$, $p=0,017$, 22. A. ábra). Ezzel ellentétben a HSA jelenléte nem befolyásolta jelentősen az angiotenzin I által kiváltott kontrakció deszenzitizációjának kinetikáját (22. B ábra), a fél-maximális kontrakció időtartamát (22. C ábra) és a deszenzitizáció mértékét (22. D ábra). A HSA nem gyakorolt jelentős hatást az angiotenzin II-mediált válaszok nagyságára és kinetikájára sem (22. A-D ábra).

80,5±13 Hgmm értéknek, míg a kontroll, ACE-gátlót nem szedő betegek vérnyomásértéke 131,9±17 / 80,5±10 Hgmm-nek adódott. Minden egyes beteg esetében meghatároztuk az ACE-gátlás mértékét (24. A ábra), mely kontroll esetében 56 és 86% közötti tartományban, ACE-gátlót szedő betegeknél pedig 60 és 100 % közötti tartományban mozgott. A kontroll, ACE-gátlót nem szedő betegek ACE-gátlásáért a HSA felelős. Szembetűnő, hogy az ACE-gátlót szedő betegek között vannak olyan betegek is, akik ACE-gátlása a kontrolléval egyező mértékű (<90%). Ezeknél a betegeknél tehát effektív gyógyszerhatás nem mutatható ki (n=66), valamint lényegesen magasabb vérnyomásértékekkel is rendelkeznek (139,3±25 / 85,6±17 Hgmm, n=66), mint az ACE-gátlóval hatékonyan kezelt betegek (133,3±18 / 79,4±11 Hgmm, n=318, p=0,021, 24. B ábra).



Az elégtelen ACE-gátlóhatással rendelkező 66 kiszűrt beteget visszahívtuk egy kontroll vizsgálatra, és megkértük őket a gyógyszer előírás szerinti szedésére. 30 beteg az előzetes ígéretével szemben nem jelent meg a kontroll vizsgálaton. 11 beteg esetében már kielégítő gátlóhatást mértünk, míg 6 betegnél a kezelőorvos dóziszemelést tartott indokoltnak az ismételt mért alacsony gátlóhatás miatt. A dóziszemelést követően ezek a betegek is elérték a kívánt gátlóhatást. 17 beteg elmondta, hogy köhögés miatt nem szedte a gyógyszerét, őket más típusú vérnyomáscsökkentőre állítottuk. 2 beteg pedig elzárkózott bármilyen gyógyszer szedésétől (25. A ábra).

Lényegesen csökkent annak a 17 betegnek a vérnyomása, akiknél a kontroll alkalmával, vagy a dózisznövelés után kielégítő (>90%-os) gátlóhatást mértünk (kontroll előtti artériás középnyomás: $112,0 \pm 13$ Hgmm, $n=17$; kontroll utáni artériás középnyomás: $101,3 \pm 11$ Hgmm, $n=17$, $p=0,0139$; 25. B ábra).



MEGBESZÉLÉS

A szérum ACE aktivitásának mértéke jelentősen függ a mérés során alkalmazott minta hígítási fokától. Minél nagyobb hígítást alkalmazunk, annál nagyobb a minta specifikus aktivitása. Ez a jelenség tisztított ACE aktivitásának mérésekor azonban nem figyelhető meg. Ennek két magyarázata lehet: (1) nem megfelelőek a mérések körülményei, (2) endogén, reverzibilis ACE-gátló jelenléte miatt tömény mintában az enzim aktivitása gátolva van, mely alól csak nagyobb hígítások esetén szabadul fel.

A FAPGG (mesterséges ACE szubsztrát) hasításának sebessége egyenesen arányos a természetes szubsztrát (angiotenzin I) hasításának sebességével különböző hígításokban mérve. A beállított aktivitásmérés kellően specifikus az ACE-ra, más típusú peptidáz inhibitorok-közül csak a captopril gátolta a FAPGG bontását. Az aktivitás *in vitro* mérése az emberi szervezetben előforduló körülményektől eltérő környezetben történik, ezért modelleztük a természetesen előforduló állapotok hatását az ACE aktivitására. A fiziológiás pH és Cl⁻ koncentráció nem befolyásolta a hígítás hatására bekövetkező specifikus aktivitás növekedését. Mindezeket összegezve, az aktivitásmérés körülményei optimálisnak bizonyultak, így az aktivitás fokozódása endogén ACE-gátló jelenlétére utal.

A szérumból ultraszűrőssel nyert frakciók közül csak az 50 és 100 kDa közötti mérettel rendelkező fehérjéket tartalmazó frakció mutatott ACE-gátló hatást, mely a rekombináns és a tisztított enzim esetében is megfigyelhető volt. Ez a gátlóhatás nem-kompetitívnek bizonyult a kettős reciprok grafikon alapján. C- és N-domén aktív-centrum-specifikus ACE szubsztrátok segítségével kimutattuk, hogy az endogén inhibitor nagyobb hatékonysággal gátolja a C-domén aktív centrumát.

A hígítás hatására bekövetkező specifikus ACE-aktivitásnövekedés - így az endogén ACE-gátló jelenléte nemcsak az emberi faj sajátossága -, hanem számos állatfaj esetében is kimutatható volt (egér, borjú, kecske, szamár). Ez a tény bizonyítja, hogy az evolúció során az endogén ACE-gátlás jól megőrzött tulajdonság.

Az endogén inhibitor azonosítására tett erőfeszítéseink során keresztkötő ágensek segítségével stabilizáltuk az ACE és az inhibitor közötti kapcsolatot. A keletkező termék nagysága alapján arra következtettünk, hogy a kölcsönható fehérje a humán szérumalbumin lehet. A keresztkötött termék tisztított ACE és HSA keresztkötése során is megfigyelhető volt, melyet mind ACE-ellenes, mind HSA-ellenes antitesttel azonosítani tudtunk.

Megvizsgáltuk a HSA-nak tisztított- és rekombináns ACE aktivitására kifejtett gátlóhatását is. Mindkét esetben hasonló mértékű inhibíciót találtuk (IC_{50} értékek rendre: 5,7 és 9,5 mg/ml). A felvett koncentráció-hatás görbék alapján pedig arra következtettünk, hogy az ACE fiziológias HSA-koncentrációk mellett nagymértékben gátolva van. Továbbá a HSA nagyobb hatékonysággal gátolja az ACE C-terminális aktív centrumát az N-terminális aktív centrumához képest, hasonlóan a szérumfrakciók esetében látottakkal.

A keringésben lévő angiotenzin-konvertáló enzim aktivitása nagymértékben kontrollálva van a humán szérumalbumin által. Arra is kerestük a választ, hogy milyen hatással van a HSA az endotél sejtek felszínén horgonyzott ACE-ra. Koronária bypass műtéten átesett betegekből származó fel nem használt vena saphena érgyűrűk esetében azt tapasztaltuk, hogy az angiotenzin I mediált érösszehúzódnak mértékét jelentősen csökkentette a HSA jelenléte, míg az angiotenzin II kiváltotta válaszok érintetlenek maradtak. Mindezek azt mutatják, hogy a keringő ACE mellett az endotél felszínén lévő ACE aktivitását is csökkenti a HSA.

Az endogén ACE-gátlás különösen érdekes jelenség a terápiásan alkalmazott ACE-gátló gyógyszerek sikerességének tükrében. Az ACE-gátlók hatékonynak bizonyultak a kardiovaszkuláris megbetegedések kezelésében, mint ahogyan azt számos nagy betegcsoporton végzett klinikai vizsgálat alátámasztja^{3,36-40,79}, és terápiás irányelv ajánlja^{42-45,47}. A bemutatott eredményeink szerint a HSA jelentősen gátolja az ACE aktivitását, ami egy lehetséges protektív mechanizmus a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásával és progressziójában szemben. Ez az interakció puffer rendszerként működve alacsony szinten stabilizálhatja az ACE aktivitását függetlenül az ACE-koncentrációtól.

A szérum ACE-koncentráció genetikai kontroll alatt áll. Az ACE-gén inzerációs/delációs polimorfizmusa a keringésben lévő ACE-koncentráció 20-50%-os egyének közötti variabilitásáért felelős²⁸. Ez a különbség azt sugallja, hogy az I/D polimorfizmusnak kiemelt szerepe lehet a kardiovaszkuláris megbetegedések, többek között a miokardiális infarktus, a koszorúérbetegség, a szívelégtelenség és a hipertónia patomechanizmusában. Ennek ellenére a legtöbb tanulmány nem tudta bizonyítani a kardiovaszkuláris betegségek és az ACE polimorfizmus közötti összefüggést. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy az I/D polimorfizmus nem 50%-os variabilitást okoz a szérum ACE koncentrációjában, hanem csupán 20%-os^{29,30}, vagy csak 8%-os variabilitásért felelős³¹. Az ellentmondó adatok miatt megvizsgáltuk az I/D polimorfizmus szerepét az ACE expressziójában egy magyar vizsgálati populációban. A Rigat és mtsi. által publikált adatokkal összhangban azt találtuk, hogy a genotípusok jelentősen hozzájárulnak a szérum ACE koncentrációjához (II: $101,0 \pm 6,7 \mu\text{g/l}$, ID: $115,1 \pm 4,5 \mu\text{g/l}$, DD: $157,7 \pm 6,3 \mu\text{g/l}$; $n=151$)⁷⁴. A

másik lehetséges magyarázat az, hogy a HSA pufferele az ACE aktivitását, alacsony szinten tartja azt függetlenül az ACE-koncentrációtól.

Figyelmen kívül hagyva az ACE-genotípus hozzájárulását az ACE-aktivitáshoz, egy metaanalízis több, mint 30 000 egyén bevonásával azt a következtetést vonta le, hogy az ACE-gén polimorfizmusa nem befolyásolja a vérnyomást, valamint nem emeli a miokardiális infarktus, az iszkémiás szívbetegség, vagy az iszkémiás cerebrovaszkuláris betegség kialakulásának rizikóját⁸⁰. Valószínűnek tartjuk, hogy a HSA ACE-aktivitásra kifejtett pufferhatása lehet ennek a magyarázata. Ismét érdemes kiemelni, hogy ezen betegségek gyógyszeres kezelésében kiemelt szerepet játszanak az ACE-gátlók, ami az ACE fontosságát sugallja a betegségek patomechanizmusában.

Számos olyan pontmutációt írtak le az ACE-génben, melyek nagyobb mértékben befolyásolják az ACE koncentrációját a keringésben, mint az I/D polimorfizmus. Kramers és mtsi. olyan esetekről számoltak be, ahol az ACE-gén pontmutációjának következtében a keringésben lévő ACE-mennyiség az ötszörösére emelkedett⁸¹. Ez a mutáció legalább 8 családot érint, az érintettek azonban nem szenvednek ACE-hoz kapcsolható betegségekben, vagy hipertóniában. Nesterovich és mtsi. egy másik mutációt írtak le, mely a szérum ACE-koncentrációját 13-szorosára emeli⁸². Azonban ezeknél az egyéneknél sem sikerült az emelkedett ACE mennyiséghez betegséget társítani. Sőt, az ACE 1199. aminosavában bekövetkező prolin leucin cserét aszimptomatikus autoszomális domináns hiper-ACE-emiának nevezik⁸³. Az előzőekben leírt megfigyelések is azt támasztják alá, hogy az ACE-koncentráció széles tartományban jól tolerálható, mely valószínűleg a HSA ACE-aktivitás csökkentő hatásával magyarázható.

Az endogén ACE-gátlás lehetőségét nem a mi munkacsoportunk vetette fel és vizsgálta elsőként. 1979-ben Klauser és mtsi. a humán szérumalbumint ACE-gátlóként azonosították egy kereskedelmi forgalomban kapható plazma preparátumból⁶⁶. A humán szérumalbumin keringő ACE-ra kifejtett gátló hatását mi is megerősítettük, továbbá kimutattuk, hogy a HSA nemcsak a keringő ACE aktivitását gátolja, hanem a szöveti ACE aktivitását is csökkenti. Ugyanebben az évben beszámoltak egy 10 kDa-nál kisebb molekulamérettel rendelkező endogén ACE-gátló jelenlétéről a plazmában⁶⁵. Ezt követően még számos alkalommal leírtak kisméretű endogén ACE-inhibitorokat^{67,69,70}. Érdekes módon mi nem láttunk arra utaló adatot, hogy az általunk vizsgált szérummintákban kisméretű endogén gátlószer lenne jelen. Egyetlen kísérletünkben sem volt kimutatható gátlóhatása az 50 kDa-nál kisebb molekulákat tartalmazó szérumfrakciónak. Ennek egyik lehetséges magyarázata az egyének közötti eltérő diétás faktorokban kereshető. Számos adat fellelhető az irodalomban arról, hogy diétás faktorok, többek között az α -S2-kazein⁸⁴, vagy a méz egyes komponensei⁶³ ACE-gátló hatással rendelkeznek. Ez arra enged következtetni, hogy a

tejben, vagy a mézben gazdag ételek fogyasztása következtében kis molekulású inibitorok jelenhetnek meg a keringésben. A mi vizsgálati populációnkat alkotó betegek általában éhgyomorral érkeztek vérvételre, melynek következtében a diétás faktorok talán kisebb szerepet játszottak az eredmények befolyásolásában. Másik lehetséges magyarázata a kis molekulású inibitorok hiányának, hogy korábbi vizsgálatokban megfigyeltek olyan gátló molekulákat, melyek nagy fehérjék degradációjából keletkeztek^{85,86}; a mi mintáinkban azonban ilyen degradáció valószínűleg nem következett be.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a HSA jelentős ACE-gátló hatással rendelkezik. Az albumin számos kisebb fehérje, peptid, ion, stb. szállításában vesz részt. A kérdés tehát az, hogy az albumin ACE-gátló tulajdonsága saját fehérje természetéből adódik, vagy valamely abszorbeált molekula tehető ezért felelőssé? A tisztított HSA ACE-aktivitásra kifejtett gátlóhatása azt mutatta, hogy a gátlóhatás inkább az albuminhoz köthető. Ezt további két adat is megerősíti. Egyrészt a HSA tömegspektrometriás analízise során igazolást nyert, hogy az nagy tisztaságú, másrészt a HSA-nak a rekombináns ACE-t gátló hatása mit sem változott 15 mosási-szűrési ciklus során.

Néhány tanulmány, melyeket diétás tényezők ACE-gátló hatásának azonosítására terveztek az acein-1-et⁸⁵ és az albutenzin A-t⁸⁶ jelölték meg ACE-inhibitorokként. Mindkét peptid a HSA tripszin-általi hasítási terméke. Az acein-1 egy heptapeptid (Tyr-Leu-Tyr-Glu-Ile-Ala-Arg), mely a HSA 138. és 144. aminosavai közötti szakaszt fedi le, míg az albutenzin A egy nonapeptid (Ala-Phe-Lys-Ala-Trp-Ala-Val-Ala-Arg), mely a HSA 210. és 218. aminosavai közötti szakasznak felel meg. Ezeknek a peptideknek a létezése azt sugallja, hogy a HSA-nak több ACE-gátló doménje is lehet. Ráadásul az acein-1 és az albutenzin A nagyon hasonló fél-maximális gátlókoncentrációval (IC₅₀) rendelkeznek, mint amit mi a HSA esetében leírtunk (16 µM az acein-1 esetében⁸⁵ és 1,2 µM az albutenzin A esetében⁸⁶). Érdekes módon annak a mesterséges peptidnek, mely csupán egyetlen aminosavval hosszabb mint az acein-1, már lényegesen kisebb az IC₅₀ értéke (500 µM). Ez arra enged következtetni, hogy a HSA ACE-gátló doménjének a megfelelő molekulafelszíni pozíciója különösen fontos a hatékony ACE-gátlás mechanizmusában.

A szérumban a fiziológiás HSA koncentráció magasabb (35-52 mg/ml), mint az albumin ACE-ra kifejtett fél-maximális gátlókoncentrációja (az IC₅₀ érték 5,7 mg/ml szérum ACE és 9,5 mg/ml rekombináns ACE esetében). Ez arra enged következtetni, hogy *in vivo* körülmények között az ACE teljesen gátolva van. Bizonyos patológiás állapotokban (fehérje alultápláltságban, vagy súlyos májelégtelenségben) a keringő albuminkoncentráció lényegesen kisebb lehet, mint a referencia tartomány alsó értéke. Az ilyen betegségekben alkalmazott albumin infúzió növelheti az endogén ACE-gátlás mértékét. Ezzel összhangban azt figyelték meg, hogy HSA posztoperatív

infúziója során hipotenzió alakult ki azoknál a betegeknél, akik ACE-gátló terápiában részesültek⁸⁷.

A HSA a keringő ACE aktivitását lényegesen csökkenti. Ez rávilágít arra, hogy az ACE-gátló gyógyszerek talán nem a keringő ACE-n fejtik ki terápiás hatásukat, mivel a keringésben az ACE már endogéne gátolva van az albumin által. Ennek következtében az ACE-gátló gyógyszerek elsődleges célpontja a szöveti ACE lehet. A HSA gátolta az angiotenzin I-konverzió mértékét az érben, melynek következtében lassabb és kisebb maximális angiotenzin I-mediált kontrakció alakult ki. Ezzel szemben a HSA nem befolyásolta az angiotenzin II-kiváltotta válaszokat, mely az albumin közvetlen gátlóhatására enged következtetni a membránkötött ACE esetében is. A 20 mg/ml HSA gátlóhatása azonban kisebb mértékű volt, mint amelyet a szérumban mérhettünk. Ráadásul a captopril nem volt hatékonyabb, mint a HSA a vizsgált érszakaszon, mely alapján arra következtethetünk, hogy a captopril sem teljes antagonistája a membránkötött ACE-nek, vagy az angiotenzin I-kiváltotta érösszehúzódás nem csak az ACE által katalizált folyamat eredménye.

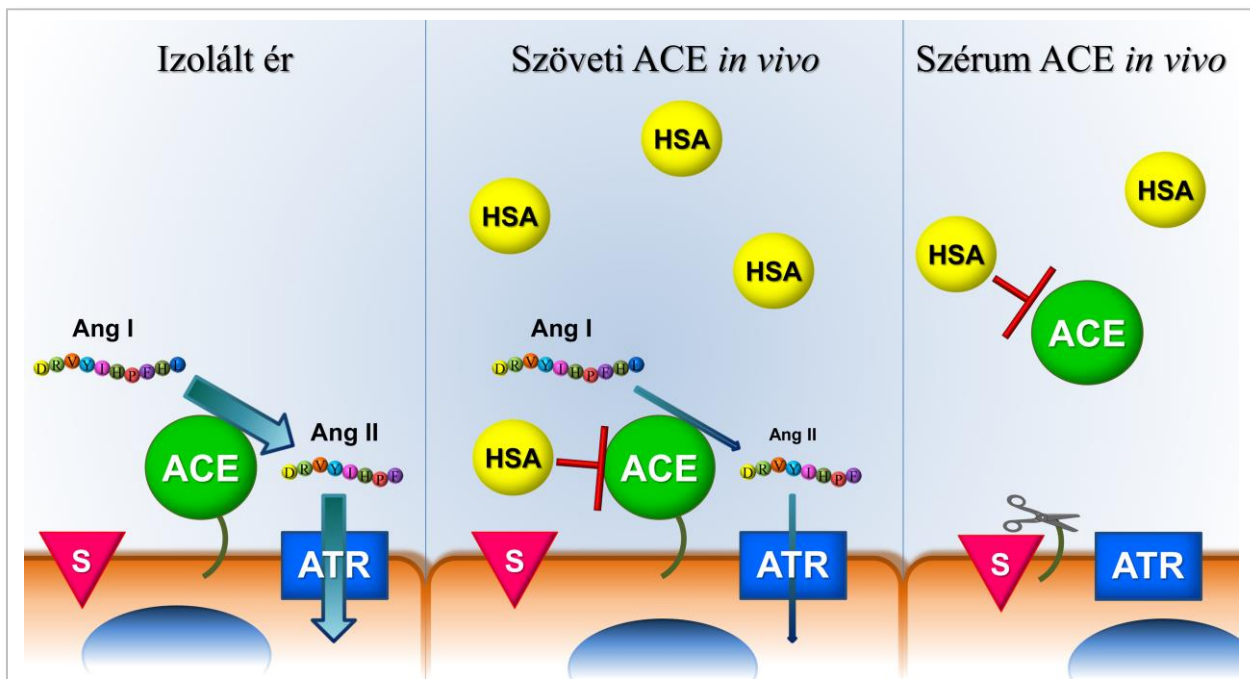
Úgy gondoljuk, hogy a HSA nem egyformán gátolja az ACE összes formáját (26. ábra). Ennek megfelelően néhány lokalizációban az ACE affinitása kisebb lehet a szérumalbumin iránt, vagy esetleg magasabb a lokális ACE-mennyiség, mint a szérumban.

Ebből következik, hogy a HSA-okozta gátlóhatás limitált ezekben a lokalizációkban, ami teret ad az ACE-gátló gyógyszereknek terápiás hatásuk kifejtésében. Ez összhangban van a Dzau és mtsi. által leírtakkal, miszerint a plazma ACE csak egy csekély részét képviseli a szervezet össz-ACE-aktivitásának, ezáltal szerepe is minimális³⁵. Valójában ezt az állítást tényekkel támasztottuk alá, mivel igazoltuk a szérumban ACE HSA-mediált gátoltságát.

Egy másik következménye a HSA-mediált szérumban ACE-gátlásának az lehet, hogy az angiotenzin I – II konverzió sebességmeghatározó lépéssé válik a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszerben. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy az angiotenzin I és II összemérhető mennyiségben található meg a keringésben⁸⁸. Mindez arra utalhat, hogy az angiotenzin I képződés (a renin által) és konverzió (az ACE által) sebessége hasonló. Meg kell jegyezni azonban, hogy az angiotenzin I nem lehet jelen a keringésben a renin előzetes felszabadulása nélkül. Továbbá a HSA általi nagymértékű ACE-gátlás következtében az angiotenzin I és II lebontó útvonalak (például ACE2-aktivitás) kiemelt szerepet játszhatnak a lokális angiotenzin II koncentráció kialakításában.

A HSA lehetséges protektív szerepe mellett az ACE-gátlók már bizonyítottan kedvezően befolyásolják a kardiovaszkuláris betegségek kialakulását és progresszióját. A gyógyszer a kedvező hatásait csupán akkor tudja kifejteni, ha a beteg beveszi azt, illetve ha megfelelő dózisban

szedi azt. A klinikus nagymértékben képes befolyásolni a beteg hozzáállását a kezeléshez, de végső soron mindig a beteg dönt arról, hogy a gyógyszert beveszi-e vagy sem. A kezelőorvos egy egyszerű vérnyomásmérés segítségével megpróbálhatja megítélni a beteg terápiahűségét, azonban számos esetben nem a vérnyomáscsökkentés a cél, hanem az ACE-gátlók egyéb kedvező tulajdonságait szeretnénk kiaknázni, melyek a vérnyomáscsökkentő hatástól függetlenek lehetnek.



26. ábra – Elméleti modell a humán szérumalbumin angiotenzin-konvertáló enzimre kifejtett hatásáról

Az angiotenzin I jelentős kontrakciót váltott ki az izolált vena saphena ereken a HSA-mentes oldatban végzett kísérleteink során (ábra bal oldala, izolált ér). A HSA jelenléte viszont lényegesen csökkentette a vaszkuláris válasz nagyságát (ábra középső része, szöveti ACE *in vivo*), melynél nagyobb mértékű HSA-mediált gátlást találtunk a szérum ACE esetében (ábra jobb oldala, szérum ACE *in vivo*). Elméletünk szerint a HSA szerepet játszik a membránkötött ACE-aktivitásának csökkentésében, valamint az ACE-szekretáz (S) által a keringésbe juttatott ACE aktivitásának közömbösítése révén az angiotenzin I – II átalakulást bizonyos szövetekre lokalizálja. Ang: angiotenzin, ATR: angiotenzin II-receptor

A munkacsoportunk által kidolgozott módszer kitűnően használható a betegek ACE-gátló terápiájának objektív megítélésére. Ehhez csupán egyetlen cső vérére van szükség, melyből megmérhető a betegre jellemző ACE-gátlás mértéke. Az 502 beteg bevonásával végzett vizsgálatunkban arra a következtetésre jutottunk, hogy a betegek közel ötödében elégtelen az ACE-gátló terápia hatékonysága. Ennek hátterében leginkább a nem megfelelő terápiahűség áll. Viszont ha a kezelőorvos tudja, hogy melyik betegnél kell javítani a terápiahűségen, az növelheti a kezelés hatékonyságát, mellyel összességében csökkentheti a kardiovaszkuláris mortalitást és a

hospitalizációk számát. Az elégtelen ACE-gátlóhatást mutató betegek kisebb részénél viszont az alkalmazott dózis mértéke volt elégtelen, melyet a dózis emelésével korrigálni lehetett. A pozitív változás a betegek vérnyomás-értékeiben és az *in vitro* ACE-gátló hatékonyság-mérésében is megmutatkozott.

A tanulmányból az is kiderült, hogy néhány beteg esetében az ACE-gátlás mértéke 99% felett van. Ezeknél a betegeknél érdemes lehet az ACE-gátló dózisát csökkenteni az esetlegesen kialakuló mellékhatások számának és mértékének csökkentése érdekében, ezzel pedig tovább javítani a betegek terápiahűségét. A kidolgozott módszer összességében egy újabb fejezetet nyithat a személyre szabott kezelés elterjedésében.

A Ph.D. értekezésemben, illetve az annak alapjául szolgáló közleményekben megerősítettük, hogy a keringő ACE-aktivitását a humán szérumalbumin nagymértékben gátolja. Új eredményként kimutattuk, hogy

- a HSA-mediált ACE-gátló hatás fiziológiás körülmények között (pH, Cl⁻ koncentráció) is kimutatható *in vitro*,
- a HSA nagyobb affinitással gátolja az ACE C-domén aktív centrumát, mint az N-domén aktív centrumát,
- a HSA-mediált gátlóhatás az evolúcióban megőrzött tulajdonság,
- a HSA nemcsak a keringésben lévő ACE-aktivitását gátolja, hanem az endotél sejtek felszínén lévő ACE-ra is gátlóhatással van,
- a különböző mértékben hígított szérumminták specifikus aktivitásának mérése alkalmas a betegek ACE-gátló kezelésének objektív megítélésére (hatékony-e a terápia), ezáltal a személyre szabott kezelés megvalósítására.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE)-gátlók az 5. leggyakrabban felírt gyógyszerek. Endogén ACE-inhibitorok létezéséről már 1979-ben is beszámoltak, ezek hatásait azonban kevésbé tanulmányozták, nem úgy, mint a klinikumban sikeresen alkalmazott ACE-gátlókat.

Célunk az endogén ACE-gátló jelenlétének kimutatása, azonosítása volt a szérumban, valamint megvizsgálni annak keringő- és vaszkuláris ACE-ra kifejtett hatásait.

Hipotézisünk szerint a szérum ACE-aktivitás endogén inhibitor jelenléte miatt gátolva van, mely gátlóhatás a szérum hígításának hatására csökkenthető, ekkor ugyanis a gátlószer leválik az ACE-ről, így az újra aktívvá válik. A specifikus szérum ACE-aktivitás jelentősen növekedett hígítás hatására, mely tisztított vese eredetű ACE esetében nem volt megfigyelhető. Ez metodikai okokkal nem volt magyarázható, az aktivitás mérésre használt mesterséges szubsztrát hasítási sebessége arányos az angiotenzin I hasítási sebességével. A szérumminták 50 kDa pórusméretű ultraszűrése nem, míg 100 kDa pórusméretű ultraszűrése megszüntette a gátlóhatást, mely alapján a gátlószer molekulamérete 50 és 100 kDa közé tehető. Lineweaver-Burk grafikon nem-kompetitív típusú endogén ACE-gátlást mutatott. Az endogén inhibitor nagyobb hatékonysággal gátolta az ACE C-domén aktív centrumát, mint az N-domén aktív centrumot, valamint a gátlószer kimutatható volt más fajok szérumában is. Az ACE-t keresztkötöttük a szérumban kölcsönható fehérjéivel. Egy keresztkötött termék mind ACE, mind humán szérumalbumin (HSA) ellenes antitesttel is kimutatható volt. A HSA gátolta a tisztított humán (keringésben lévő) és a rekombináns ACE aktivitását is (IC₅₀ értékek rendre: 5,7±0,7 és 9,5±1,1 mg/ml). Humán vena saphena ereken vizsgáltuk a HSA membránkötött ACE-ra kifejtett hatását. Az angiotenzin I-kiváltotta kontrakció sebességét és maximális erejét is csökkentette a HSA, míg az angiotenzin II-mediált válasz nagyságát nem befolyásolta.

A szérumminta hígításával lecsökkenthető az exogén ACE-gátló hatása is. Ez lehetőséget teremt a beteg terápia nélküli maximális- és terápia alatt mérhető gátolt ACE-aktivitásának mérésére, mely alapján megítélhető a beteg terápiájának hatékonysága. 502 beteg terápiahatékonyságának vizsgálata alapján arra következtettünk, hogy a vizsgált populációban minden 5. betegnél elégtelen a kezelés hatékonysága, mely a nem megfelelő terápiahűsége vezethető vissza.

Vizsgálatunk legfontosabb megállapítása az, hogy a HSA az ACE egyik hatékony endogén gátlószere, melynek következtében a keringő ACE aktivitása csaknem teljesen gátolva van fiziológias körülmények között, *in vivo*. Kísérleteink klinikumban történő értelmezése révén pedig megnyílt a lehetőség az ACE-gátlót szedő betegek személyre szabott kezelése előtt.

SUMMARY

Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors are the 5th most frequently prescribed drugs. There are reports dating back to 1979 suggesting the existence of endogenous ACE inhibitors. Their effects are much less characterized than that of the clinically administered ACE inhibitors.

We aimed to investigate the presence of endogenous ACE inhibition, identify the ACE-inhibitor in the serum and examine its effects on circulating and vascular ACE.

It was hypothesized that ACE activity is masked by an endogenous inhibitor, which dissociates from ACE when its concentration decreases upon dilution. Specific ACE activity significantly increased by dilution of the serum, which was not observed when purified renal ACE was used. This phenomenon could not be explained by methodical faults, the conversion rate of the artificial ACE substrate was in proportion to the conversion rate of angiotensin I. Ultrafiltration of serum samples with 50 kDa membranes had no effect on ACE activity, while the inhibitory effect ceased when 100 kDa membranes were used. Lineweaver-Burk plot indicated non-competitive inhibition of ACE by this endogenous factor. The endogenous inhibitor had higher potency on the C-domain active site than on the N-domain active site of ACE. This inhibition was also detectable in serum samples of different animal species. ACE was crosslinked with interacting proteins in human sera. One of the crosslinked products could be recognized by both anti-ACE and anti-HSA (human serum albumin) antibodies. HSA inhibited the human purified (circulating) and the human recombinant ACE with potencies of 5.7 ± 0.7 and 9.5 ± 1.1 mg/mL, respectively. Effects of HSA on tissue-bound native ACE were tested on human saphenous vein samples. Angiotensin I evoked vasoconstriction was inhibited by HSA, while HSA exerted no effects on angiotensin II mediated constrictions.

Dilution diminishes the effects of exogenous ACE-inhibitor drugs. This enables the assessment of the effectiveness of ACE-inhibitor therapy. According to the assessment of ACE-inhibitor therapy of 502 patients, we found that the therapy was ineffective in every 5th patient, probably due to poor patient compliance.

The most relevant conclusion of this study is that HSA represents a potent physiological inhibitor of the ACE. The enzymatic activity of ACE seems to be almost completely suppressed by HSA under physiological conditions *in vivo*. Translation of our findings into practice opens the door to individualized ACE-inhibitor therapy.

IRODALOMJEGYZÉK

Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Mendis, S., Alwan, A. *A prioritized research agenda for prevention and control of NCDs: CVD, cancer, chronic respiratory disease, diabetes.* (World Health Organization, 2011).
2. European Health for All. at <<http://data.euro.who.int/hfad>>
3. Fox, K. M. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet* **362**, 782–8 (2003).
4. Lewington, S., Clarke, R., Qizilbash, N., Peto, R., Collins, R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* **360**, 1903–13 (2002).
5. Tigerstedt, R., Bergman, P. Q. Niere und Kreislauf 1. *Skand. Arch. Physiol.* **8**, 223–271 (1898).
6. Braun-Menendez, E., Fasciolo, J., Leloir, L., Munoz, J. The substance causing renal hypertension. *J. Physiol.* **98**, 283–298 (1940).
7. Page, I. H., Helmer, O. M. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *J. Exp. Med.* **71**, 29–42 (1940).
8. Simpson, S. A., Tait, J. F., Wettstein, A., Neher, R., Von Euw, J., *et al.* Isolation from the adrenals of a new crystalline hormone with especially high effectiveness on mineral metabolism. *Experientia* **9**, 333–5 (1953).
9. Skeggs, L. T., Marsh, W. H., Kahn, J. R., Shumway, N. P. The existence of two forms of hypertensin. *J. Exp. Med.* **99**, 275–82 (1954).
10. Skeggs, L. T., Kahn, J. R., Shumway, N. P. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J. Exp. Med.* **103**, 295–9 (1956).
11. Skeggs, L. T., Kahn, J. R., Lentz, K., Shumway, N. P. The preparation, purification, and amino acid sequence of a polypeptide renin substrate. *J. Exp. Med.* **106**, 439–53 (1957).
12. Gross, F. Control of aldosterone secretion by the renin-angiotensin system and by corticotropin. *Adv. Intern. Med.* **14**, 281–339 (1968).
13. Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., *et al.* A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ. Res.* **87**, E1–9 (2000).
14. Tipnis, S. R., Hooper, N. M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., *et al.* A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **275**, 33238–43 (2000).

15. Zhong, J., Basu, R., Guo, D., Chow, F. L., Byrns, S., *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 suppresses pathological hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction. *Circulation* **122**, 717–28, 18 p following 728 (2010).
16. Kostenis, E., Milligan, G., Christopoulos, A., Sanchez-Ferrer, C. F., Heringer-Walther, S., *et al.* G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* **111**, 1806–13 (2005).
17. Yang, H. Y., Erdös, E. G. Second kininase in human blood plasma. *Nature* **215**, 1402–3 (1967).
18. Yang, H. Y., Erdös, E. G., Levin, Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim. Biophys. Acta* **214**, 374–6 (1970).
19. Hubert, C., Houot, A. M., Corvol, P., Soubrier, F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J. Biol. Chem.* **266**, 15377–83 (1991).
20. Wei, L., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P., Clauser, E. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J. Biol. Chem.* **266**, 9002–8 (1991).
21. 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.* **389**, 1153–61 (2008).
22. Ehlers, M. R., Abrie, J. A., Sturrock, E. D. C domain-selective inhibition of angiotensin-converting enzyme. *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone. Syst.* **14**, 189–92 (2013).
23. Wei, L., Clauser, E., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors. *J. Biol. Chem.* **267**, 13398–13405 (1992).
24. Wei, L., Alhenc-Gelas, F., Soubrier, F., Michaud, A., Corvol, P., *et al.* Expression and characterization of recombinant human angiotensin I-converting enzyme. Evidence for a C-terminal transmembrane anchor and for a proteolytic processing of the secreted recombinant and plasma enzymes. *J. Biol. Chem.* **266**, 5540–6 (1991).
25. Oppong, S. Y., Hooper, N. M. Characterization of a secretase activity which releases angiotensin-converting enzyme from the membrane. *Biochem. J.* **292** (Pt 2, 597–603 (1993).
26. Howard, T. E., Shai, S. Y., Langford, K. G., Martin, B. M., Bernstein, K. E. Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4294–4302 (1990).
27. Krege, J. H., John, S. W., Langenbach, L. L., Hodgin, J. B., Hagaman, J. R., *et al.* Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* **375**, 146–8 (1995).

28. Rigat, B., Hubert, C., Alhenc-Gelas, F., Cambien, F., Corvol, P., *et al.* An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J. Clin. Invest.* **86**, 1343–6 (1990).
29. Tiret, L., Rigat, B., Visvikis, S., Breda, C., Corvol, P., *et al.* Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am. J. Hum. Genet.* **51**, 197–205 (1992).
30. Danilov, S., Savoie, F., Lenoir, B., Jeunemaitre, X., Azizi, M., *et al.* Development of enzyme-linked immunoassays for human angiotensin I converting enzyme suitable for large-scale studies. *J. Hypertens.* **14**, 719–27 (1996).
31. Rice, G. I., Jones, A. L., Grant, P. J., Carter, A. M., Turner, A. J., *et al.* Circulating activities of angiotensin-converting enzyme, its homolog, angiotensin-converting enzyme 2, and neprilysin in a family study. *Hypertension* **48**, 914–20 (2006).
32. Skidgel, R. A., Engelbrecht, S., Johnson, A. R., Erdös, E. G. Hydrolysis of substance p and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides* **5**, 769–76 (1984).
33. Bian, B., Kelton, C. M. L., Guo, J. J., Wigle, P. R. ACE Inhibitor and ARB utilization and expenditures in the Medicaid fee-for-service program from 1991 to 2008. *J. Manag. Care Pharm.* **16**, 671–9 (2010).
34. Ferreira, S. H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops Jararaca*. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **24**, 163–9 (1965).
35. Dzau, V. J., Bernstein, K., Celermajer, D., Cohen, J., Dahlöf, B., *et al.* The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. *Am. J. Cardiol.* **88**, 1L–20L (2001).
36. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico. Six-month effects of early treatment with lisinopril and transdermal glyceryl trinitrate singly and together withdrawn six weeks after acute myocardial infarction: the GISSI-3 trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico. *J. Am. Coll. Cardiol.* **27**, 337–44 (1996).
37. ISIS-4 Collaborative Group. ISIS-4: a randomised factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58,050 patients with suspected acute myocardial infarction. ISIS-4 (Fourth International Study of Infarct Survival) Collaborative. *Lancet* **345**, 669–85 (1995).
38. Greenberg, B., Quinones, M. A., Koilpillai, C., Limacher, M., Shindler, D., *et al.* Effects of long-term enalapril therapy on cardiac structure and function in patients with left ventricular dysfunction. Results of the SOLVD echocardiography substudy. *Circulation* **91**, 2573–81 (1995).
39. Lüders, S., Schrader, J., Berger, J., Unger, T., Zidek, W., *et al.* The PHARAO study: prevention of hypertension with the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril in patients with high-normal blood pressure: a prospective, randomized, controlled prevention trial of the German Hypertension League. *J. Hypertens.* **26**, 1487–96 (2008).

40. Cuspidi, C., Muiesan, M. L., Valagussa, L., Salvetti, M., Di Biagio, C., *et al.* Comparative effects of candesartan and enalapril on left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension: the candesartan assessment in the treatment of cardiac hypertrophy (CATCH) study. *J. Hypertens.* **20**, 2293–300 (2002).
41. Ruggenenti, P., Fassi, A., Ilieva, A. P., Bruno, S., Iliev, I. P., *et al.* Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1941–51 (2004).
42. Hamm, C. W., Bassand, J.-P., Agewall, S., Bax, J., Boersma, E., *et al.* ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevatio. *Eur. Heart J.* **32**, 2999–3054 (2011).
43. McMurray, J. J. V, Adamopoulos, S., Anker, S. D., Auricchio, A., Böhm, M., *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart. *Eur. Heart J.* **33**, 1787–847 (2012).
44. Rydén, L., Standl, E., Bartnik, M., Van den Berghe, G., Betteridge, J., *et al.* Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur. Heart J.* **28**, 88–136 (2007).
45. Tendera, M., Aboyans, V., Bartelink, M.-L., Baumgartner, I., Clément, D., *et al.* ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: the Task Force on the Diagnosis and Treatm. *Eur. Heart J.* **32**, 2851–906 (2011).
46. Taylor, J. Joint societies CVD Prevention Guidelines launched in May 2012. *Eur. Heart J.* **33**, 1539 (2012).
47. Wijns, W., Kolh, P., Danchin, N., Di Mario, C., Falk, V., *et al.* Guidelines on myocardial revascularization. *Eur. Heart J.* **31**, 2501–55 (2010).
48. Wald, N. J., Law, M. R. A strategy to reduce cardiovascular disease by more than 80%. *BMJ* **326**, 1419 (2003).
49. Fuller, R. W., Choudry, N. B. Increased cough reflex associated with angiotensin converting enzyme inhibitor cough. *BMJ* **295**, 1025–1026 (1987).
50. Bucknall, C. E., Neilly, J. B., Carter, R., Stevenson, R. D., Semple, P. F. Bronchial hyperreactivity in patients who cough after receiving angiotensin converting enzyme inhibitors. *BMJ* **296**, 86–88 (1988).
51. Ceconi, C., Francolini, G., Olivares, A., Comini, L., Bachetti, T., *et al.* Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors have different selectivity for bradykinin binding sites of human somatic ACE. *Eur. J. Pharmacol.* **577**, 1–6 (2007).

52. Molinaro, G., Cugno, M., Perez, M., Lepage, Y., Gervais, N., *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema is characterized by a slower degradation of des-arginine(9)-bradykinin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**, 232–7 (2002).
53. Bas, M., Hoffmann, T. K., Tiemann, B., Dao, V. T.-V., Bantis, C., *et al.* Potential genetic risk factors in angiotensin-converting enzyme-inhibitor-induced angio-oedema. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **69**, 179–86 (2010).
54. Brown, N. J., Ray, W. A., Snowden, M., Griffin, M. R. Black Americans have an increased rate of angiotensin converting enzyme inhibitor-associated angioedema. *Clin. Pharmacol. Ther.* **60**, 8–13 (1996).
55. Cooper, W. O., Hernandez-Diaz, S., Arbogast, P. G., Dudley, J. A., Dyer, S., *et al.* Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors. *N. Engl. J. Med.* **354**, 2443–51 (2006).
56. FitzGerald, R. J., Meisel, H. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *Br. J. Nutr.* **84 Suppl 1**, S33–7 (2000).
57. FitzGerald, R. J., Murray, B. A., Walsh, D. J. Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr.* **134**, 980S–8S (2004).
58. Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J. Dairy Sci.* **83**, 1434–40 (2000).
59. Karaki, H., Doi, K., Sugano, S., Uchiwa, H., Sugai, R., *et al.* Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **96**, 367–71 (1990).
60. Maeno, M., Yamamoto, N., Takano, T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* **79**, 1316–21 (1996).
61. Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y., *et al.* A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **64**, 767–71 (1996).
62. Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., Korpela, R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**, 326–30 (2003).
63. León-Ruiz, V., González-Porto, A. V, Al-Habsi, N., Vera, S., San Andrés, M. P., *et al.* Antioxidant, antibacterial and ACE-inhibitory activity of four monofloral honeys in relation to their chemical composition. *Food Funct.* (2013). doi:10.1039/c3fo60221d
64. He, H.-L., Liu, D., Ma, C.-B. Review on the angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitor peptides from marine proteins. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **169**, 738–49 (2013).
65. Ryan, J. W., Martin, L. C., Chung, A., Pena, G. A. Mammalian inhibitors of angiotensin converting enzyme (kininase II). *Adv. Exp. Med. Biol.* **120B**, 599–606 (1979).

66. Klauser, R. J., Robinson, C. J., Marinkovic, D. V, Erdös, E. G. Inhibition of human peptidyl dipeptidase (angiotensin I converting enzyme: kininase II) by human serum albumin and its fragments. *Hypertension* **1**, 281–6 (1979).
67. Snyder, R. A., Wintroub, B. U. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by des-Leu10-angiotensin I: a potential mechanism of endogenous angiotensin-converting enzyme regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **871**, 1–5 (1986).
68. Lieberman, J., Sastre, A. An angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor in human serum. Increased sensitivity of the serum ACE assay for detecting active sarcoidosis. *Chest* **90**, 869–75 (1986).
69. Rogerson, F. M., Livett, B. G., Scanlon, D., Mendelsohn, F. A. Inhibition of angiotensin converting enzyme by N-terminal fragments of substance P. *Neuropeptides* **14**, 213–7 (1989).
70. Ikemoto, F., Song, G. B., Tominaga, M., Yamamoto, K. Endogenous inhibitor of angiotensin converting enzyme in the rat heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 1093–9 (1989).
71. Brecher, A. S., Thevananther, S., Wilson, S. Observation of high and low molecular weight inhibitors of angiotensin-converting enzyme in rat lung. *Arch. Int. Pharmacodyn. thérapie* **331**, 301–12 (1996).
72. Davidson, N. C., Barr, C. S., Struthers, A. D. C-type natriuretic peptide. An endogenous inhibitor of vascular angiotensin-converting enzyme activity. *Circulation* **93**, 1155–9 (1996).
73. Thevananther, S., Brecher, A. S. Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) binding protein from human serum with an ACE affinity column. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **77**, 216–23 (1999).
74. Fagyas, M., Úri, K., Mányiné, I. S., Daragó, A., Boczán, J., *et al.* 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).
75. Beneteau, B., Baudin, B., Morgant, G., Giboudeau, J., Baumann, F. C. Automated kinetic assay of angiotensin-converting enzyme in serum. *Clin. Chem.* **32**, 884–6 (1986).
76. 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.* **1**, 1971–6 (2006).
77. Tóth, A., Fagyas, M., Papp, Z., Édes, I. Dilution based inhibition assay. *Eur. Pat. Off.* 131168263.5 (2013).
78. Tóth, A., Fagyas, M., Papp, Z., Édes, I. Hígítás alapú gátlóhatást mérő módszer. HU 1200299 (2012).

79. Cohn, J. N., Johnson, G., Ziesche, S., Cobb, F., Francis, G., *et al.* A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.* **325**, 303–10 (1991).
80. Agerholm-Larsen, B., Nordestgaard, B. G., Tybjaerg-Hansen, A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 484–92 (2000).
81. Kramers, C., Danilov, S. M., Deinum, J., Balyasnikova, I. V, Scharenborg, N., *et al.* Point mutation in the stalk of angiotensin-converting enzyme causes a dramatic increase in serum angiotensin-converting enzyme but no cardiovascular disease. *Circulation* **104**, 1236–40 (2001).
82. Nesterovitch, A. B., Hogarth, K. D., Adarichev, V. A., Vinokour, E. I., Schwartz, D. E., *et al.* Angiotensin I-converting enzyme mutation (Trp1197Stop) causes a dramatic increase in blood ACE. *PLoS One* **4**, e8282 (2009).
83. Semmler, A., Stein, R. W., Caplan, L., Danilov, S. M., Klockgether, T., *et al.* Hereditary hyper-ACE-emia due to the Pro1199Leu mutation of somatic ACE as a potential pitfall in diagnosis: a first family outside Europe. *Clin. Chem. Lab. Med.* **44**, 1088–9 (2006).
84. Tauzin, J., Miclo, L., Gaillard, J. L. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine alphaS2-casein. *FEBS Lett.* **531**, 369–74 (2002).
85. Nakagomi, K., Fujimura, A., Ebisu, H., Sakai, T., Sadakane, Y., *et al.* Acein-1, a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide isolated from tryptic hydrolysate of human plasma. *FEBS Lett.* **438**, 255–7 (1998).
86. Nakagomi, K., Ebisu, H., Sadakane, Y., Fujii, N., Akizawa, T., *et al.* Properties and human origin of two angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from a tryptic hydrolysate of human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 879–83 (2000).
87. Howard, G., Downward, G., Bowie, D. Human serum albumin induced hypotension in the postoperative phase of cardiac surgery. *Anaesth. Intensive Care* **29**, 591–4 (2001).
88. Van Dijk, M. A., Kroon, I., Kamper, A. M., Boomsma, F., Danser, A. H., *et al.* The angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and responses to angiotensins and bradykinin in the human forearm. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **35**, 484–90 (2000).

Iktatószám: DEENKÉTK/32/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Fagyas Miklós

Neptun kód: NMHRCK

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

Mtmt azonosító: 10037028

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Fagyas, M.**, Úri, K., Siket, M.I., Daragó, A., Boczán, J., Bányai, E., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A.: New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) I: Endogenous angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition.
PLoS One. "accepted by publisher", 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087843>
IF:3.73 (2012)
2. **Fagyas, M.**, Úri, K., Siket, M.I., Fülöp, G. Á., Csató, V., Daragó, A., Boczán, J., Bányai, E., Szentkirályi, I. E., Maros, T., 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. "accepted by publisher", 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087844>
IF:3.73 (2012)

További Közlemények

3. **Fagyas, M.**, Úri, K., Siket, M.I., Daragó, A., Boczán, J., Bányai, E., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A.: New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) III: Endogenous inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) provides protection against cardiovascular diseases.
PLoS One. "accepted by publisher", 2014.
IF:3.73 (2012)

4. Uri, K., **Fagyas, M.**, Mányiné Siket, I., Kertész, A., Csanádi, Z., Sándorfi, G., Clemens, M., Fedor, R., Papp, Z., Édes, I., Tóth, A., Lizanecz, E.: New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) IV: Circulating ACE2 as a biomarker of systolic dysfunction in human hypertension and heart failure.
PLoS One. "accepted by publisher", 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087845>
IF:3.73 (2012)
5. 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
6. Fedor, R., Asztalos, L., Lócsey, L., Szabó, L., Mányiné, I.S., **Fagyas, M.**, Lizanecz, E., Tóth, A.: Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme predicts left ventricular hypertrophy after renal transplantation.
Transplant. Proc. 43 (4), 1259-1260, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.03.064>
IF:1.005
7. Fedor, R., Asztalos, L., Lócsey, L., Szabó, L., Mányiné, I.S., **Fagyas, M.**, Lizanecz, E., Tóth, A.: Insertion/Deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme as a risk factor for chronic allograft nephropathy.
Transplant. Proc. 42 (6), 2304-2308, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.05.020>
IF:0.993

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 19.77

A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7.46

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.02.18

TÁRGYSZAVAK

renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer	renin-angiotensin-aldosterone system
angiotenzin-konvertáló enzim	angiotensin-converting enzyme
endogén ACE-gátlás	endogenous ACE-inhibition
ACE-gátló gyógyszerek	ACE-inhibitor drugs
humán szérumalbumin	human serum albumin
HSA	HSA
ACE	ACE
RAAS	RAAS
kardiovaszkuláris betegségek	cardiovascular diseases
személyre szabott kezelés	personalized therapy

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálával tartozom témavezetőmnek, *Dr. Tóth Attilának*, akivel csupán rövid ismeretség után kezdtünk el együtt dolgozni, mégis hamar teljes összhangban kerestük „a válaszokat a feltett kérdésekre”. Vezetése alatt még a „favágás” is inkább szórakoztatónak tűnt, mintsem kötelességnek. Kezdetől önzetlenül segített és bátorított, tanácsaival átlendített a szakmai holtpontokon. Remélem, közös munkánk még sok gyümölcsöt terem a jövőben is.

Nagyrabecsülésemet és köszönetemet tolmácsolom e pár sorban *Dr. Papp Zoltán* professzor úrnak, hogy munkám során mindvégig pártfogolt és segítette szakmai céljaim elérését. Felbecsülhetetlen az a biztonságos és támogató háttér, melyet megteremtett az eredményes alkotó-kutatómunkámhoz.

Köszönetemet fejezem ki *Dr. Édes István* professzor úrnak, aki lehetővé tette, hogy az általa vezetett Kardiológia Intézet szárnyai alatt végezhessem munkámat, hasznos meglátásaival és dicsérő szavaival ösztönözte azt.

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet a Klinikai Fiziológiai Tanszék összes munkatársának és Ph.D. hallgatójának a munkámhoz nyújtott segítségükért. Külön köszönet illeti *Mányiné Siket Ivettát*, aki nagyon megkönnyítette és előrelendítette a laboratóriumi munkámat, valamint *Dr. Daragó Andreát* a klinikai vizsgálatok elindításában nyújtott segítségével.

Hálásan köszönöm a Szívsebészeti Tanszék valamennyi orvosának, hogy humán mintákat biztosítottak a kísérleteinkhez, valamint köszönöm a Kardiológiai Intézet ambuláns nővéreinek a betegbeválogatásban nyújtott segítségüket.

Köszönöm feleségemnek és családomnak, hogy szeretetükkel és biztatásukkal mindvégig támogattak, lelket öntöttek belém a kevésbé sikeres időkben.

A kutatómunkánkat az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA, K84300), a TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-007 és a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 számú projektek támogatták.

Ezt a munkát nagy szeretettel ajánlom feleségemnek, Emesének,

és gyermekeimnek, Lillának és Leventének!