

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Szöveti- és keringő angiotenzin konvertáló enzimek
szabályozása kardiovaszkuláris megbetegedésekben**

Dr. Bánhegyi Viktor

Témavezető: Prof. Dr. Tóth Attila



**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2022

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítésjegyzék	4
2.	Bevezetés	6
3.	Irodalmi áttekintés	7
3.1.	A humán renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS)	7
3.1.1.	Az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) → angiotenzin II (ATII) → 1-es típusú ATII receptor (ATRI) tengely	7
3.1.2.	Az angiotenzin II (ATII) → angiotenzin konvertáló enzim 2 (ACE2) → angiotenzin (1-7) (Ang1-7) → Mas receptor (MasR) tengely	8
3.2.	A RAAS modulálásának terápiás lehetőségei	8
3.2.1.	A RAAS vazokonstriktív és pro-fibrotikus tengelyének terápiás lehetőségei	9
3.2.2.	A RAAS vazodilatatív és reno-protectív tengelyének terápiás lehetőségei	10
3.3.	Az angiotenzin konvertáló enzimek eredete, a keringő ACE és ACE2 forrásai	12
3.4.	Szöveti (lokális) RAAS rendszerek	12
3.5.	Angiotenzin konvertáló enzimek funkcionális polimorfizmusai	14
3.6.	A SARS-CoV-2 bemutatása	15
4.	Célkitűzések	17
4.1.	Szöveti- és keringő ACE vizsgálata humán tüdőszövetben és szérumban	17
4.2.	Angiotenzin konvertáló enzim 2 (ACE2) aktivitásának és expressziójának vizsgálata kardiovaszkulárisan terhelt betegekben	17
5.	Anyagok és módszerek	18
5.1.	Humán szív- és tüdőszövet bank	18
5.2.	Az ACE inzerciós/deléciós polimorfizmusának meghatározása	20
5.3.	Szövetfeldolgozás ACE aktivitás és expresszió meghatározáshoz	20
5.4.	Fehérjemeghatározás és fehérjenormalizálás	20
5.5.	ACE aktivitás meghatározás	21
5.6.	ACE2 aktivitás meghatározás	22
5.7.	ACE és ACE2 expresszió (koncentráció) meghatározása	22
5.8.	Vegyszerek	23
5.9.	Statisztikai analízis	23
6.	Eredmények	24
6.1.	Szöveti ACE extrakciós protokoll	24
6.2.	Genotípus függő (I/D polimorfizmus) tüdőszöveti és keringő ACE expresszió	26
6.2.1.	Szöveti- és keringő ACE aktivitás- illetve expresszióértékek összefüggése	28
6.2.2.	Az endogén gátlás jelentősége humán tüdőszövetben	29

6.3. Az ACE2 aktivitás kapcsolata szív- és érrendszeri betegségekkel, illetve kardiovaszkuláris rizikófaktorokkal	30
6.3.1. Bal kamrai ACE2 aktivitás és expresszió összefüggése a keringésben jelen lévő ACE2 szintekkel	33
6.3.2. Tüdőszöveti ACE2 aktivitás- és expresszióértékek korrelációanalízise keringő ACE2 szintekkel	34
6.3.3. RAAS gátló terápia hatása a keringő ACE2 aktivitásra magas vérnyomással bíró betegekben	35
6.3.4. ACE gátló terápia ACE- és ACE2 aktivitásértékekre gyakorolt hatásának vizsgálata	36
7. Megbeszélés	38
7.1. Genotípus függő keringő- és szöveti ACE vizsgálata	38
7.2. Az ACE2 jelentősége a koronavírus pandémia tükrében	42
7.3. Limitációk	46
8. A doktori értekezésben szereplő új tudományos eredmények	47
9. Összefoglalás	48
10. Summary	49
11. Irodalomjegyzék	50
12. Saját közlemények jegyzéke	59
13. Tárgyszavak	61
14. Keywords	62
15. Köszönetnyilvánítás	63

1. Rövidítésjegyzék

AA	- Aldoszteron antagonistá gyógyszereszeresalád
ACE	- Angiotenzin konvertáló enzim
ACE2	- Angiotenzin konvertáló enzim 2
ACEi	- Angiotenzin konvertáló enzim gátló gyógyszer
ACE I/D	- Angiotenzin konvertáló enzim inzerziós-deléziós polimorfizmusa
Abz-FRK (Dnp)-P	- Fluoreszcens ACE szubsztát
Ang1-7	- Angiotenzin 1-7
ARB	- Angiotenzin receptor blokkoló gyógyszereszeresalád
ARNI	- Angiotenzin receptor - neprilizin inhibitor gyógyszereszeresalád
ATII	- Angiotenzin II
ATR1	- Angiotenzin II 1-es típusú receptora
BCA	- Bicinchnonin sav
BMI	- Testtömeg index
BSA	- Szarvasmarha szérum albumin
DMSO	- Dimetil-szulfoxid
ELISA	- Enzim kapcsolt immunoszorbens assay
ESC	- European Society of Cardiology
Fu1	- Tüdőszöveti feltárásból származó felülúszó

Fu2	- Tüdőszövet feltárásából származó 2. felülúszó (pellet mosatása után)
Fu3	- Tüdőszövet feltárásából származó 3. felülúszó (pellet további mosatása után)
HFrEF	- Szívelégtelenség csökkent ejekciós frakcióval
IQR	- Interkvartilis tartomány
MasR	- Mas receptor
Mca-APK(Dnp)	- Fluoreszcensen quenched ACE2 szubsztrát
NEP	- Neprilizin/membrán metallo endopeptidáz/neutrális endopeptidáz
PCR	- Polimeráz-láncreakció
RAAS	- Renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer
SARS-CoV-2	- Súlyos akut légzőszervi szindróma koronavírus-2
SD	- Standard deviáció, a minta szórása
SEM	- Átlagtól való átlagos eltérés, az átlag szórása
SDS	- Nátrium-dodecil-szulfát
TRIS	- Tris (hidroximetil) aminometán

2. Bevezetés

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) kiemelt jelentőséggel bír kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában. A RAAS kóros aktivációja, illetve a következményes neurohumorális diszreguláció számos, népegészségügyi szempontból is jelentős szív- és érrendszeri kórkép kiindulópontját képezi. A RAAS modulálására irányuló eddigi gyógyszeres-klinikai erőfeszítéseink egyértelműen előremutatóak, az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) gátló- és angiotenzin II 1-es típusú receptor I blokkoló (ARB) gyógyszerek által szív- és érrendszeri betegeink életkilátásait közép-és hosszútávon is növelni tudtuk. Az ACE gátlók és az ARB-k önálló vagy kombinált terápiás modalitásként az elsővonalbeli ajánlások között találhatóak kardiovaszkuláris megbetegedésekben (Whelton és *mtsai.*, 2018; Williams és *mtsai.*, 2018; Seferovic és *mtsai.*, 2019).

Az elmúlt évek kutatásai nyomán a kardiovaszkuláris patofiziológiai folyamatok háttérében álló ACE – angiotenzin II (ATII) – angiotenzin II 1-es típusú receptor I (ATRI) tengely mellett az angiotenzin konvertáló enzim 2 (ACE2) jelentősége is előtérbe került (Barrios és Escobar, 2010). Mindemellett a natriuretikus peptidekkel történő szabályozási lehetőség farmakológiai kiaknázása - neprilizin (NEP) gátlókkal és ARB-vel való kombinációban - szintén egyértelműen kedvező irányú hatásokat gyakorol kardiovaszkulárisan terhelt betegeink életkilátására (Volpe és *mtsai.*, 2015; Kuno és *mtsai.*, 2020).

A SARS-CoV-2 kórokozó által kiváltott 2019-ben kezdődő és sajnos napjainkban is komoly egészségügyi problémákat okozó koronavírus pandémia (COVID-19) szintén összefüggést mutat a RAAS rendszerrel (Coto és *mtsai.*, 2021). Kísérleteinkben az ACE/ACE2 enzimek humán szövetekben való eloszlását, szabályozásuk mechanizmusait vizsgáltuk kardiovaszkuláris- és COVID-19 betegeknél.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A humán renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS)

3.1.1. Az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) → angiotenzin II (ATII) → 1-es típusú ATII receptor (ATRI) tengely

A RAAS elvitathatatlan szerepet tölt be szervezetünk só- és folyadékháztartásában, illetve a megfelelő szöveti perfúzió fenntartásában. Egyik legfontosabb tagjának, az ACE-nak felfedezése az 1950-es évek közepére tehető. Ekkor izolálták elsőként a kardiovaszkuláris rendszerben kulcsfontosságú szerepet betöltő molekulát és az ACE gátló terápiát is ekkor alapozták meg (Skeggs és *mtsai.*, 1956).

A RAAS egy kaszkádfolyamat, melynek kiindulási lépése a májban szintetizált angiotenzinogén (ANG), angiotenzin I (ATI) dekaeptiddé való konverziója. Ezen folyamatot a vese juxtaglomeruláris sejtjeiből származó renin katalizálja. A renin felszabadulás fő fiziológiás triggerai a veseperfúzió- és a nátrium-klorid koncentráció csökkenése, illetve a szimpatikus idegrendszeri túlsúly (Fonyó, 2011). A funkcionálisan inaktív ATI, ATII oktaeptiddé történő hasításáért az ACE felelős, mely egy peptidil-dipeptidáz enzim és egyben a kaszkádfolyamat sebességlimitáló tényezője is (Leite és *mtsai.*, 1997). Az ATII, az ATRI-en hatva felelős a RAAS akut- és krónikus patofiziológiai mechanizmusaiért (Fonyó, 2011). Az ATII akut hatásai közé tartozik a nátrium reabszorpció fokozása (ezzel a vértérfogat növelése), a prekapilláris erek vazokonstrikciója, az aldoszteronszekréció- és a szomjúságérzet fokozódása (Fonyó, 2011). Az ATII krónikus hatásai közé sorolható a simaizom sejtek proliferációja, inflammatorikus és a pro-fibrotikus folyamatok (szívizom remodelling) megindulása. A RAAS végponti effektor molekulája a mellékvese kéreg *zona glomerulosa*-jában termelődő aldoszteron. Ezen mineralokortikoid molekula elsősorban a vese epitél sejtjeinek magjában hatva szabályozza - a fentiekkel összhangban - nátrium- és káliumion homeosztázis egyensúlyban tartása által a folyadékháztartást.

3.1.2. Az angiotenzin II (ATII) → angiotenzin konvertáló enzim 2 (ACE2) → angiotenzin (1-7) (Ang1-7) → Mas receptor (MasR) tengely

Az elmúlt évek kutatásai rámutattak, hogy a RAAS eddig ismert klasszikus útvonala mellett egy ellenreguláló (vazodilatatív és reno-protektív) szabályozási kaszkádfolyamat is felfedezhető. Ezen tengely kiindulópontjának az ATII tekinthető. Az ATII az ACE2 által kerül hasításra Ang1-7 heptapeptiddé. Az ACE2 molekula az ACE izoenzime és fő funkciója az ATII → Ang1-7 irányú átalakulás katalízise, továbbá, az ATII → angiotenzin 1-9 irányú átalakulásért is felelős (Iwai és Horiuchi, 2009; Castro-Chaves és *mtsai.*, 2010). Az Ang1-7 molekula a MASR-on hatva az ACE – ATII – ATRI tengely patofiziológiás hatását ellensúlyozza (Gaddam és *mtsai.*, 2014). A szignalizációs kaszkád eredményeképpen anti-proliferatív, vazodilatatív (vérnyomáscsökkentő), anti-inflammatorikus és paraszimpatikus útvonalak nyílnak meg. Kiemelt molekula még ezen alrendszeren belül a neprilizin (NEP). A NEP másnéven membrán metallo endopeptidáz / neutrális endopeptidáz / CD 10 fő funkciója az élettani szempontból előnyös (Ang 1-7 hatásaival megegyező) atriális- és a B-típusú natriuretikus peptid (ANP, BNP) átalakítása inaktív peptidekké, valamint a vazokonstriktor hatású ATII és endothelin I lebontása (Bayes-Genis és *mtsai.*, 2016). A NEP korlátozottan, de szintén képes AT I → Ang1-7 irányú katalízisre. Ezen élettani rendszer kiaknázása és potencírozása, továbbá a NEP gátlására irányuló erőfeszítések szintén a klinikai terápiák sorába emelkedtek, hatásosságukat a mindennapi klinikai gyakorlat igazolta (Volpe és *mtsai.*, 2015; Docherty és *mtsai.*, 2020).

3.2. A RAAS modulálásának terápiás lehetőségei

A RAAS modulálása egyrészt a patofiziológiás tengely gátlásán, másrészt az élettani szempontból előnyös oldal potencírozásán nyugszik. Az ACE → ATII → ATRI tengely gátlása gyakorlati szempontból az egyes katalitikus kulcsenzimek inhibícióját jelenti.

3.2.1. A RAAS vazokonstriktív és pro-fibrotikus tengelyének terápiás lehetőségei

A RAAS gyógyszeres terápiái közül kiemelkedő jelentőségűek az ACE gátlók (ACEi), illetve az ARB-k. Az ACEi-k általánosan elterjedtek szív- és érrendszeri betegek körében. Felszívódásukat a táplálkozás nem befolyásolja (a kaptopril kivételével). Hatásukra csökken a szívre háruló nyomásterhelés, a vértérfogat csökkenése és a vérnyomás csökkenése által. Ezzel javítják a szív diasztolés funkcióját, ami a koronáriakeringésre nézve is előnyös. Az ACEi-k emellett csökkentik a bal-kamra hipertrófia kialakulását és a szimpatikotóniát, valamint fokozzák a nagy- és kiserek tágulékonyságát (Fürost és Gyires, 2011). Javítják a veseperfúziót, csökkentik a renális erek perifériás ellenállását és fokozzák a nátrium ürítést, illetve a kálium visszatartást, melynek következményeként az ACEi-vel kezelt páciensek egy részénél következményes hiperkalémia léphet fel (nemkívtant mellékhatás) (Fürost és Gyires, 2011; Momoniat és mtsai., 2019). Metabolikus oldalról, előnyösen befolyásolják a glükózháztartást, csökkentik az inzulin által potenciálisan kiváltott hipoglikémiát. Humorális oldalról tekintve csökkentik az aldoszteron és a vazopresszin szintjét, fokozzák a jótékony hatású proszttaglandin E2 és a prosztaciklinek szintézisét, illetve növelik a keringő bradikinin plazmaszintjét (Fürost és Gyires, 2011). Mellékhatás tekintetében az előzőekben említett fokozott bradikinin szintézis által a betegek egy részénél száraz köhögés léphet fel (ACE gátló intolerancia), ritkább esetekben hipotónia, angioneurotikus ödéma vagy anémia alakulhat ki (Fürost és Gyires, 2011).

Az ARB-k kardiovaszkuláris hatásprofiljukban nagyban megegyeznek a fentebb vázolt ACE gátlókra jellemző képpel. Indikációjuk tekintetében a klinikai gyakorlat alapján fiatalabb, túlsúlyos betegeknél (*telmisartan*), ACE gátló intolerancia fellépése esetén, illetve 2-es típusú cukorbetegség nefropátiával szövődött eseteiben, mind preventív, mind protektív céllal adhatóak (Fürost és Gyires, 2011). Az ACE gátlók vagy ARB-k közkedvelten alkalmazottak a kombinációs terápia részeként kacsdiuretikumokkal, kalciumcsatorna

blokkolókkal. ACE gátlók és ARB-k együttes használata erőteljes vérnyomás csökkentő, illetve vesefunkció rontó hatásuk miatt egyértelműen kontraindikált.

A klinikai gyakorlatban a vérnyomás csökkentő és szívelégtelenség elleni terápia részeként járulékosan alkalmazott gyógyszerek sorába tartoznak az aldoszteron antagonisták (spironolakton és eplerenon). Az aldoszteron antagonista gyógyszerek a sejtmagban található mineralokortikoid receptor szelektív gátlói. Hatásukra csökken az aldoszteron hormon kötődése (hatása), ami által gátlódik az aldoszteron-függő Na^+ - K^+ pumpa aktivitás a vese disztális tubulusaiban (Batterink és *mtsai.*, 2010). A RALES tanulmány adatai alapján kongesztív szívelégtelenségben, csökkent ejekciós frakciójú szívelégtelenségben (HFrEF) a standard terápiához adott 25 mg spironolakton pozitívan befolyásolta a halálozást és a kórházi kezelést (hospitalizációt) (Zannad és *mtsai.*, 2000).

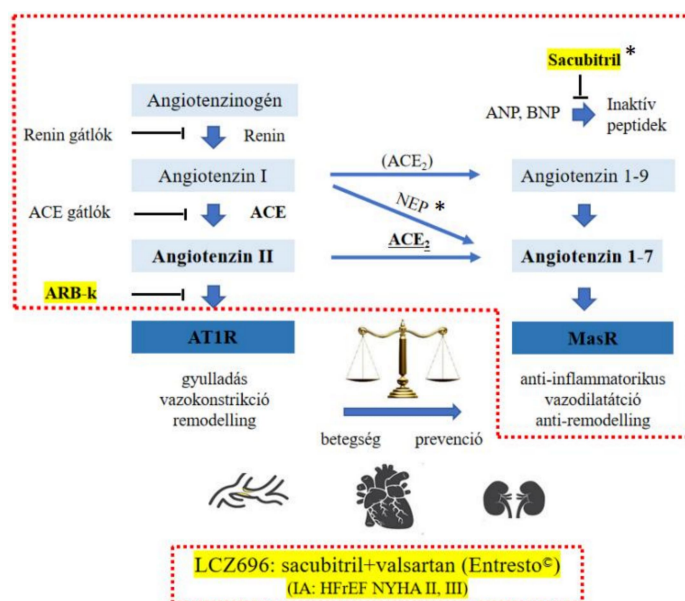
A (közvetlen) renin inhibitor gyógyszerek (*aliskiren*) terápiás alkalmazása a mindennapos klinikai gyakorlatban meglehetősen ritka erőteljes vérnyomáscsökkentő hatásuk miatt (Barrios és Escobar, 2010). ACE gátlóval vagy ARB-vel való kombinációjuk kifejezetten ellenjavallt (European Medicines Agency).

3.2.2. A RAAS vazodilatatív és reno-protéktív tengelyének terápiás lehetőségei

A RAAS protektív ágának farmakológiai befolyásolása a biztató transzlációs kutatási irányvonalak közé tartozik. A gyógyszeres terápiák egyrészt az $\text{ATII} \rightarrow \text{Ang1-7}$ átalakulás elősegítését, illetve az ACE2 molekula közvetlen alkalmazását, illetve aktivitásának fokozását helyezik előtérbe. Konkrét (jelenleg még experimentális cipőben járó) terápiás irányvonalak közül említést érdemel a rekombináns humán ACE2 és/vagy Ang1-7 inhalatív, esetleg parenterális alkalmazása állatmodellekben, illetve az ACE2 aktivátor ágensek fejlesztése (*dimenazene aceturate*) (Qi és *mtsai.*, 2013; Patel és *mtsai.*, 2017; Cao és *mtsai.*, 2019; Miller és *mtsai.*, 2020). Az ACE2 direkt alkalmazása pulmonális hipertóniában a klinikai

gyakorlatban az eddigi tapasztalatok alapján szintén ígéretesnek bizonyult (Rathinasabapathy és mtsai., 2018).

A reno-protéktív tengely előnyeinek kiaknázásában, az angiotenzin receptor blokkoló *valsartan* és a neprilizin enzim gátló *sacubitril* kombinációs terápiája (ARNI) rendkívül sikeresnek bizonyult. A gyógyszeres terápia LCZ696 néven vált elsőként ismertté, későbbiekben „*Entresto*” gyártói név alatt vonult be a kardiovaszkuláris gyógyszerek tárházába (Solomon és mtsai., 2012). Az *Entresto*-val végrehajtott dupla-vak, randomizált PARADIGM-HF klinikai tanulmány és az Európai Kardiológiai Szövetség (ESC) ajánlása alapján kijelenthető, hogy az ARNI HFrEF betegek teljes spektrumában biztonságosnak, effektívnek és *superior*-nak bizonyult az ACE gátló gyógyszer családdal felett (McMurray és mtsai., 2013; Böhm és mtsai., 2017). Alkalmazásuk indikált optimális ACE gátló, béta-blokkoló és mineralokortikoid receptor antagonistá mellett panaszos HFrEF betegek körében, NYHA II. funkcionális osztálytól súlyosabb állapotban. Összességében elmondható, hogy az ARNI a jövőben potenciálisan kiválthatja az ACE gátlók alkalmazását HFrEF-ben (1. ábra) (McMurray és mtsai., 2013; Nyolczas, 2017).



1. ábra. A RAAS patofiziológiai és reno-protéktív tengelyei, illetve ezen tengelyek terápiás befolyásolásának lehetőségei. A Sacubitril NEP gátlása csillaggal jelölve.

3.3. Az angiotenzin konvertáló enzimek eredete, a keringő ACE és ACE2 forrásai

A keringő ACE eredetét tekintve évtizedek óta tankönyvi dogmaként deklarált állásfoglalás, hogy a keringésben jelen lévő, enzimatikusan aktív ACE a tüdő parenchyma kapillárisainak endotél felszínéről szecernálódik a humán véráramba (Fonyó, 2011). Ezen képet árnyalja a Humán Protein Atlasz online adatbázis hiteles és szerteágazó analízise (*The human protein atlas consortium*, 2022c). A Humán Protein Atlasz egy 2003-ban alapított, minden naptári évben frissülő, svéd kezdeményezésű, *open access* adatbázis, mely modern molekuláris biológiai módszerek (tömegspektrometria, immunhisztokémia, proteomika, „OMIC” -ok) segítségével térképezi fel szisztemásan az emberi testet felépítő fehérjéket. Elemzéseik és méréseik összegzése alapján elmondható, hogy protein és mRNS szinten is az ACE legnagyobb mennyiségben a gasztrointesztinális rendszerben van jelen, ezt követi a kiválasztó szervrendszer, illetve a genitáliák szöveti expressziója és ezektől jelentősen elmarad a tüdőszövetben megfigyelhető expresszió (*The human protein atlas consortium*, 2022a).

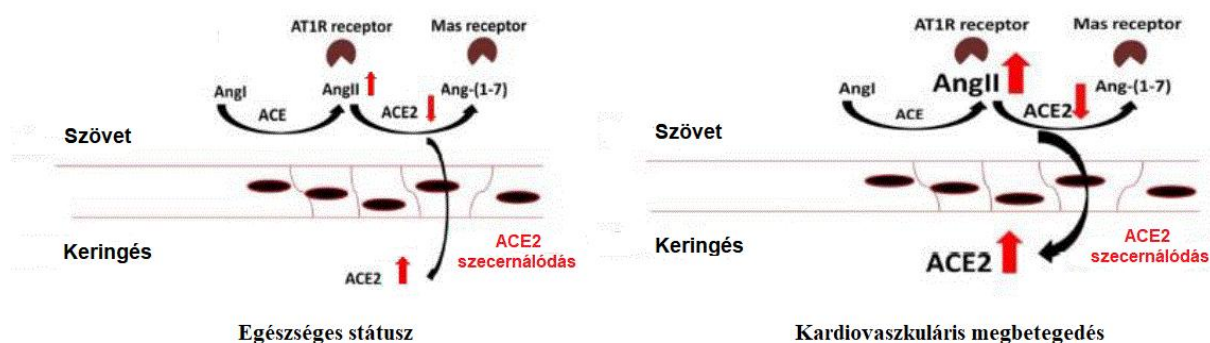
Az ACE2 tekintetében a kép hasonló irányvonalat mutat. Elmondható, hogy mind mRNS, mind protein alapú expressziós profil tekintetében az ACE2 jelentős szöveti expressziót mutat a gasztrointesztinális- és kiválasztó szervrendszerben, illetve magában a szívizom szövetben. Tüdőszövet tekintetében az ACE2 esetében mindössze alacsony mértékű expresszióról beszélhetünk (*The human protein atlas consortium*, 2022b).

3.4. Szöveti (lokális) RAAS rendszerek

A keringő RAAS rendszeren túl egyes kitüntetett szervrendszerek egyedi RAAS metabolizmussal bírnak. A klasszikus renális lokalizáció mellett kiemelendő a kardiális, gasztrointesztinális, germinális és idegrendszeri RAAS rendszerek jelentősége.

Munkacsoportunk az elmúlt évek során a keringő ACE2 patofiziológiai szerepét részletesen vizsgálta. Emberekben az ACE és az ACE2 között érzékeny egyensúly áll fenn, mely HFrEF-ben felborul (Hanafy és mtsai., 2011; Wang és mtsai., 2015).

Kutatásaink eredményei alapján elmondható, hogy a HFrEF egyre előrehaladottabb funkcionális stádiumaiban a keringésben jelen lévő ACE2 szintje emelkedő tendenciát mutat (Uri és mtsai., 2016). Ez arra enged következtetni, hogy HFrEF-ben megfigyelhető patológias történések hatására az ACE2 a keringésbe szecernálódik, ennél fogva biomarkerként is értelmezhető ezen kórképben (2. ábra).



2. ábra. Az ACE2 szecernálódás hipotézise fiziológiás státuszban és kardiovaszkuláris megbetegedés során. (Ábra Uri és mtsai., 2014 közleményéből, módosítással.)

A gasztrointesztinális rendszerben jelen lévő kiugró mértékű ACE és ACE2 expresszió oka jelenleg még pontosan nem tisztázott és kutatása pionír területnek számít. Egyes kutatók az ACE2 szerepét vetítik előre egyes esszenciális aminosav felvételi folyamatokban, illetve a mikrobiommal való szorosabb együttműködés terén (Hashimoto és mtsai., 2012; Cole-Jeffrey és mtsai., 2015).

A férfi- és női germinális rendszer RAAS rendszere kulcsfontosságú szerepet tölt be a humán spermiumok, illetve oociták érési folyamatában. Elmondható, hogy a germinális ACE strukturálisan is eltér a keringésben jelen lévő klasszikus ACE-től (Nadaud és mtsai., 1992; Hagaman és mtsai., 1998).

A központi idegrendszerben a RAAS szerepe igazolt egyes motoros, kognitív és érzelmi/viselkedési mechanizmusokban, továbbá neuropszichiátriai kórképekben, úgy mint, Alzheimer-, Parkinson kór, skizofrénia és affektív zavarok (Wright és *mtsai.*, 2013).

3.5. Angiotenzin konvertáló enzimek funkcionális polimorfizmusai

Az ACE protein genotípusos expressziója intermediér öröklésmenten által meghatározott módon regulálódik és polimorfizmust mutat a keringésben. Az ACE gén (17q23) 16-os számú intronjában található 287 bázispárnyi inzert jelenléte (I) vagy hiánya (D) alapján megkülönböztetünk II, ID, DD genotípusokat (Rigat és *mtsai.*, 1990). A DD allél jelenléte esetén magas keringő ACE expresszió és ezzel együtt járulékosan magasabb kardiovaszkuláris kockázatot feltételeztek. Az II allél esetében relatíve (DD genotípushoz viszonyítva) alacsony expresszió figyelhető meg, az ID allél jelenléte pedig egy köztes mértékű relatív expressziót és kardiovaszkuláris kockázatot hordoz magával (Gardemann és *mtsai.*, 1998; Chang és *mtsai.*, 2010). Az ACE gén polimorfizmusának fentebb leírt asszociációját számos kardiovaszkuláris betegséggel kapcsolatba hozták (Bartoli és *mtsai.*, 2007; Dai és *mtsai.*, 2019; Hussain és *mtsai.*, 2020). Az ACE-gén polimorfizmusa az ACE gátló terápiára adott választ érdemben befolyásolja: II homozigóta páciensek esetében a gyógyszeres terápia hatékonyabbnak bizonyul (Ueda és *mtsai.*, 1998).

Az ACE2 gén polimorfizmusainak felderítése terén tömegspektrometriai mérések segítségével 3 különböző ACE2 genotípus (rs4240157, rs4646155 és rs4830542) variánst azonosítottak, melyek szoros asszociációt mutattak esszenciális hipertónia, pitvarfibrilláció és bal kamra remodelling gyakoribb előfordulásával kardiovaszkulárisan terhelt, kínai (Han) betegek kohortjában (Luo és *mtsai.*, 2019). Az ACE2 receptor polimorfizmusa az elmúlt pár év „*hot-spot*”-jává vált az ACE2 receptor és a SARS-CoV-2 vírus szoros asszociációjának felismerése nyomán. Kristály-elektronmikroszkópai mérésekre alapozva, biokémiai esszék segítségével igazolták a K31R és az E37K ACE2 receptor variáns csökkent és a K26R, illetve

a T92I variáns fokozott affinitását SARS-CoV-2 tüskeproteinjével, vadtypusú ACE2 receptorhoz viszonyítva (Suryamohan és *mtsai.*, 2021).

3.6. A SARS-CoV-2 bemutatása

A 2019 második felében kitört és napjainkban is súlyos népegészségi problémákat okozó SARS-CoV-2 vírus pandémia szoros összefüggést mutat a RAAS rendszerrel (Ingraham és *mtsai.*, 2020). A kórokozó világméretű elterjedése nyomán több millió emberélet veszett oda és mind gazdasági, mind egészségügyi szempontból hatalmas kihívásokkal szembesültünk az elmúlt évek során. A koronavírusok (*Coronaviridae*) madarakban, emlősökben, kételtűekben megtalálható burkos-lipides (peplonos), pozitív szálú RNS vírusok családjába tartozó, magas fertőzési potenciállal- és mutációs rátával bíró kórokozó. A koronavírusok lipid burkának külső felszínén relatíve nagy (20 nm) nyúlványok/tüskék találhatók, melyekről a vírusszalád nevét kapta, napkoronára emlékeztető morfológiája által (Siddell és *mtsai.*, 1983; Chen és *mtsai.*, 2020). A koronavírusok fertőzőképességének hajtóereje a genetikai sokszínűség fenntartása RNS alapú rekombináció által. Kutatómunkám szempontjából is nagy relevanciával bíró tudományos megfigyelés, hogy a koronavírusok sejtfelszíni kapcsolódása és internalizációja az extracellulárisan jelen lévő ACE2 molekula által valósul meg (Zhang és *mtsai.*, 2020).

A vírusfertőzés által fellépő betegség az influenzához hasonló kórképet (láz, szag- és ízérzékelés csökkenés, köhögés, torokfájás) alakít ki a humán szervezetben, viszont influenzával összevetve a koronavírus fertőzéshez kapcsoló halálozási számok egyértelműen magasabbak (Piroth és *mtsai.*, 2021). A magasabb halálozás hátterében az immunrendszer kórosan fokozott válaszreakciója valószínűsíthető. A vírusfertőzés nyomán fellépő panaszok érzékenyen érintik a humán tüdőszövetet (is). Aktív koronavírus fertőzés esetén képzakodó modalitásokkal bizonyított tény, hogy a kórokozó destruálja a humán tüdőszövetet és sejtfelszíni kapcsolódása által ARDS-hez hasonló klinikai képet alakít ki, mely az esetek

jelentős részében invazív (CPAP, BIPAP) lélegeztetést tesz szükségessé. Továbbá bronchoalveoláris mosófolyadékban a kórállapottal összefüggő (növekvő mértékű, bizonyos esetekben kiemelkedően nagy) ACE2 aktivitás tapasztalható, mely egyfajta intrinzik, nem specifikus védelmi mechanizmusként értelmezhető koronavírus fertőzés során (Oranger és *mtsai.*, 2020).

4. Célkitűzések

4.1. Szöveti- és keringő ACE vizsgálata humán tüdőszövetben és szérumban

Célul tűztük ki, mellkassebészeti műtéten átesett betegek populációján megvizsgálni, hogy a keringésben jelen lévő, genotípusosan (II, ID, DD polimorfizmusok által) meghatározott ACE aktivitás- és expresszió a tüdőszövetből származik-e? Célul tűztük ki továbbá a humán szöveti ACE szöveti endogén regulációjának vizsgálatát. Ehhez egy adekvát és hiteles ACE extrakciós protokoll kidolgozása is indokolt volt.

4.2. Angiotenzin konvertáló enzim 2 (ACE2) aktivitásának és expressziójának vizsgálata kardiovaszkulárisan terhelte betegeken

A SARS-CoV-2 kórokozó sejtfelszíni receptoraként működő ACE2 aktivitásának és expressziójának meghatározása, illetve ezen értékek összevetése kardiovaszkulárisan terhelte betegek csoportjaiban. Vizsgálni terveztük az alkalmazott ACE gátló terápia ACE2 aktivitási- és expressziós szintekre való hatásának vizsgálatát szív- és érrendszeri betegek vérében és szöveteiben.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Humán szív- és tüdőszövet bank

A humán tüdőszövetben és a keringésben jelen lévő ACE vizsgálata a Debreceni Egyetemen, a Mellkassebészeti Tanszékkal való közös munka keretében valósult meg. A tüdőszöveti minták mellkassebészeti műtéten átesett (2015-2017 közötti, többségében adenokarcinomával diagnosztizált, n=108) betegekből származnak. A rezekált szövetek a tumorról infiltrált rezekciós szélétől távolabb eső, fiziológiás struktúrát mutató szövetdarabokat reprezentálják. A szövetmintákon túl minden egyes páciens esetében vérminták (teljes vér, szérum) is vizsgálatra kerültek. A klinikai adatgyűjtés etikai engedélyeztetése a kutatásetikai elveknek megfelelően a Magyar Egészségügyi Tudományos Tanács által megtörtént, a kutatási etikai engedély száma: 20753-7/2018/EÜIG.

A Semmelweis Egyetem Városmajori Szívcentrumával való együttműködés keretében szívtranszplantáción átesett betegek explantált szív- és szérummintáit használtuk fel az ACE2 és a koronavírus pandémia összefüggésének vizsgálatához. ⁽⁸⁰⁾ Kutatásetikai engedélyeztetési szám: ETT TUKEB 7891/2012/EKU (119/PI/12.)

Minden fent említett minta esetében a tárolás mélyfagyasztással -80 Celsius fokon valósult meg, továbbá minden beválasztásra került páciens - a Helsinki Nyilatkozat alapelveit szem előtt tartva – írásos beleegyezését adta a vér- és szövetminták kutatási célú felhasználására. A bevont betegeink klinikai adatait az 1. és 2. táblázat rögzíti.

Klinikai adatok	Végstádiumú szívelégtelen betegek	Mellkassebészeti műtéten átesett betegek
Bevont betegek száma	72	108
Kor (medián ± IQR)	57,0 ± 11,8	62,6 ± 13,2
Nem arány (nő/férfi)	54/18	37/71
Testtömeg index (medián ± IQR)	25,99 ± 6,48	N/A
Cukorbetegség (%)	27	10
Iszkémiás szívbetegség (%)	38	17
Dilatatív szívelégtelenség (%)	92	N/A
Bal kamrai ejekciós frakció (medián ± IQR)	57,0 ± 11,75	N/A
Szívelégtelenség (%)	100	10
NYHA státusz (II/III/IV)	3/36/33	N/A
ACE gátló kezelés (%)	0	51

1. táblázat. A keringő és szöveti ACE vizsgálatába bevont betegeink klinikai adatai.

	Egészséges	Páciensek magas vérnyomás betegséggel			Betegek tüdőbetegséggel			Végstádiumú szívelégtelen betegek				
		ACEi	ARB	RAAS med. nélkül	ACEi	ARB	RAAS med. nélkül	ACEi	ARB	AA	RAAS med. nélkül	
Bevont egyének száma (n)	46	386	71	43	24	7	18	200	54	23	19	
Nem (férfi/nő; n)	21 / 25	230 / 156	39 / 32	18 / 25	19/5	5 / 2	14/4	157 / 43	40 / 14	15 / 8	16 / 3	
Kor (évek, átlag ± SD)	30 ± 9	62 ± 10	60 ± 9	59 ± 14	67 ± 8	63 ± 6	55 ± 16	52 ± 10	56 ± 8	51 ± 12	53 ± 12	
Testtömeg (kg, átlag ± SD)	78 ± 6	83 ± 17	89 ± 17	78 ± 14	78 ± 13	80 ± 10	70 ± 17	79 ± 14	81 ± 14	78 ± 16	80 ± 17	
Testmagasság (m, átlag ± SD)	1,8 ± 0,03	1,68 ± 0,09	1,68 ± 0,08	1,68 ± 0,08	1,69 ± 0,07	1,70 ± 0,07	1,72 ± 0,08	1,74 ± 0,09	1,74 ± 0,09	1,73 ± 0,09	1,74 ± 0,09	
BMI (kg/m ² , átlag ± SD)	25 ± 4	29 ± 5	31 ± 5	28 ± 4	27 ± 5	28 ± 4	23 ± 5	26 ± 5	27 ± 5	26 ± 5	26 ± 5	
Dohányzás (%)	NA	16	10	14	21	29	44	NA	NA	NA	NA	
Diabétesz (NIDDM/IDDM)	0 / 0	18 / 5	28 / 10	14 / 2	4 / 2	0 / 1	0 / 0	3 / 47	1 / 10	0 / 2	1 / 3	
Ejekciós frakció (%; átlag ± SD)	62 ± 2	54 ± 8	56 ± 8	59 ± 7	60 ± 8	62 ± 4	61 ± 6	23 ± 8	23 ± 6	23 ± 11	22 ± 11	
Szívfrekvencia (ütés/perc, átlag ± SD)	79 ± 11	73 ± 12	72 ± 13	77 ± 11	73 ± 12	78 ± 12	79 ± 14	78 ± 15	74 ± 13	82 ± 16	82 ± 14	
Szisztolés vérnyomás (mmHg, átlag ± SD)	123 ± 11	134 ± 19	134 ± 18	128 ± 16	134 ± 15	137 ± 15	133 ± 21	NA	NA	NA	NA	
Diasztolés vérnyomás (mmHg, átlag ± SD)	80 ± 10	80 ± 13	81 ± 10	80 ± 9	80 ± 9	83 ± 10	82 ± 8	NA	NA	NA	NA	
Antihipertenzív medikáció	Diuretikum (%)	0	55	60	5	54	0	0	94	96	100	47
	β-Blokkoló (%)	0	84	79	79	83	43	11	67	68	39	16
	α1-gátló (%)	0	7	7	5	8	0	0	0	0	4	0
	ACE-gátló (%)	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	0
	ARB (%)	0	1	100	0	0	100	0	2	100	0	0
	Kalcium csatorna blokkoló (%)	0	37	48	21	46	14	11	3	4	0	0
	Imidazolin agonista	0	2	6	0	0	0	0	0	0	0	0

2. táblázat. Magas vérnyomás betegséggel, szívelégtelen és tüdőbetegséggel karakterizált betegek deskriptív klinikai adatai. Demográfiai, kardiológiai paraméterek összevetése.

5.2. Az ACE inzerció/deléción polimorfizmusának meghatározása

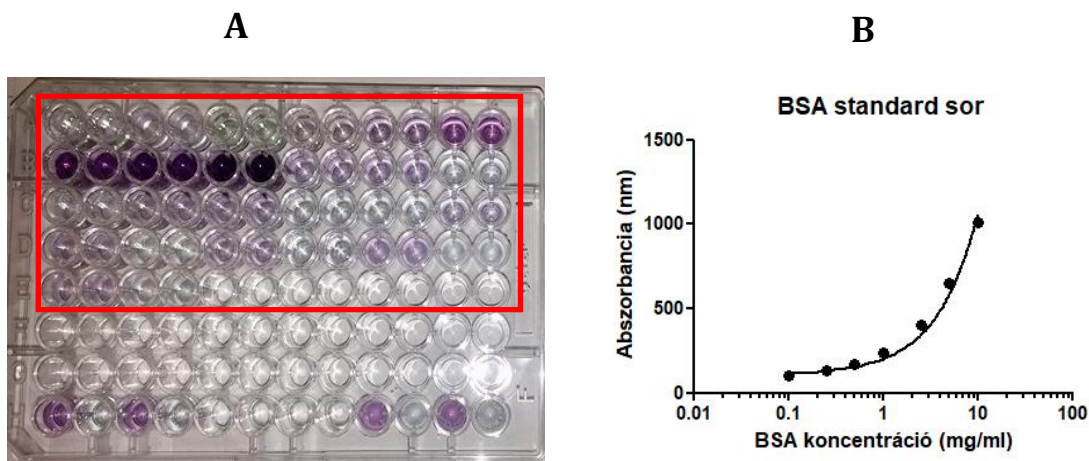
A genotípus meghatározás betegek perifériás véréből, kereskedelmi forgalomban kapható DNS izoláló kit (FlexiGene; Qiagen GmbH, Hilden, Germany) segítségével, PCR technikával valósult meg. Az amplifikáció során használt „forward” (CTGGAGACCACTCCCACTCTTTCT) és „reverse” (GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT) primerek segítségével az előzőekben már munkacsoportunk által ismertett módon végeztük a kísérleteket. Amplifikációt követően a PCR termékek 3%-os poliakrilamid gélen történő elektroforetikus szeparáción és *SybrSafe* festésen estek át.

5.3. Szövetfeldolgozás ACE aktivitás és expresszió meghatározáshoz

A folyékony levegőben fagyasztott, majd mélyfagyasztott humán tüdő- és szív mintákat folyékony nitrogén alatt, mozsárban, mozsártörővel törtük. Az így kapott kisebb szövetdarabok minden grammjához (nedves súly) 5 ml, 100 mM TRIS-HCl, pH 7,0 puffer került hozzáadásra (jéghidegen). A minták ezek után forgókéses homogenizálásra (Bio-Gen PRO200, PRO Scientific, Oxford, CT, USA) majd centrifugálásra kerültek (16 100 g 5 percen át). Az így kapott felülúszókat mélyfagyasztottuk a biokémiai mérések elvégzéséig.

5.4. Fehérjemeghatározás és fehérjenormalizálás

Az egyes szövetekből származó felülúszók eltérő fehérjemennyisége indokolta a fehérje meghatározás, illetve normalizálás alkalmazását *bicinchoninic* sav (BCA) esszé szerint, standard marha szérum albumin (BSA) hígítási sorra interpolálva. Megfelelő hígítások alkalmazásával mintáinkat 1 mg/ml-re hígítottuk egységesen az enzim aktivitás mérések előtt (3A, 3B ábrák).



3. ábra. Fehérjemeghatározás a gyakorlatban.

Demonstratív BCA esszé abszorbanca *plate*-ben. (A) BSA referenciagörbe proteinmennyiség kalkulálás során. (B)

5.5. ACE aktivitás meghatározás

Szöveti- és keringő ACE aktivitásmérést munkacsoportunk az előzőekben már publikáltak szerint végezte (Kovács és *mtsai.*, 2016). A mérések *quenched*, fluoreszcens Abz-FRK(Dnp)P-OH ACE szubsztrát felhasználásával, kinetikus esszé segítségével történtek. A mérési elegy összetétele: 0,6 V/V% Triton X-100 tartalmú 100 mM TRIS-HCl, pH 7,0, 50 mM NaCl, 10 μ M ZnCl₂, 10 μ M Abz-FRK(Dnp)P-OH plusz tetszőleges mennyiségű, proteinmennyiségre BCA esszé segítségével normalizált szövetminta vagy szérum. Az aktivitás meghatározás 37 Celsius fokon, fluoreszcens plate reader (NovoStar, BMG Labtech, Ortenberg, Germany) segítségével, 340 nm-es excitációs és 405 nm-es emissziós érték mellett történt. Az egyes méréseket akkor fogadtuk el értékelhetőnek, ha lineáris regressziót követően a kapott egyenesek illeszthetősége (r^2) jobb volt, mint 0,9. Az ACE aktivitás értékek konkrét meghatározása a fluoreszcens intenzitásértékek abszolút növekedésének és a kalibrációs Abz fluorofór intenzitásnövekedés referenciagörbéjének összevetésével határoztuk meg.

5.6. ACE2 aktivitás meghatározás

A keringő, illetve szöveti ACE2 aktivitások meghatározása Mca-APK(Dnp) *quenched*, fluoreszcens szubsztrát segítségével valósult meg, az előzőekben munkacsoportunk által már publikáltak szerint (Fagyas és *mtsai.*, 2014a; Uri és *mtsai.*, 2014). A mérési elegy összetétele (200 µl): 20 µl szérum/szövetminta, 80 µl mintahígító puffer (szérum esetében: 75 mM TRIS HCl, pH 6.5 és proteáz inhibitor koktél; szövetminták esetében az előbbi pufferhez 0,6 V/V% Triton X-100 is hozzáadásra került) és 100 µl (50 µM) ACE2 specifikus fluoreszcens szubsztrát [Mca-APK(Dnp)]. A mérési elegy (mintahígító pufferhez adagolva) proteáz inhibitorokat tartalmazott, mely összetétele: 10 µM Bestatin-HCl, 10 µM Z-prolyl-prolinal (Enzo Life Science, Exeter, UK), 5 µM Amastatin-HCl, 10 µM Kaptopril. Az ACE2 nem-specifikus aktivitásértékek meghatározása 1,25 µM véghígítású MLN-4760 (specifikus ACE2 gátló) mellett valósult meg.

A mérések kivitelezése 96 lyukú mikroplaten történt (Greiner Bio-One, Frickenhauser, Germany) 340 nm-es excitációs és 405 nm-es emissziós érték mellett az ACE mérésnél már említett NOVOSTar fluoreszcens *Plate Reader* segítségével. Az ACE2 enzim aktivitások nominális értékét a fluoreszcens intenzitásértékek lineáris regressziójával határoztuk meg az Mca-APK(Dnp) fluoreszcens szubsztrát intenzitásnövekedésének referenciagörbéjével való összevetés után ($r^2 > 0,9$) feltétel teljesülése mellett 37,0 Celsius fokon.

5.7. ACE és ACE2 expresszió (koncentráció) meghatározása

Az ACE és ACE2 fehérjék mennyiségi meghatározása szendvics alapú enzim kapcsolt immunoszorbiens esszé (ELISA) segítségével történt a forgalmazó iránymutatásainak megfelelően (DY929 és DY933-05, R&D Systems, McKinley Place, MN, USA). Megfelelő koncentrációjú *capture* antitest *overnight* inkubálását követően a visszamaradt kötőhelyeket Dulbecco's foszfát puffer sóoldatban feloldott 10 mg/ml végkoncentrációjú marha szérum

albuminnal blokkoltuk. A minták (tüdő, szív és szérum) hígítása megegyező oldatban az értékelési szempontból előnyös, a standard sor középtartományába eső hígítási arányban valósult meg. A minták felvitelét és egy órás inkubációját és mosatását követően, a *microplate*-re (Greiner Bio, PS Microplate, Microlon®, Nr. 655061) felvitelre kerültek a primer antitestek. Kettő órás inkubációt és ezt követő mosást követően biotinnal jelölt detekciós antitesteket alkalmaztunk. Újabb kettő órás inkubációt és mosatást követően pedig 20 perc erejéig 200-szoros hígítású streptavidin-torma peroxidáz oldattal tettük lehetővé az immunkomplexek detektálását. Ez kromogén szubsztrát (0,3 mg/mL 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, 0,1 mM H₂O₂ és 50 mM ecetsav) segítségével valósult meg. A kromogén színreakció megállítása 0,5 mólos sósavoldattal történt. A keletkezett termék detektálása 450 nanométeren NOVOSTar Fluoreszcens *Plate Readerrel* történt. Az ACE vagy ACE2 konkrét mennyiségét a standard kalibrációs görbével való összevetés után (ng/ml) számszerűsítettük.

5.8. Vegyszerek

Az experimentális munka során (amennyiben azt külön nem jelöljük) a Sigma Aldrich által forgalmazott vegyszerek kerültek alkalmazásra.

5.9. Statisztikai analízis

Adataink eloszlásfüggvényének vizsgálata Kolmogorov-Smirnov teszttel történt. Nonparametrikus, Mann-Whitney tesztet végeztünk kettő, nem normáeloszlást mutató csoport összehasonlítása esetében. Több nem normáeloszlást mutató kohort szimultán összehasonlítása során Kruskal-Wallis teszt került elvégzésre post hoc Dunn's teszttel kombinálva. Korrelációs analízisek során Spearman's tesztet végeztünk. A statisztikai analízis GraphPad Prism 5.0 szoftver segítségével (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) történt. Az egyes statisztikai eredményeket $p < 0,05$ érték alatt tekintettük szignifikánsnak.

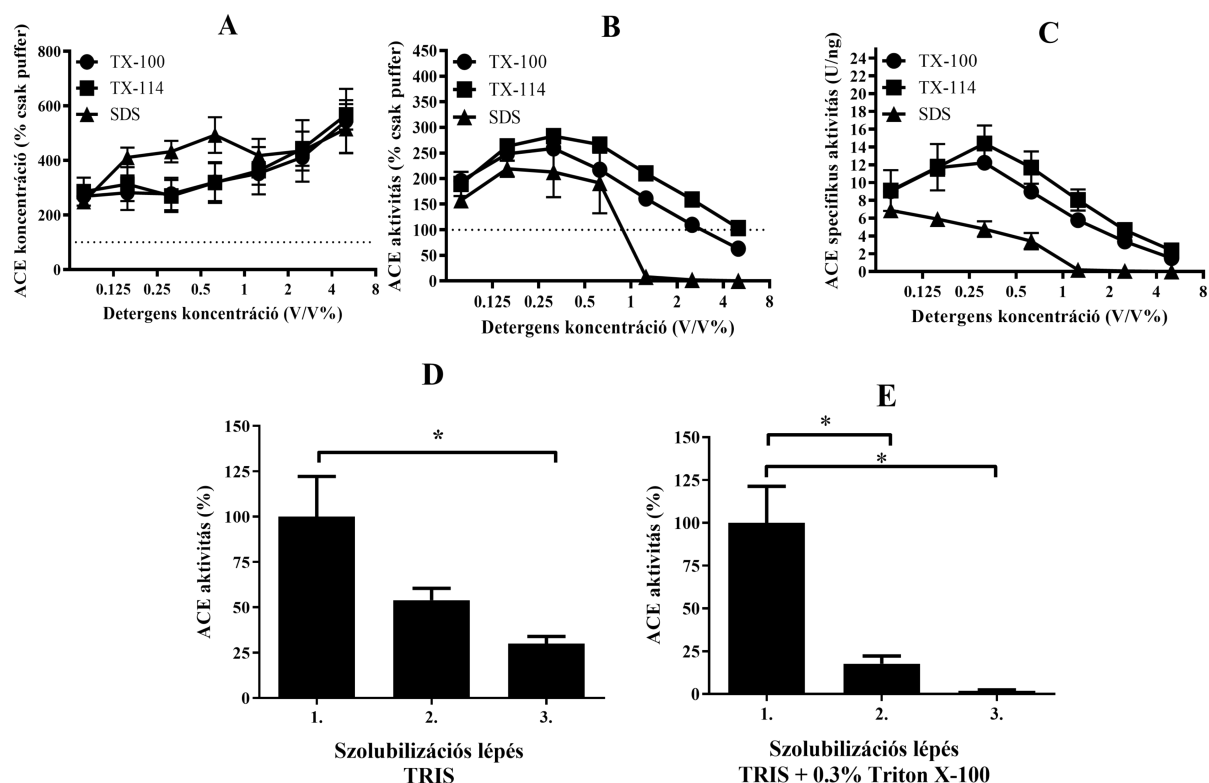
6. Eredmények

6.1. Szöveti ACE extrakciós protokoll

Kutatómunkánk első fő kérdésköre egy hatékony szöveti extrakciós (membrán permeabilizációs) protokoll bevezetését indokolta. Különböző detergenssek (Triton X-100, Triton X-114, SDS) kerültek vizsgálatra 0,06-5,0 V/V% *alkalmazott* koncentráció tartományban. Detergensünk közül első körben az SDS-t ACE aktivitást gátló hatása nyomán elvetettük. Triton X-100 és -114 között érdemi hatásspektrumbeli és effektivitási különbséget nem tapasztaltunk ennél fogva a továbbiakban laboratóriumokban általánosan használt Triton X-100-at alkalmaztuk továbbiakban kísérletes munkánkban. Triton X-100 kezelés hatására a szöveti ACE extrakció 250%-os növekedést mutatott már a legkisebb alkalmazott koncentráció esetében is (4A. ábra). 100%-os („*baseline*”) extrakciónak tekintettük a csupán pufferoldatban megvalósult ACE kivonást. A legmagasabb, 5,0 V/V% koncentrációjú Triton X-100 hatására ötszörös enzimextrakció javulást tapasztaltunk a detergens nélküli TRIS-HCl pufferben való feltáráshoz viszonyítva (4A. ábra). ACE aktivitásértékek terén az extrakciós hatékonyság az előzőektől eltérően alakult. Az aktivitásértékek alacsony koncentrációk esetén erőteljes növekedést mutattak, a maximum értéket 0,3 V/V%-os detergens végkoncentráció esetén tapasztaltuk (megközelítőleg 250%, 4B. ábra). Ezen érték felett a specifikus ACE aktivitásértékek csökkenő tendenciát mutattak, utalva arra, hogy az alkalmazott magasabb Triton X-100 koncentráció ugyan fokozza az ACE extrakciót, de eközben vélhetően gátolja az ACE aktivitást. (4C. ábra)

A szöveti feldolgozást követően a felülúszókból végeztünk ACE aktivitás- és expresszió meghatározást. A visszamaradó szövetpelleket konszekutív jelleggel, két további alkalommal elvégzett detergens kezelésnek vetettük alá. Célunk az extrakciós hatékonyság vizsgálata volt. Elmondható, hogy általános TRIS HCl pufferben végzett feltárást után 20-25%

ACE aktivitás veszteség volt realizálható a 3. újrafeltárást követően is (4D. ábra). 0,6 V/V% Triton X-100 kezelés alkalmazása nyomán a veszteség egyértelműen minimalizálhatóvá vált (az ACE túlnyomó többsége az első feltárást során extrahálódott, 4E. Ábra).



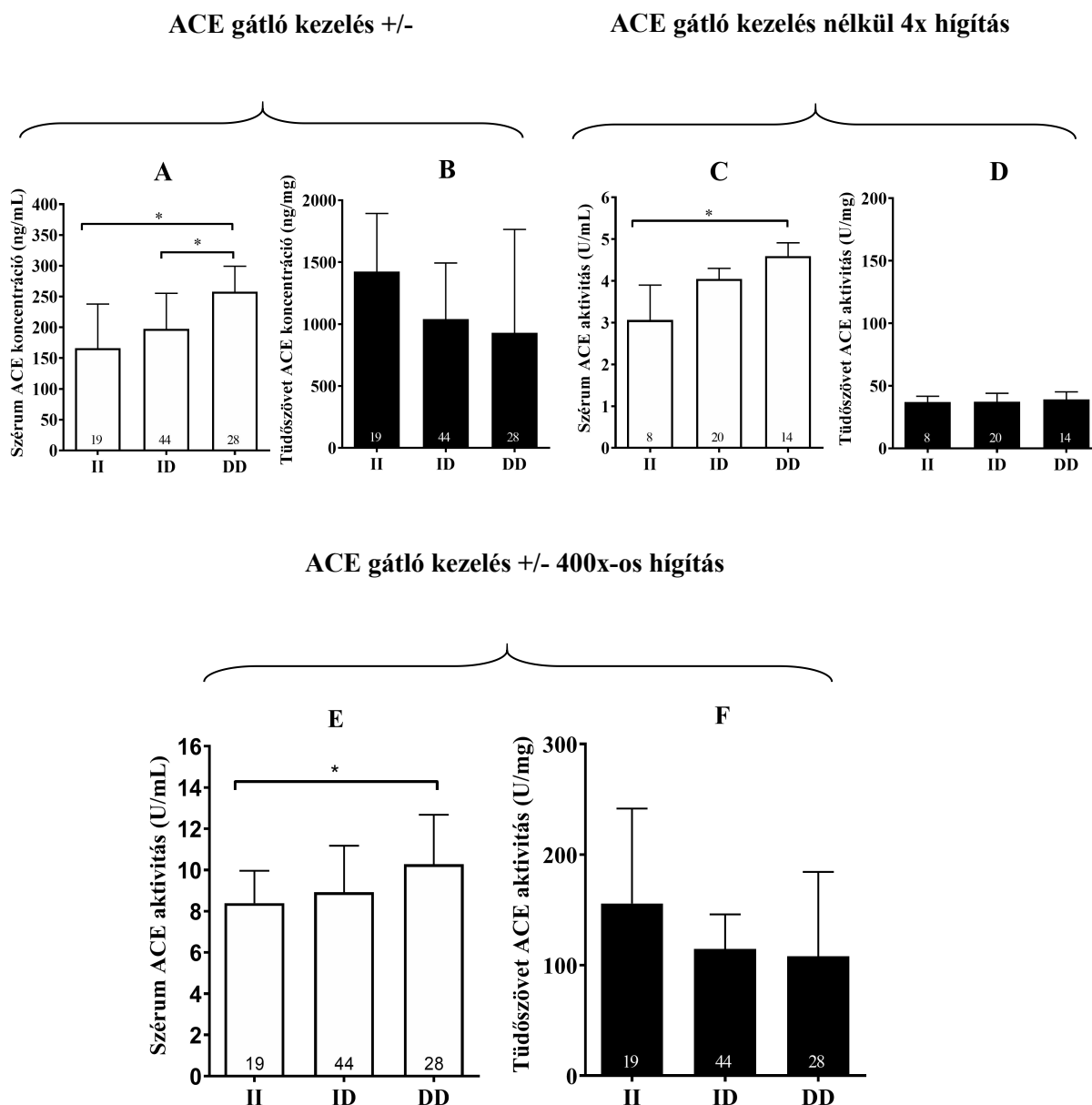
4. ábra. Szöveti ACE extrakciós protokoll. Humán tüdőminták feltárása különböző detergens oldatokban.

A homogenizált szövetmintákból centrifugálás után a felülúszókat 1 mg/ml-re hígítottuk. Az ACE koncentrációmérések ELISA módszerrel (A), az aktivitásértékek meghatározása (B) kinetikus esszével történt. Az 1 ng ACE-ra jutó aktivitásértéket (specifikus aktivitás) a (C) ábra mutatja. Az ACE extrakción átesett szövetminták pelletjeit konszekutív jelleggel két további alkalommal (Fu2 és Fu3) azonos módon elvégzett feltárástak vetettük alá. (D, E) Az ábrázolt, százalékos ACE aktivitások az első felülúszó aktivitásértékéhez viszonyítottan értelmezendők. Szövetfeltárást detergens nélkül (D), puffer plusz Triton X-100 0,3 V/V végkoncentrációban. n = 5-9. A csillaggal jelölt eredmények statisztikailag szignifikánsak ($p < 0,05$).

6.2. Genotípus függő (I/D polimorfizmus) tüdőszöveti és keringő ACE expresszió

Genotípus függő ACE expressziós szint növekedést tapasztaltunk mellkassebészeti műtéten átesett betegek (ACE gátlót szedő pácienseket is ideértve) szérummintáiban (5A. ábra). Elmondható, hogy a DD genotípussal bíró betegek ACE expressziója (258 ± 109 ng/ml) szignifikánsan magasabbnak bizonyult II genotípusú betegek hasonló szérummintáival összevetve (166 ± 143 ng/ml), utalva az I/D polimorfizmus meghatározó genetikai szerepére a keringő ACE expresszió terén. Ugyanezen páciensek tüdőszövetében az ACE I/D polimorfizmusa nem igazolta vissza a keringésben megfigyelteket (szöveti ACE koncentrációk: II: 1423 ± 1276 ng/mg, ID: 1040 ± 712 ng/mg, DD: 930 ± 1273 ng/mg, 5B. ábra). ACE gátlót nem szedő páciensek esetében a D allél jelenléte nyomán szignifikánsan magasabb keringő (szérum) ACE aktivitási szinteket tapasztaltunk (II: $3,1 \pm 1,4$ U/mL, ID: $4,0 \pm 1,4$ U/mL, DD: $5,0 \pm 2,5$ U/mL, 5C. ábra). Az ACE gátlók hatásának kiküszöbölése érdekében, felülűszók magas hígításon történő mérését követően elmondható, hogy (ACE gátló kezelés jelenlététől függetlenül) szignifikánsan magasabb ACE aktivitásértékek mérhetőek DD genotípusú betegek kohortjában II genotípusú páciensekkel összevetve (II: $8,4 \pm 4,9$ U/mL, ID: $8,9 \pm 4,2$ U/mL, DD: $10,3 \pm 3,9$ U/mL, 5E. ábra).

Megegyező betegek tüdőmintáit összevetve nem tapasztaltunk érdemi kapcsolatot a szöveti ACE I/D polimorfizmus és az ACE aktivitások alakulása között (II: 37 ± 18 U/mg, ID: 37 ± 18 U/mg, DD: 39 ± 15 U/mg, 6D. ábra, illetve II: 156 ± 161 U/mg, ID: 115 ± 68 U/mg, DD: 108 ± 121 U/mg, 5F. ábra).



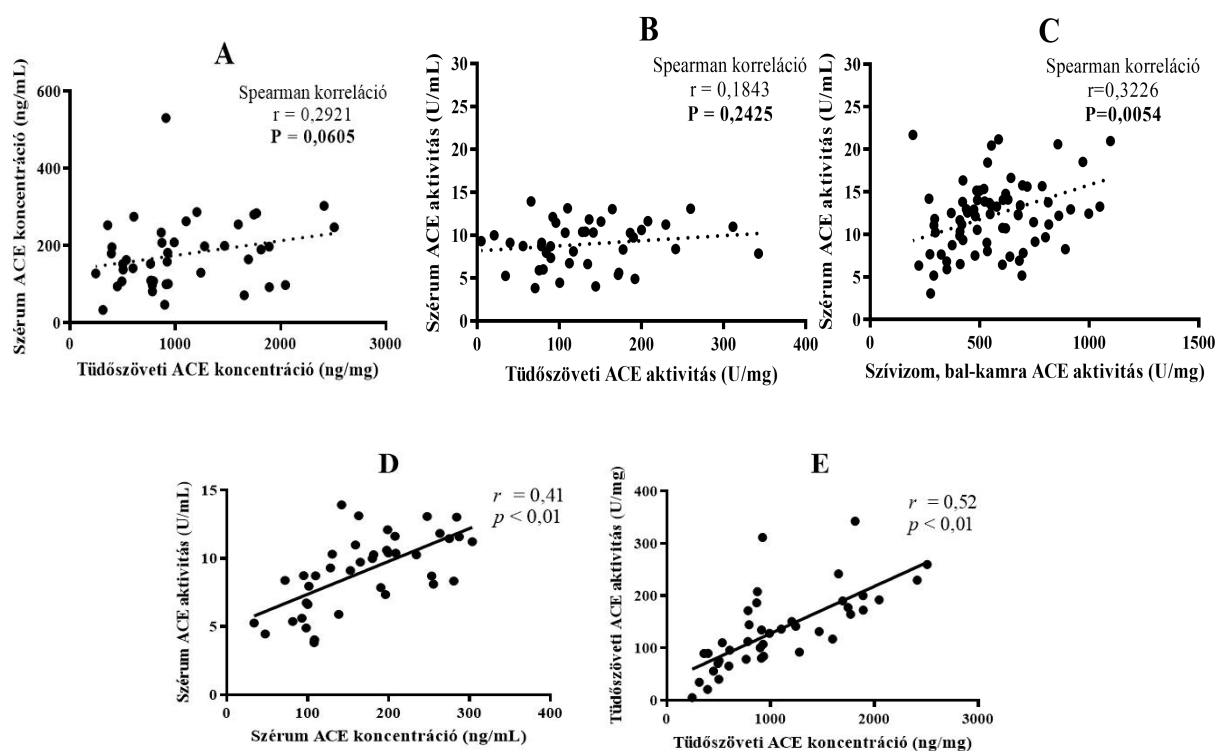
5. ábra. ACE aktivitás és expresszió genotípusos meghatározottságának hiánya humán tüdőszövetben. ACE expresszió értékek humán szérumban és tüdőszövetben.

Az „ACE gátló kezelés +/-” jelölés esetében az ACE gátló terápiában részesülő páciensek is bevonásra kerültek (**A**, **B**). Keringő- és tüdőszöveti ACE aktivitások ACE gátlót nem szedő betegek körében, alacsony hígításon (**C**, **D**). 400x hígításon mért ACE aktivitásértékek (ACE gátlók szerepe kizárva) ACE gátlót szedő, illetve nem szedő pácienseknél (**E**, **F**). Az ábrázolt oszlopok a medián értékeket, a hibavonalak az interkvartilis tartományokat jelölik. Az oszlopokon belüli számok a bevont páciensek számát rögzítik. Az egyes genotípus alcsoportok az oszlopok alatt kerültek jelölésre. A csillaggal jelölt eredmények statisztikailag szignifikánsak ($p < 0,05$).

6.2.1. Szöveti- és keringő ACE aktivitás- illetve expresszióértékek összefüggése

Meglepő módon nem találtunk szignifikáns korrelációt a tüdőszövetben kifejeződő és a keringésben jelen lévő ACE mennyisége között ($p=0,06$, 6A. ábra). Tüdőszöveti és keringő ACE aktivitásértékek terén szintén nem tudtunk érdemleges kapcsolatot kimutatni ($p=0,24$, 6B. ábra). A fentiekkel ellentétben (szívelégtelen) szívizom szöveti- és szérumban ACE aktivitások összevetésében szignifikáns összefüggés figyelhető meg ($p=0,0054$, 6C. ábra).

Az egyes betegek szérummintáiban vagy tüdőszövetében megfigyelhető (ugyanonnan származó) expresszió illetve aktivitásértékek lineáris korrelációt mutattak. ($p<0,01$, 6D-E ábrák).

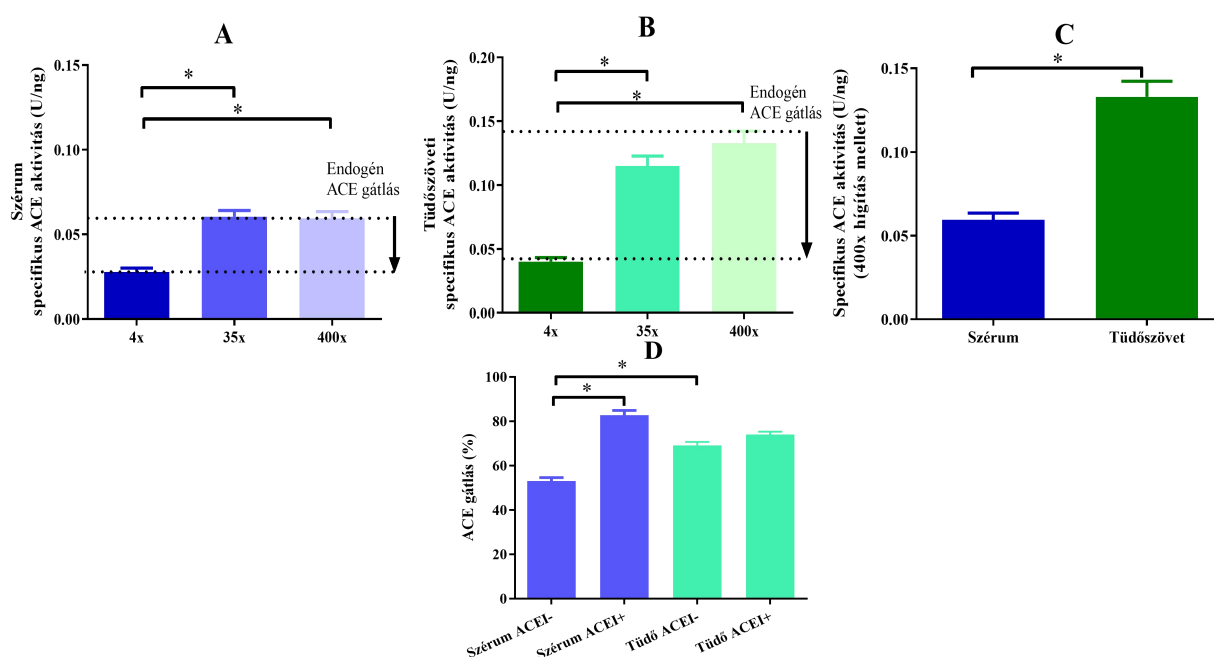


6. ábra. Szöveti, illetve keringő ACE szintek korrelációs analízise.

Szöveti- és keringő ACE expresszió, illetve aktivitásértékek összefüggésének vizsgálata (A, B). Szívizomszöveti (bal kamra) és keringő ACE aktivitások összefüggése (C). Keringő aktivitás- és expresszió, illetve tüdőszöveti aktivitás- és expresszió összefüggésének vizsgálata (D, E). A Spearman korrelációk, statisztikai eredményeit $p<0,05$ érték alatt tekintettük szignifikánsnak ($n=42-75$).

6.2.2. Az endogén gátlás jelentősége humán tüdőszövetben

Jelen tanulmányban a keringő és szöveti összefüggések vizsgálatán túl a felülűszók hígításának hatását is vizsgáltuk. ACE mennyiségre normalizált szöveti- és keringő aktivitásértékek (specifikus aktivitás) szignifikáns növekedését tapasztaltuk hígítás hatására (7A-B. ábrák). 400-szoros hígítási értéken, szignifikánsan alacsonyabb specifikus ACE aktivitás értéket mértünk keringésben tüdőszövettel összevetve. ($0,06 \pm 0,004$ U/ng vs. $0,13 \pm 0,009$ U/ng, $p < 0,05$, 7C. ábra). ACE gátló kezelésben nem részesülő betegek csoportjában az ACE gátlás százalékos értéke $53 \pm 2\%$ -nak, ACE gátlót szedő páciensek esetében $83 \pm 3\%$ -nak adódott, szignifikáns különbséget és az ACE gátló kezelés hatékonyságát demonstrálva (7D. ábra). Hasonló, szignifikáns különbséget a tüdőszöveti ACE gátlás terén nem tudtunk kimutatni. Keringő, illetve tüdőszöveti ACE aktivitások kor- és nemfüggése terén nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni (3. táblázat).



7. ábra. Szöveti- és keringő ACE endogén regulációjának vizsgálata.

ACE aktivitásértékek 1 ng ACE mennyiségre vetítve különböző (4x, 35x, 400x) hígításértékeken humán szérumban és tüdőszövetben. Az alacsony hígításon mérhető aktivitásérték endogén gátlási mechanizmussal (nyílal jelölve) magyarázható (A, B). Keringő- és szöveti, specifikus ACE aktivitás 400x hígításon (C). Az ACE gátlás mértéke keringésben és tüdőszövetben ACE gátlót szedő (ACEI+) és nem szedő (ACEI-) betegek csoportjaiban (D). Az ábrázolt oszlopok az átlagértéket reprezentálják, a hibavonalak az ettől való átlagos eltérést mutatják. $n=42-47$. A csillaggal jelölt eredmények statisztikailag szignifikánsak ($p < 0,05$).

Demográfiai paraméterek	Keringő	Tüdő
	ACE aktivitás (U/mg)	ACE aktivitás (U/mg)
Kor < 60 (medián ± IQR)	27,6 ± 16,5	114 ± 119
Kor ≥ 60 (medián ± IQR)	25,8 ± 11,6	117 ± 83
Nő (medián ± IQR)	29,0 ± 12,2	119 ± 117
Férfi (medián ± IQR)	26,3 ± 14,2	112 ± 93

3. táblázat. Tüdőszöveti és keringő ACE aktivitásértékek kor és nemfüggése.

6.3. Az ACE2 aktivitás kapcsolata szív- és érrendszeri betegségekkel, illetve kardiovaszkuláris rizikófaktorokkal

A keringésben jelen lévő ACE2 aktivitás egyértelmű és markáns növekedését mutattuk ki a kardiovaszkuláris kontinuum különböző stádiumaiban fellépő patológiás folyamatok során. Egészséges egyének csoportjához viszonyítva szignifikáns ACE2 aktivitás növekedést (+32%) tapasztaltunk magas vérnyomásban szenvedő betegek csoportjában továbbá drasztikusan magasabb ACE2 aktivitást mértünk (+424%) végstádiumú szívelégtelenségben szenvedő páciensek populációjában (8A. ábra). Magas vérnyomással karakterizált betegek csoportjában szignifikánsan magasabb ACE2 aktivitást tapasztaltunk férfiak körében nőkkel ellentétben, illetve túlsúlyos és elhízott páciensek esetében fiziológiás testtömeg indexű páciensekkel összevetve. 60 évnél idősebb, magas vérnyomásban szenvedő betegek esetén szintén magasabb ACE2 aktivitást tapasztaltunk 60 év alatti páciensekkel szemben (8B. ábra illetve 4. táblázat).

Végstádiumú szívelégtelen páciensek csoportjában a keringő-, illetve szöveti ACE2 aktivitás és a kardiovaszkuláris rizikófaktorok kapcsolata más képet mutatott. Ezen betegcsoportban férfi és női nem összevetésében tudtunk szignifikáns, keringő ACE2

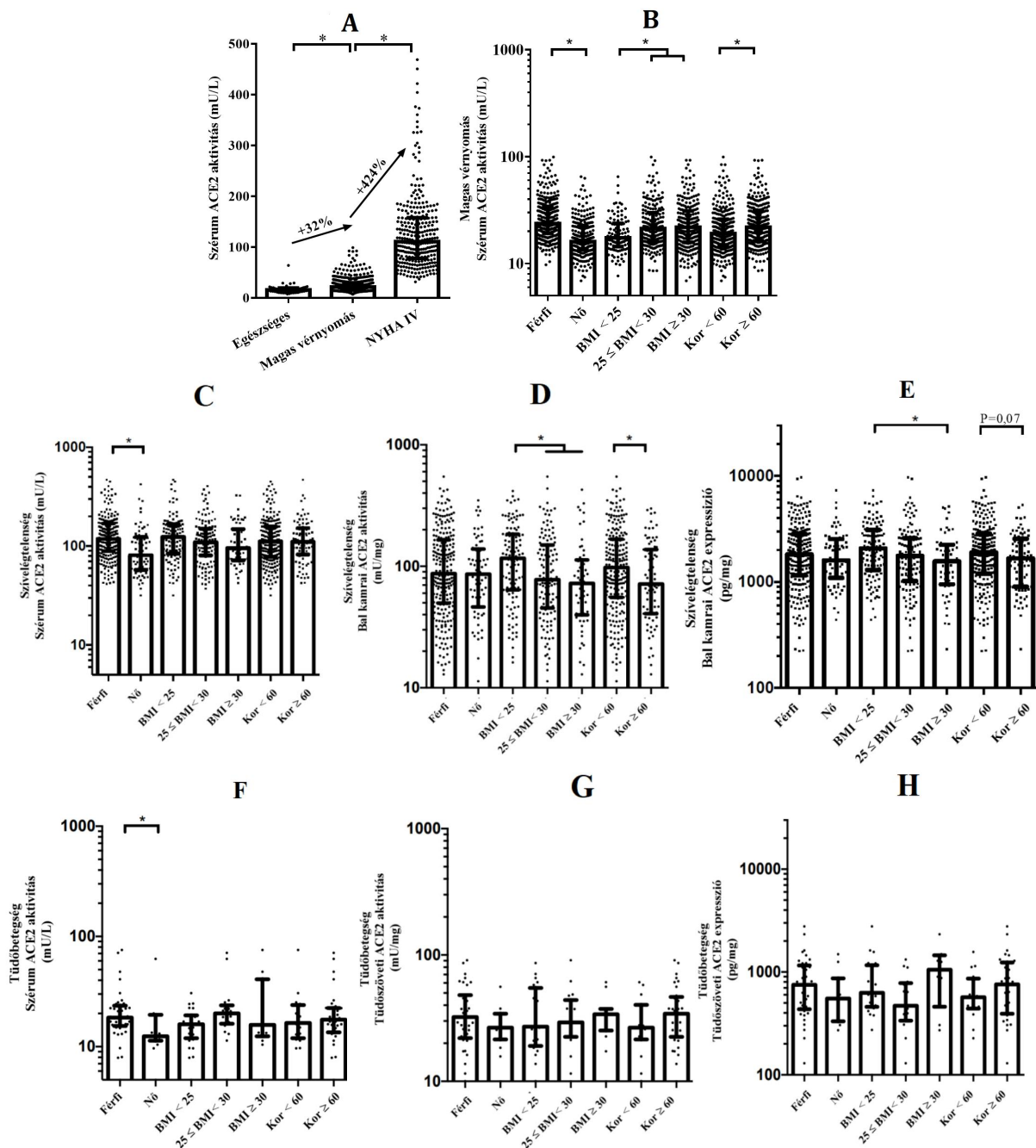
különbséget igazolni a férfi nem javára (8C. ábra). Szöveti szinten szignifikánsan alacsonyabb bal kamrai ACE2 aktivitást és expressziót tapasztaltunk elhízott páciensek csoportjában fiziológiás testtömeg indexű betegekkel összevetve. Kor tekintetében, 60 éves kor felett szintén szignifikánsan alacsonyabb bal kamrai ACE2 aktivitást tapasztaltunk 60 év alatti betegekkel összevetésben. ACE2 expresszió tekintetében hasonló tendenciát figyeltünk meg. (8D-E. ábrák, 4. táblázat)

Tüdőt érintő betegségben szenvedő páciensek csoportjában férfi nem esetében szignifikánsan magasabb keringő ACE2 szintet tapasztaltunk, női betegekkel összevetve. Szöveti szinten további szignifikáns ACE2 aktivitás- vagy expresszióbeli különbségeket nem tudtunk kimutatni. (8F-H. ábrák, 4. táblázat)

		Nem		Testtömegindex			Kor	
		Férfi	Nő	BMI < 25	25 ≤ BMI < 30	BMI ≥ 30	Kor < 60	Kor ≥ 60
Páciensek magas vérnyomással (Szérum ACE2 aktivitás, mU/L)	bevont egyének száma	304	236	102	206	232	262	278
	Medián ± IQR	24 ± 15	16 ± 9	17 ± 9	21 ± 14	22 ± 15	19 ± 11	22 ± 15
NYHA IV páciensek (Szérum ACE2 aktivitás, mU/L)	bevont egyének száma	224	66	108	126	55	208	81
	Medián ± IQR	119 ± 80	81 ± 66	124 ± 84	110 ± 70	96 ± 77	112 ± 80	111 ± 70
NYHA IV páciensek (Bal kamrai ACE2 aktivitás, mU/L)	bevont egyének száma	226	66	112	124	56	213	79
	Medián ± IQR	87 ± 115	86 ± 92	116 ± 120	77 ± 104	72 ± 73	98 ± 112	72 ± 97
NYHA IV páciensek (Bal kamrai ACE2 expresszió, pg/mg)	bevont egyének száma	225	66	110	124	57	212	79
	Medián ± IQR	1818 ± 1700	1597 ± 1446	2067 ± 1798	1761 ± 1566	1564 ± 1297	1895 ± 1666	1669 ± 11652
Mellkasebészeti betegek (Szérum ACE2 aktivitás, mU/L)	bevont egyének száma	38	11	21	17	11	16	33
	Medián ± IQR	18 ± 8	12 ± 8	16 ± 7	20 ± 8	16 ± 28	16 ± 12	18 ± 9
Mellkasebészeti betegek (Tüdőszöveti ACE2 aktivitás, mU/L)	bevont minták száma	37	11	20	20	11	15	33
	Medián ± IQR	32 ± 26	27 ± 13	27 ± 36	29 ± 21	34 ± 12	27 ± 19	34 ± 24
Mellkasebészeti betegek (Tüdőszöveti ACE2 expresszió pg/mg)	bevont minták száma	38	11	21	17	11	16	33
	Medián ± IQR	750 ± 725	552 ± 536	627 ± 706	469 ± 443	1053 ± 994	568 ± 422	758 ± 844

4. táblázat. Keringő és szöveti ACE2 (aktivitás és expresszió) értékei nem, kor és BMI függvényében.

Magas vérnyomással karakterizált betegek csoportjában szignifikánsan magasabb ACE2 aktivitást mértünk a két nem összevetésében továbbá túlsúlyos és elhízott páciensek esetében fiziológiás testtömeg indexű páciensekkel összevetve. Végstádiumú szívelégtelen páciensek csoportjában szöveti szinten szignifikánsan alacsonyabb bal kamrai ACE2 aktivitást és expressziót tapasztaltunk elhízott páciensek csoportjában fiziológiás testtömeg indexű betegekkel összevetve. 60 éves kor felett szintén szignifikánsan alacsonyabb bal kamrai ACE2 aktivitást tapasztaltunk 60 év alatti betegekkel összevetésben. Tüdőt érintő betegségben szenvedő betegek csoportjában férfi nem esetében szignifikánsan magasabb keringő ACE2 szintet mértünk.

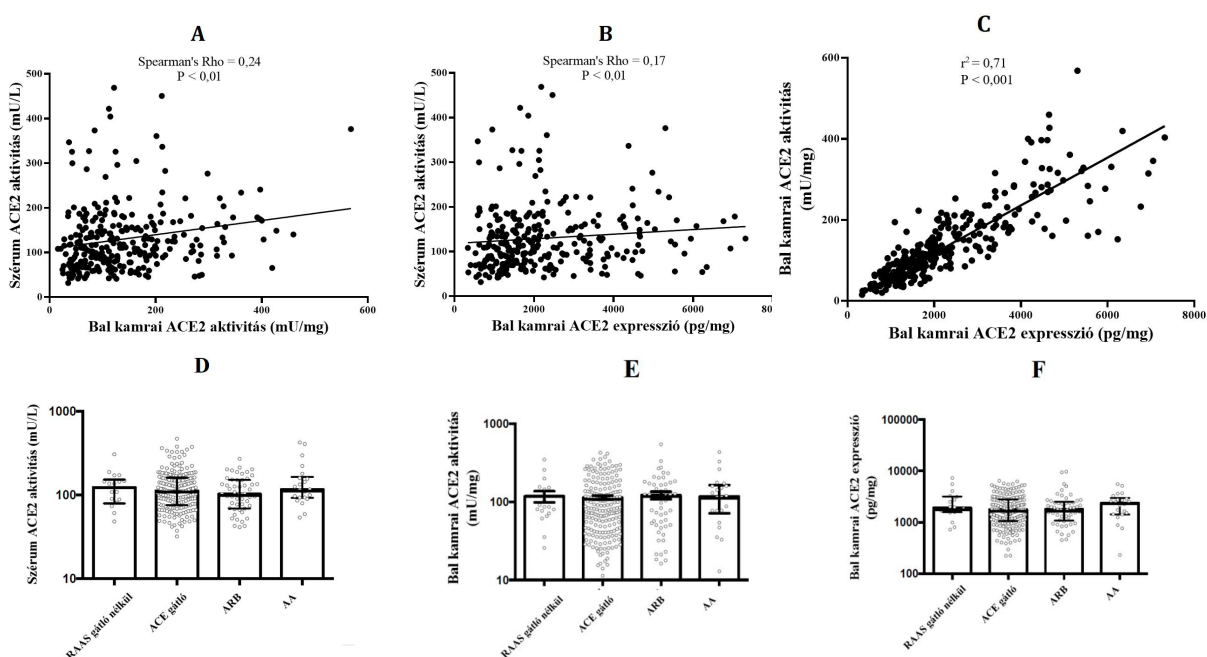


8. ábra. Szöveti- és keringő ACE2 aktivitás- ill. expresszióértékek összefüggése kardiovaszkuláris betegségekkel, komorbiditásokkal.

A kardiovaszkuláris kontinuum különböző stádiumait felölelő (egészséges, magas vérnyomásban szenvedő, végstádiumú szívelégtelen) betegek keringő ACE2 aktivitásai kerültek meghatározásra. **(A)** Magas vérnyomás betegséggel, szívelégtelen és tüdőbetegséggel karakterizált betegek keringő ACE2 aktivitásértékeinek **(B, C, F)**, szöveti ACE2 aktivitásprofiljainak **(D, G)** illetve ACE2 expresszióértékeinek **(E, H)** összevetése látható korra, nemre és BMI-re tekintettel. Az ábrázolt oszlopok az átlagértéket reprezentálják, a hibavonalak az ettől való átlagos eltérést mutatják. $n=11\,504$. A csillaggal jelölt eredmények statisztikailag szignifikánsak ($p<0,05$).

6.3.1. Bal kamrai ACE2 aktivitás és expresszió összefüggése a keringésben jelen lévő ACE2 szintekkel

Pozitív korrelációt tapasztaltunk keringő- és bal kamrai ACE2 aktivitás és expresszió terén ($p < 0,01$, 9A-B. ábrák). Eredményeink hitelességét szívizomban mért aktivitás- és expresszióértékek korrelációjával is alátámasztottuk (9C. ábra). A keringő- és szívizom szöveti ACE2 aktivitás- illetve expresszióértékekre nem gyakorolt érdemi hatást az alkalmazott ACE gátló terápia (9D-F. ábrák).

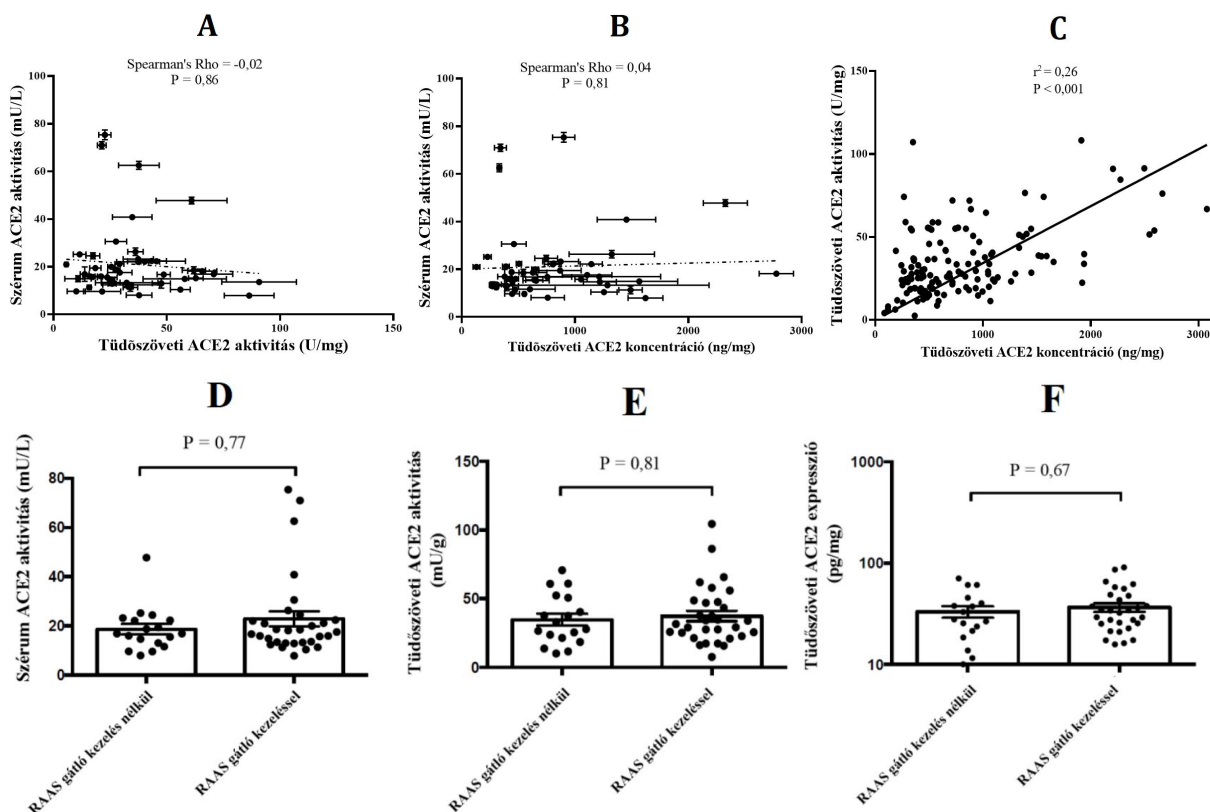


9. ábra. Keringő ACE2 aktivitásértékek összefüggése bal kamrai ACE2 aktivitás- és expresszióértékekkel.

Szérum ACE2 aktivitásértékek korrelációja bal kamrai ACE2 aktivitás (A) és expresszióértékekkel (B). Bal kamrai ACE2 aktivitás és expresszióértékek korrelációs analízise. (C) Különböző RAAS gátló terápiás modalitások hatásának hiánya szérum ACE2 aktivitásértékekre (D) illetve bal kamrai szöveti aktivitás és expresszióértékekre (E, F). A korrelációs analízist Spearman teszttel végeztük. Az ábrázolt oszlopok az átlagértéket reprezentálják, a hibavonalak az ettől való átlagos eltérést ábrázolják. $n=18-297$. Az egyes szignifikáns eredmények a megfelelő ábrán jelölve.

6.3.2. Tüdőszöveti ACE2 aktivitás- és expresszióértékek korrelációanalízise keringő ACE2 szintekkel

Tüdőszöveti ACE2 aktivitás- és expresszióértékek nem mutattak szignifikáns kapcsolatot a keringő ACE2 aktivitásokkal (10A-B. ábrák). A fentiekben, hasonlóképp alkalmazott logika mentén tüdőszöveti ACE2 aktivitások erőteljes korrelációt mutattak tüdőszöveti ACE2 expresszióval eredményeink hitelességét igazolva (10C. ábra). A keringő- és tüdőszöveti ACE2 aktivitás- illetve expresszióértékekre nem gyakorolt érdemi hatást az alkalmazott ACE gátló terápia (10D-F. ábrák).



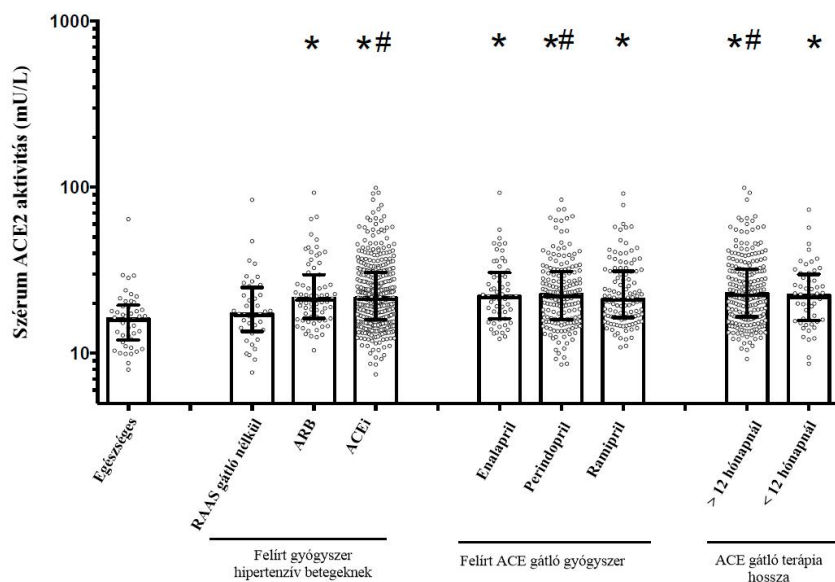
10. ábra. Keringő ACE2 aktivitásértékek összefüggése tüdőszöveti ACE2 aktivitás- és expresszióértékekkel.

Szérum ACE2 aktivitás értékek korrelációja tüdőszöveti ACE2 aktivitás (A) és expresszióértékekkel (B). Tüdőszöveti ACE2 aktivitás és expresszió értékek korrelációs analízise. (C) Különböző RAAS gátló terápiás modalitások hatásának hiánya szérum ACE2 aktivitásértékekre (D) illetve tüdőszöveti aktivitás és expresszióértékekre (E, F). A korrelációs analízist Spearman teszttel végeztük. Az ábrázolt

oszlopok az átlagértéket reprezentálják, a hibavonalak az ettől való átlagos eltérést ábrázolják. n=18-108.

6.3.3. RAAS gátló terápia hatása a keringő ACE2 aktivitásra magas vérnyomással bíró betegekben

A keringő ACE2 aktivitásértékek magas vérnyomásos betegekben magasabbnak bizonyultak ACE gátló vagy ARB kezelés mellett, míg RAAS gátló terápia nélkül, átfedésben láthatjuk egészséges betegek csoportjával összevetésben (11. ábra, 5. táblázat). Magas vérnyomásban szenvedő betegekben alkalmazott különböző ACE gátló terápiás modalitások nyomán hasonló ACE2 aktivitásértéket mértünk (enalapril: 22 ± 14 , n=59; perindopril: 23 ± 15 , n=167; ramipril: 21 ± 15 mU/L, n=113). ACE2 aktivitásbeli különbséget, ACEi terápia 12 hónapnál hosszabb (23 ± 16 mU/L, n=223) vagy rövidebb (22 ± 14 mU/L, n=52) alkalmazása nyomán nem tudtunk kimutatni. (11. ábra, 5. táblázat)



11. ábra. A RAAS gátló terápia hatása a keringő ACE2 aktivitásértékre.

Részletes deskriptív klinikai, háttér- és elemszám adatok összefoglalva a 5. táblázatban találhatóak. Az egészséges csoporthoz viszonyított szignifikáns eredmények csillaggal, míg a magas vérnyomással

karakterizált csoport RAAS medikáció nélküli csoportjához viszonyított szignifikáns eredmények kettőskeresztrel jelölve ($p < 0,05$). Minden egyes pont egy-egy beteget jelöl ($n=46-386$).

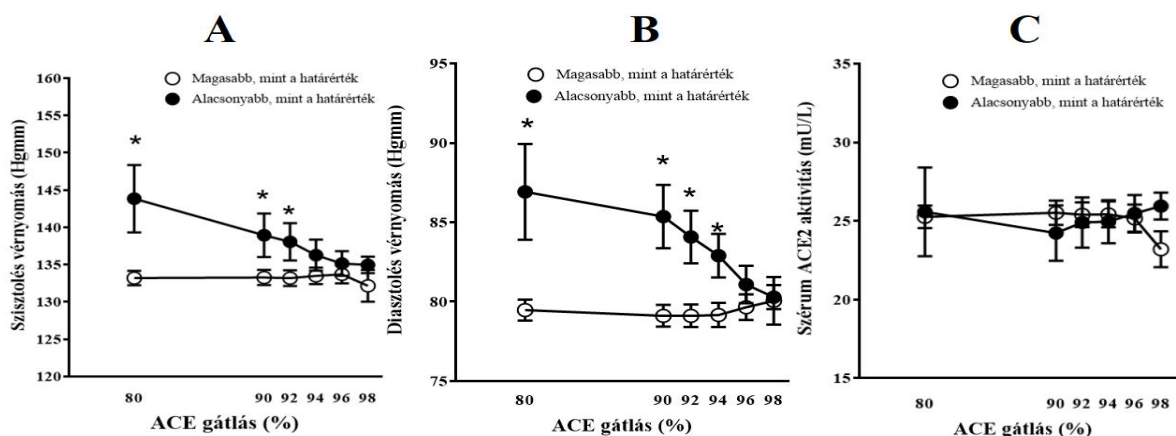
		Egészséges (Szérum)	Páciensek magas vérnyomás betegséggel		NYHA IV páciensek (Szérum és szívizom szövet)			Páciensek tüdőbetegséggel		
		RAAS gátló nélkül	RAAS gátló nélkül	ACE gátló	ARB	RAAS gátló nélkül	ACE gátló	ARB	RAAS gátló nélkül	RAAS gátlóval
Bevont egyének száma (n)		46	43	386	71	42	197	53	31	18
Keringő ACE2 aktivitás (mU/L, medián ± IQR)		16 ± 7	17 ± 11	25 ± 15	21 ± 14	115 ± 73	112 ± 84	102 ± 81	18 ± 9	17 ± 10
	ACE gátló terápia megléte (> 90% gátlás)			26 ± 14						
	ACE gátló terápia nélkül (< 90% gátlás)			24 ± 16						
Szöveti ACE2 aktivitás (mU/mg, medián ± IQR)		N/A	N/A	N/A	N/A	113 ± 120	115 ± 116	101 ± 104	32 ± 25	28 ± 23
Szöveti ACE2 expresszió (pg/mg, medián ± IOR)		N/A	N/A	N/A	N/A	1661 ± 1565	1900 ± 1694	1761 ± 2104	743 ± 950	515 ± 644

5. táblázat. Magas vérnyomással-, szívelégtelen- és tüdőbetegséggel karakterizált betegek keringő- és szöveti ACE2 (aktivitás és expresszió) értékei RAAS gátló terápia tükrében.

Különböző ACE gátló terápiás modalitások (ACEi, ARB) befolyásolják a keringő ACE2 szintjét.

6.3.4. ACE gátló terápia ACE- és ACE2 aktivitásértékekre gyakorolt hatásának vizsgálata

ACE gátló terápia alkalmazását tekintve negatív korrelációt mutattunk ki az ACE gátlás mértéke és a szisztolés, illetve diasztolés vérnyomás összefüggését vizsgálva. A maximális ACE gátlási effektivitást mind szisztolés, mind diasztolés vérnyomásértékek esetében 94-96%-os gátlási tartományban tapasztaltuk (12A-B. ábrák). Kísérleteinkben nem találtunk érdemi hatást vagy kapcsolatot az ACE gátlás hatékonysága, illetve a keringő ACE2 aktivitásértékek esetleges változása között (12C. ábra).



12. ábra. ACE gátló gyógyszeres terápia nem előírt használatának hatása szisztolés és diasztolés vérnyomásra, illetve ACE2 aktivitásra.

Az ACE gátló terápia biokémiai hatékonyságát hígításon alapuló kísérletekkel határoztuk meg. A gátlási hatékonyság határértékét tetszőlegesen választottuk meg (vízszintes tengelyen ábrázolva) és ezen határérték feletti (magasabb), illetve alatti (alacsonyabb) betegek csoportjait hasonlítottuk össze a vérnyomás tekintetében (függőleges tengelyen ábrázolva a vérnyomás). A határérték feletti (teli pontok) és alatti (üres pontok) középszisztolés, diasztolés, illetve szérums ACE2 értékek összehasonlítása történt meg az ACE gátlási hatékonyság tükrében. (A-C) A hibavonalak az átlagtól való átlagos eltérést ábrázolják. Az egyes szignifikáns különbségeket (magas, alacsony gátlási hatékonyság között), ($p < 0,05$) csillagokkal jelöltük.

7. Megbeszélés

7.1. Genotípus függő keringő- és szöveti ACE vizsgálata

A keringő humán ACE forrása általánosan elfogadott és tankönyvi alaptételként deklaráltan a tüdőkapillárisok endotél sejtjei (Fonyó, 2011). Ezen tüdőkapilláris endotél sejtek túlnyomó többsége kifejezi az ACE-t, míg a nagyvérkörben ezek aránya kb. 20%-ot tesz ki (Metzger és *mtsai.*, 2011). A keringő ACE szintjét meghatározó faktorok tekintetében egyrészt az ACE inzerziós/deléciós polimorfizmusa (ACE I/D) emelhető ki. Ezen genotípusos jelleg szoros asszociációt mutat kardiovaszkuláris megbetegedésekkel és szívelégtelenséggel (Gardemann és *mtsai.*, 1998; Bartoli és *mtsai.*, 2007; Dai és *mtsai.*, 2019; Chen és *mtsai.*, 2020; Hussain és *mtsai.*, 2020). Ennélfogva az ACE forrásáért felelős szerv(rendszer) I/D regulációja szintén feltételezhető. A genetikai meghatározottságon túl fiziológiai tényezők szerepe vethető fel. A nitrogén-monoxid molekula ACE expresszióra kifejtett gátló szerepe, illetve a nitrogén-monoxid gátlók facilitáló szerepe említhető meg. Összességében tehát elmondható, hogy a metabolikusan aktív (ACE-t termelő) sejtek száma általi passzív meghatározottságon túl a biokémiai és oxidatív környezet is hozzájárul az ACE expresszió szabályozásához (Cruz és *mtsai.*, 2016).

Kutatómunkánk tárgyaként a keringő, humán ACE forrásának vizsgálatához humán tüdőszövetet, illetve ugyanazén páciensekből származó vérmintákat választottuk. A keringő ACE szintek meghatározása során DD genotípus esetében szignifikánsan magasabb ACE aktivitást és expressziót tapasztaltunk II genotípusú beteg mintáival összevetve, míg ID genotípus esetén egy intermedier értéket mértünk, ami visszaigazolta az eddigi irodalmi adatokat (Gardemann és *mtsai.*, 1998; Dai és *mtsai.*, 2019; Hussain és *mtsai.*, 2020). Tüdőszöveti szinten ezen genotípusos meghatározottságot igazolni nem tudtuk, ami arra utal,

hogy a keringésben jelen lévő genotípusosan meghatározott ACE forrása a tüdőszövetből eltérő.

A keringő ACE alternatív forrásának vizsgálata során szívizom szövet és keringő ACE vetületében szignifikáns pozitív korrelációt tapasztaltunk, mely azt sugallja, hogy a humán szívizomszövet érdemben hozzájárul a keringő, genotípusosan meghatározott ACE aktivitáshoz és expresszióhoz.

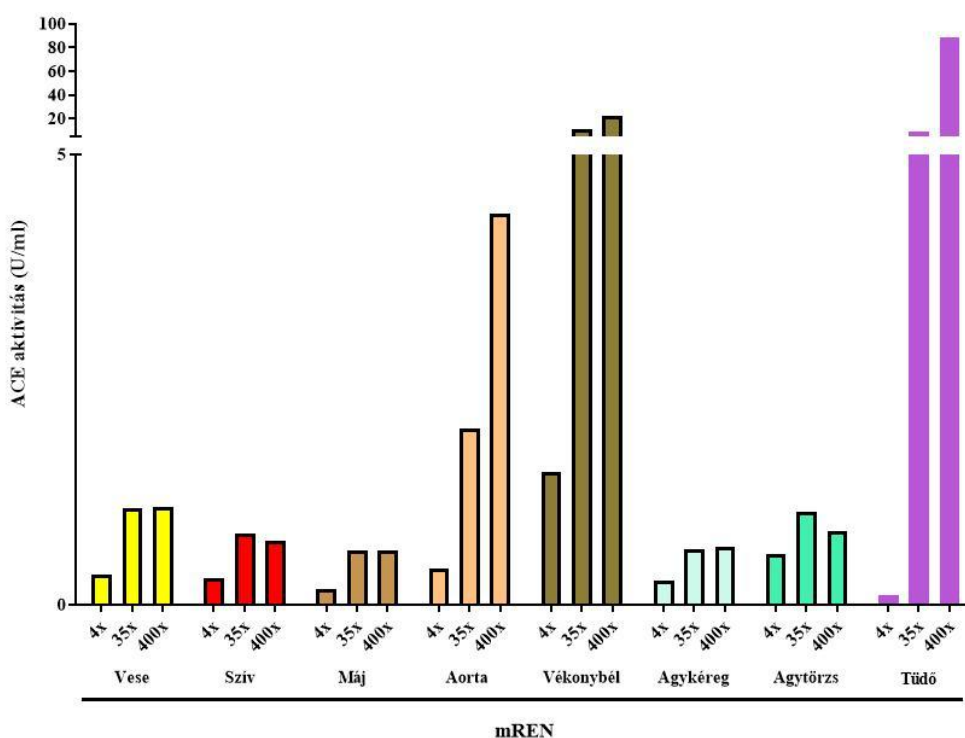
A szöveti ACE felszabadulás (szekréció) tekintetében a tumor nekrosis faktor alfa konvertáló enzim (TACE vagy ADAMTS17) szerepét valószínűsítik, de ezen kérdéskör még nem nevezhető egyértelműen eldöntöttnek. A szomatikus ACE hasítási helye az Arginin1203/Szerin1204 peptidpozícióra lokalizálható (Parkin és *mtsai.*, 2004).

Korábban publikált eredmények alapján, tüdőrákos páciensekben az ACE expresszió mértéke csökken (Danilov és *mtsai.*, 2019). Az 1970-es évek közepén szintén negatív korrelációról számoltak be limitált számú beteg bevonásával (Ashutosh és Keighley, 1976).

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a keringő ACE forrása nem kizárólag és talán még csak nem is túlnyomórészt a tüdő kapillárisrendszere. Experimentális munkánk nyomán, alternatív forrásként a humán szívizom hozzájárulása merül fel, melyet mások adatai is támogattak (Danser és *mtsai.*, 1995). További molekuláris biológiai technikákon (Western blot, ELISA, mRNS szekvenálás, immunhisztokémiai) alapuló, komplex adatbázisok (pl. Humán Protein Atlasz) regisztereit figyelembe véve a keringő ACE (általunk humán kísérletekben nem vizsgált) forrásaként jelölhető még meg a vese proximális tubulusainak apikális epitél rétege, a vékonybél mukózarétege, a placenta szinciciális trofoblasztja, a központi idegrendszer egyes régiói, továbbá a makrofágok M1, pro-inflammatorikus altípusa (Silverstein és *mtsai.*, 1978; Defendini és *mtsai.*, 1983). Munkacsoportunk által az elmúlt években sikeresen publikált eredmények közé tartozik továbbá, hogy a pro-inflammatorikus makrofágokban felszaporodó, relatíve nagy mennyiségű

ACE szarkoidózisban mint biomarker értelmezhető (Csongrádi és mtsai., 2018; Enyedi és mtsai., 2020). Általánosan elmondható, hogy ezen - a klasszikus tüdőszöveti lokalizáción felüli - ACE expresszió pontos szerepe még nem tisztázott és további kutatásokat igényel még.

Experimentális munkánk során az ACE termelés szempontjából releváns, patkánymodellből származó saját szövetminták, ezen megfigyeléseket szintén támogatják (13. ábra). Megállapításainkkal nem kívánjuk az eddig ismert klasszikus tankönyvi ismereteket ignorálni, hanem felhívni arra a figyelmet, hogy a keringésben, jelen lévő, genotípusosan meghatározott humán ACE forrása egy színebb képet mutat, és a humán tüdő szerepe egyáltalán nem kizárólagos.



13. ábra. ACE aktivitási szintek patkány szövetekben.

Spontán magas vérnyomás betegség (mREN) patkánymodellből származó szövetminták ACE aktivitásai. Ketaminos exterminálás, szövetgyűjtés, mélyfagyasztás, szöveti feltárás majd protein normalizáció után laboratóriumunkban az előzőekben már ismertetett módon végeztünk ACE aktivitás mérést. Látható a vékonybél kiugró ACE aktivitás értéke, illetve a hígítás hatására megfigyelhető endogén gátlás alól való felszabadulás (reprezentatív ábra, további nem publikált eredmény).

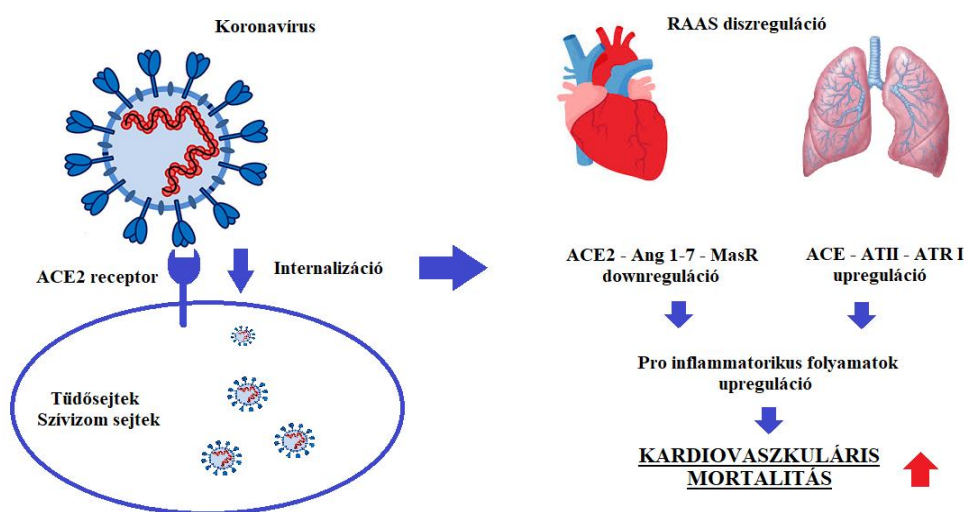
Az ACE endogén regulációja az 1970-es évek vége óta ismert jelenség (Ryan és *mtsai.*, 1979). A későbbiekben további humán szívmintákon és szérummintákon végzett kísérletek is igazolták az endogén ACE gátlás jelenségét (Ingraham és *mtsai.*, 2020). A továbbiakban bizonyítás nyert, hogy a hígítás, mint adekvát biokémiai technika szintén igazolja ezen jelenség meglétét patkány szövetekben (Koiter és *mtsai.*, 1998). Munkacsoportunk az elmúlt évek során a humán szérumalbumin szerepét mutatta ki az endogén gátlás hátterében (Fagyas és *mtsai.*, 2014a, 2014b, 2014c). Jelen tanulmányban, korábbiakkal megegyező (hígítási) metodikát követve, szintén igazolni tudtuk az endogén gátlás jelenlétét mind keringő, mind szöveti ACE szintjén. Szöveti szinten, ACE gátló terápia jelenlététől függetlenül, hasonló ACE gátlási szinteket tapasztaltunk. Tüdőszövetben a humán szérum albumin koncentrációja alacsony mértékű, ami által egy eddig nem azonosított alternatív gátlási folyamat jelenlétére következtethetünk (Fagyas és *mtsai.*, 2014c). Eredményeink összhangban vannak előzetes tudományos eredményekkel, ahol patkány tüdőszövetben legalább 85%-os endogén gátlási szintekről számolnak be (Koiter és *mtsai.*, 1998).

Szöveti- és keringő specifikus ACE aktivitások terén jelen munka szignifikáns különbséget állapít meg. Ezen szignifikáns különbség hátterében vélhetően poszttranszlációs módosítások állhatnak, mely módosítások befolyásolják a metabolikusan aktív ACE működését, effektivitását. Eredményeinket támogatja egy korábbi hasonló megfigyelés, mely igazolta az ACE sejt- és szövetspecifikus glikozilációs mintázatának jelentőségét (strukturális feltérképezés, *fingerprinting*) (Danilov és *mtsai.*, 2010). Fontos továbbá megemlíteni az alternatív ANGI → ANGII átalakulási mechanizmusért felelős további molekulát, a kimáz fontosságát. Ezen molekula jelen ismereteink szerint szívizom szövetben aktívabb az ACE-nél, ami által a vazokonstriktív és pro-inflammatorikus ANGII szint nem kizárólag az ACE/ACE2, hanem inkább a kimáz/ACE2 arány által szabályozott (Balcells és *mtsai.*, 1997; Basu és *mtsai.*, 2017). Jelen munkában erre az aspektusra nem térünk ki.

7.2. Az ACE2 jelentősége a koronavírus pandémia tükrében

A 2019-ben kitört koronavírus pandémia munkacsoportunk számára egy egyedi kutatási lehetőséget nyitott meg hosszabb múltra visszatekintő, ACE2 irányú kutatómunkánk terén.

Az általános- és respirációs rendszert érintő problémákon túl a koronavírus fertőzés kardiovaszkuláris vonatkozással is bír. Elmondható, hogy aorta sztenózisban, magasvérnyomás betegségben, illetve szívelégtelenségben szenvedő (HFrEF) betegek csoportjaiban az ACE2 magasabb szintet mutat, biomarkerként értelmezhető (Fagyas és mtsai., 2021; Tajbakhsh és mtsai., 2021). Ezen összefüggés, illetve a SARS-CoV-2 és az ACE2 szoros kapcsolata alátámasztja a koronavírusal fertőzött kardiovaszkuláris betegek magasabb mortalitási számait (14. ábra).



14. ábra. A koronavírus fertőzés és a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer kapcsolata.

A poszt COVID19 tünetek terén megfigyelhető kardiovaszkuláris panaszok (palpitáció, csökkent terhelhetőség, szívizom gyulladás) szintén felvetik az SARS-CoV-2 - ACE2 – RAAS reláció jelentőségét (Mitrani és mtsai., 2020). A fenti gondolatok nyomán munkacsoportunk célul tűzte ki a keringő ACE2 aktivitásának- és expressziójának meghatározását, különböző kardiovaszkulárisan betegcsoportokban. Emellett relevánsnak

éreztek megvizsgálni az ACE gátló terápia ACE2 szintekre gyakorolt hatásait, ezáltal következtetni a koronavírusos betegekben alkalmazott ACE gátlók potenciális veszélyeire és reflektálni az ESC ezen irányú irányelveire.

Jelen dolgozatban a koronavírus sejtfelszíni receptoraként szolgáló keringő- és szöveti ACE2 molekula szintjét és aktivitását kardiovaszkuláris rizikófaktorok és egyéb patológiás folyamatok, úgymint magas vérnyomás, idős kor, elhízás és szívelégtelenség, befolyásolják. Munkánk során igyekeztünk a keringő- és szöveti ACE2, mint lehetséges biomarker szerepét vizsgálni a koronavírus fertőzés okozta mortalitás és az ACE gátló terápia alkalmazásának (koronavírus fertőzés esetében) tükrében. Ezen túl az eredmények megvilágítják az ACE2 szerepét a kardiovaszkuláris kontinuum különböző stádiumaiban (egészséges-, magas vérnyomással diagnosztizált-, végstádiumú szívelégtelen egyének csoportjai). Több hasonló tanulmány esetében a keringő ACE2 szint meghatározása molekuláris biológiai, kvantitatív PCR metodika segítségével valósult meg, ami nem alkalmas a valós keringő ACE2 koncentráció értékek meghatározására (Assarsson és *mtsai.*, 2014; Sama és *mtsai.*, 2020; Wallentin és *mtsai.*, 2020).

Az ACE2 vérnyomás szabályozásban betöltött kiemelkedő szerepére elsőnek állatmodelles kísérletek hívták fel a figyelmet. Spontán magas vérnyomás patkánymodelljében az *ace2* gén lókusza a magas vérnyomás genetikai szabályozórégiójának közelében helyezkedik el, továbbá igazolták, hogy ezen modellben a keringő ACE2 szintje magasabb. Megegyező modellrendszerben az *ace2* gén deléciója vérnyomás regulációs problémákhoz, illetve funkcionális- és strukturális szívproblémákhoz vezetett (Crackower és *mtsai.*, 2002). Munkacsoportunk humán mintákon végzett kísérletei az elmúlt évek során egy inverz viszonyt igazoltak a keringő ACE2 aktivitás és csökkent ejekciós frakciójú szívelégtelenség (HFrEF) romló funkcionális stádiumaiban (Úri és *mtsai.*, 2014, 2016). Jelen eredmények alapján elmondható, hogy végstádiumú szívelégtelenségben megfigyelhető

drasztikus ACE2 aktivitás emelkedéshez képest relatíve alacsonynak mondható az ACE2 aktivitás (relatív) emelkedése esszenciális magas vérnyomásban, összhangban korábbi megfigyeléseinkkel és az eddig ismert irodalmi adatokkal.

Munkacsoportunk előzetes eredményei alapján 110 fő kritikus állapotú koronavírus fertőzéssel érintett páciens ACE2 aktivitásértékeinek elemzése nyomán elmondható, hogy ezen betegcsoportban szignifikánsan magasabb ACE2 aktivitásértékek tapasztalhatóak klasszikus (non-COVID) szepszisben szenvedő páciensekkel összevetve. 30 napos mortalitás növekedése terén az ACE2 szintén biomarkerként volt értelmezhető. Elmondható, hogy a növekvő ACE2 aktivitásértékek korrelálnak a halálozással és prediktív funkcióval bírnak a koronavírus iránti vulnerabilitás és fogékonyság terén (Fagyas és *mtsai.*, 2022).

A disszertációban foglalt eredményeink alapján magas vérnyomásban szenvedő páciensek csoportjában RAAS gátló kezelés mellett (ACEi, ARB) 50%-kal magasabb ACE2 aktivitást tapasztaltunk egészséges kontrollcsoporthoz viszonyítva. A koronavírus pandémia berobbanása nyomán felmerül a kérdés, hogy a RAAS gátlók alkalmazása vajon hozzájárulhat-e közvetve vagy közvetlenül a koronavírus okozta mortalitási számok növekedéséhez (Esler és Esler, 2020; Fang és *mtsai.*, 2020; Vaduganathan és *mtsai.*, 2020; Zheng és *mtsai.*, 2020). Ezen gondolat alapját 3 előzetes megfigyelés szolgáltatta: koronavírusos betegek között a magas vérnyomás betegségben szenvedő páciensek incidenciája magasabbnak bizonyult (Vaduganathan és *mtsai.*, 2020); állatmodelles preklinikai modellek alapján RAAS gátló terápia alkalmazása, emelkedő ACE2 aktivitásértékeket eredményezett (Ishiyama és *mtsai.*, 2004); harmadsorban pedig maga a patofiziológiai háttér, miszerint a sejtfelszíni ACE2 receptor bejutási kapuként szolgál a SARS-CoV-2 kórokozó számára (Hoffmann és *mtsai.*, 2020; Walls és *mtsai.*, 2020; Zhang és *mtsai.*, 2020). Kísérletes munkám igyekezett ezen kérdéskört árnyalni. Munkacsoportunk által előzetesen már publikált, újszerű hígítási módszerrel határoztuk meg az alkalmazott

ACE gátló terápia hatékonyságát (Tóth és *mtsai.*, 2012). Ezen módszerrel tudtuk elemezni a keringő ACE2 aktivitás és az ACE gátló terápia hatásosságának relációját. Az ACE gátló terápia elhagyása egyrészt (értelemszerű módon) magasabb vérnyomás értékekben testesült meg, másrészt azonban az ACE gátlás hatékonysága nem befolyásolta a keringő ACE2 szinteket. Korábbi és jelenlegi experimentális megfigyeléseink alapján a keringő ACE2 aktivitásértékek jól korrelálnak a humán szív ACE2 expressziójával (biomarker funkció, akár szív irányú koronavírus érintettség monitorizálására) (Úri és *mtsai.*, 2014, 2016). Tüdőszövet esetében hasonló kapcsolat nem figyelhető meg. Korábbi preklinikai kutatási eredmények szintén támogatják ezen megfigyeléseket (Kovács és *mtsai.*, 2016). A keringő- és tüdőszöveti ACE2 kapcsolatának hiánya több elméleti-gyakorlati tényezővel magyarázható. Egyrészt a humán szívben fellelhető ACE2 expresszió közel négyszerese a tüdőszövetben megfigyelhető ACE2 expresszióknak, (5. táblázat) továbbá lehetséges, hogy a szívizomszövetben működő ACE2 expresszió/szekrécio mechanizmus effektívebbnek tekinthető, mint tüdőszöveti társáé. Alternatív szervek/szervrendszerek (pl. gasztrointesztinális szervrendszer) ACE2 szekréciónban való aktív szerepvállalása szintén felmerül további lehetőségként. Érdekességként megemlíthető, hogy koronavírussal fertőződött betegek közel 70%-a számol be a betegség aktív fázisában gyomor-bélrendszeri panaszokról (Hui és Zumla, 2019; Holshue és *mtsai.*, 2020).

A keringő ACE2 aktivitásértékek konzekvensen magasabbnak bizonyultak férfiak körében nőkkel összevetve, igazolva korábbi, hasonló tudományos megfigyeléseket (Sama és *mtsai.*, 2020; Walls és *mtsai.*, 2020). Elmondható továbbá, hogy ezen nemfüggő ACE2 aktivitásbeli különbség kórképtől függetlenül megfigyelhető, ami egy egyéni, nemspecifikus szekréción mechanizmusra utalhat. Szöveti expresszió szintjén érdekes módon, nem találtunk érdemi, nemfüggő különbséget bal kamrában, illetve tüdőben mért értékek terén. Magas vérnyomással diagnosztizált páciensek csoportjában magasabb testtömeg index, magasabb

keringő ACE2 aktivitásértékeket vont maga után. Ezen betegekben korfüggő ACE2 aktivitásemelkedést figyeltünk meg, kiegészítve, eddigi hasonló megfigyeléseket (Wallentin és mtsai., 2020).

ACE2 és a SARS-CoV-2 kapcsolatát árnyaló eredményeink (indirekten) támogatják az ESC 2020-as *“position statement-jét”* miszerint, az antihipertenzív gyógyszerek aktív koronavírusos megbetegedésben való elhagyása sem klinikai, sem tudományos oldalról nem indokolt (hiányzó evidencia) (Cardiology, E.S.).

7.3. Limitációk

A genotípusfüggő szöveti-, illetve keringő ACE kapcsolatát vizsgáló munkánkban egy egycentrumos, etnikailag homogén kaukázusi (magyar) betegcsoporton folytattuk vizsgálatunkat ennél fogva az ACE gátló terápiára és annak hatásosságára vonatkozó klinikai adataink csupán feltáró jellegűnek tekinthetőek. Szöveti elérhetőség és humánetikai szempontok nyomán párhuzamos tüdő- és szívminák vételezésére nem volt lehetséges. Szívizomszöveti genotípusfüggő ACE expresszió mérésre és az ACE gátló terápia szívizombeli monitorizálásra nem került sor.

ACE2 és a koronavírus pandémia viszonyát taglaló eredményeink retrospektív klinikai adatokon és mintagyűjtésen alapulnak. A vizsgálati populáció etnikailag homogén, kaukázusi (magyar) betegcsoportot reprezentál. Koronavírussal fertőzött egyének vér- vagy szövetmintáit munkánkhoz nem tudtunk felhasználni. Tüdőmintáink különböző individuális tüdőbetegségekkel (tüdő adenokarcinóma, szarkoidózis, légmell) bíró páciensek közül kerültek gyűjtésre. A vizsgálati populációban koronavírussal fertőzött betegek mintái nem szerepelnek, így a prezentált eredmények ezen szempontból áttételesek.

8. A doktori értekezésben szereplő új tudományos eredmények

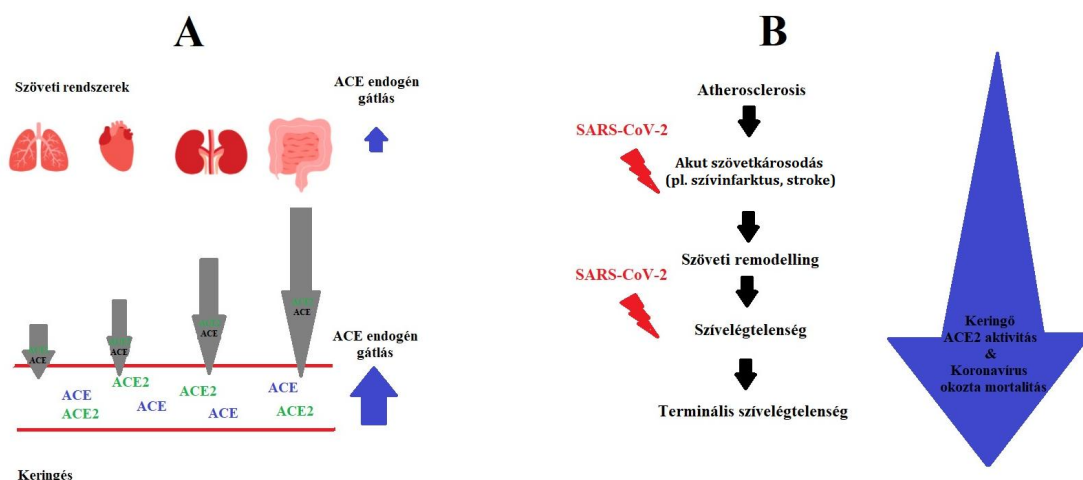
Kísérletes eredményeink alapján az alábbi új megállapításokat fogalmazzuk meg:

- a) A keringésben jelen lévő, genotípusosan meghatározott humán ACE aktivitás- és expresszióértékei nem korrelálnak tüdőszövetben mérhető ACE aktivitás- és expresszióértékekkel.
- b) A keringő ACE aktivitás erős korrelációt mutat szívizomban mért ACE aktivitással szívelégtelen betegek mintái alapján.
- c) A keringő- és tüdőszöveti humán ACE endogén gátlást mutat.
- d) A keringésben jelen lévő ACE2 összefüggést (növekedést) mutat a kardiovaszkuláris kontinuum progresszív stádiumaival és szerepet játszhat a koronavírus fertőzés nyomán igazolt, magasabb kardiovaszkuláris mortalitás kialakításában,

9. Összefoglalás

Jelen dolgozatban bemutatott experimentális eredményeink alapján a keringésben jelen lévő genotípusosan meghatározott, humán ACE aktivitás és expresszió nem kizárólag a tüdőszövetből származik. Saját eredményeink, illetve modern molekuláris biológiai technikákon nyugvó adatbázisok megfigyelései nyomán kijelenthető, hogy a szívben, a gasztrointesztinális-, kiválasztó- és urogenitális traktusokban kitüntetett mennyiségben van jelen az ACE (illetve az ACE2), árnyalva ezen molekulák termelődési- és metabolikus sokszínűségét a humán szervezetben.

A humán, keringő ACE2 biomarkerként értelmezhető a kardiovaszkuláris kontinuum progresszív stádiumaiban, illetve kardiális/szív-érrendszeri érintettséggel terhelt koronavírus fertőzés esetén, ennél fogva magyarázatot nyújthat kardiovaszkuláris terhelt betegek magasabb mortalitási számaira koronavírus fertőzésben. A keringő ACE2 összefüggést mutat továbbá a nemmel és kardiovaszkuláris rizikófaktorokkal (BMI, vérnyomás, életkor). ACE gátló terápia elhagyása (a farmakológiai ACE gátlás mértéke) nem befolyásolja a keringő ACE2 szintjét, így ezen gyógyszerek aktív koronavírusos megbetegedésben való elhagyása nem indokolt (15. ábra).



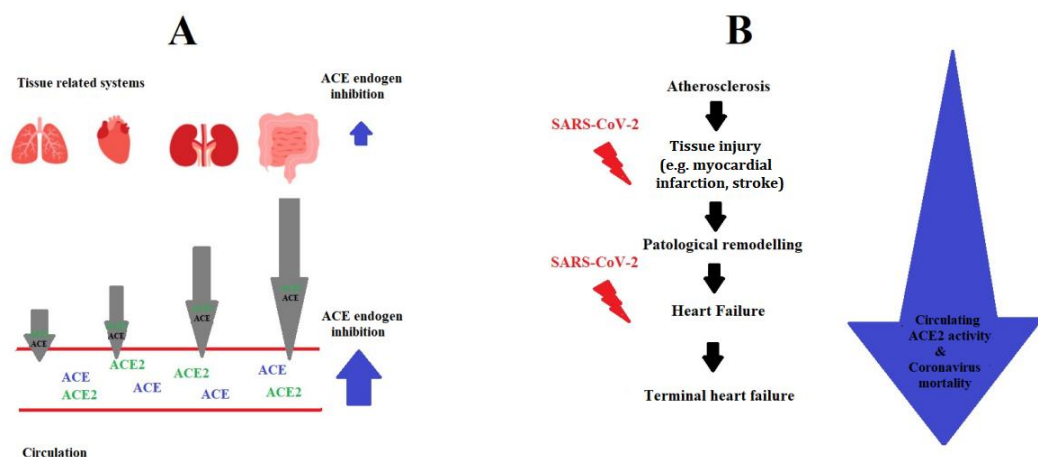
15. ábra. Összefoglaló ábra a disszertáció új tudományos megállapításairól.

Keringő, humán ACE és ACE2 potenciális szöveti forrásai, az ACE endogén gátlásának mértéke keringésben, illetve szöveti szinten (A). A keringő humán ACE2, a kardiovaszkuláris kontinuum és a koronavírus fertőzés sematikus kapcsolata (B).

10. Summary

Based on our experimental results presented in this dissertation, the source of circulating genotypically determined human ACE activity and expression does not exclusively come from lung tissue. According to our findings and observations of databases based on modern molecular biological techniques we may conclude that ACE (and ACE2) is present in great amount in the human heart, gastrointestinal tract, excretory system and urogenital tract, showing the diversity of production and metabolism of these molecules in the human body.

Human circulating ACE2 can be interpreted as a biomarker in progressive stages of the cardiovascular continuum and in coronavirus infection complicated with cardiac/cardiovascular involvement, thus providing a potential explanation for the higher mortality COVID-19 patients with cardiovascular involvement. In addition, circulating ACE2 shows an association with gender and cardiovascular risk factors (e.g. BMI, blood pressure, age). Discontinuation of ACE inhibitor (degree of ACE inhibition) has no affect on the circulation ACE2 levels, so there is no evidence to suggest that ACE inhibitors should be discontinued in active coronavirus infection (Figure 16.).



16. figure. Graphic summary of the novel findings.

Tissue related sources of circulating ACE and ACE2, the level of the endogen inhibition in circulation and in tissue (**A**). The schematic relationship of circulating, human ACE2, the cardiovascular continuum and the coronavirus infection (**B**).

11. Irodalomjegyzék

- Fonyó, A. (2011) *Az orvosi élettan tankönyve*. 5. Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt.
- Ashutosh, K. and Keighley, J.F. (1976) 'Diagnostic value of serum angiotensin converting enzyme activity in lung diseases.', *Thorax*, 31(5), pp. 552–557. Available at: <https://doi.org/10.1136/thx.31.5.552>.
- Assarsson, E. és mtsai. (2014) 'Homogenous 96-plex PEA immunoassay exhibiting high sensitivity, specificity, and excellent scalability.', *PloS one*, 9(4), p. e95192. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095192>.
- Balcells, E. és mtsai. (1997) 'Angiotensin II formation from ACE and chymase in human and animal hearts: methods and species considerations.', *The American journal of physiology*, 273(4), pp. H1769–74. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.273.4.H1769>.
- Barrios, V. and Escobar, C. (2010) 'Aliskiren in the management of hypertension.', *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions*, 10(6), pp. 349–358. Available at: <https://doi.org/10.2165/11584980-000000000-00000>.
- Bartoli, F. és mtsai. (2007) 'Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and macrovascular disease in systemic sclerosis.', *Rheumatology (Oxford, England)*, 46(5), pp. 772–775. Available at: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kel433>.
- Basu, R. és mtsai. (2017) 'Roles of Angiotensin Peptides and Recombinant Human ACE2 in Heart Failure.', *Journal of the American College of Cardiology*, 69(7), pp. 805–819. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.11.064>.
- Batterink, J. és mtsai. (2010) 'Spironolactone for hypertension.', *The Cochrane database of systematic reviews*, (8), p. CD008169. Available at: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008169.pub2>.
- Bayes-Genis, A., Barallat, J. and Richards, A.M. (2016) 'A Test in Context: Neprilysin: Function, Inhibition, and Biomarker.', *Journal of the American College of Cardiology*, 68(6), pp. 639–653. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.04.060>.
- Böhm, M. és mtsai. (2017) 'Systolic blood pressure, cardiovascular outcomes and efficacy and safety of sacubitril/valsartan (LCZ696) in patients with chronic heart failure and reduced ejection fraction: results from PARADIGM-HF.', *European heart journal*, 38(15), pp. 1132–1143. Available at: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw570>.
- Cao, Y. és mtsai. (2019) 'Ang-(1-7) treatment attenuates lipopolysaccharide-induced early pulmonary fibrosis.', *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 99(12), pp. 1770–1783. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41374-019-0289-7>.
- Cardiology, E.S. of (no date) *Position Statement of the ESC Council on Hypertension on ACE-Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers*.

- Castro-Chaves, P. és mtsai. (2010) ‘New pathways of the renin-angiotensin system: the role of ACE2 in cardiovascular pathophysiology and therapy.’, *Expert opinion on therapeutic targets*, 14(5), pp. 485–496. Available at: <https://doi.org/10.1517/14728221003709784>.
- Chang, S.-N. és mtsai. (2010) ‘Association between genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system and systolic heart failure revised by a propensity score-based analysis.’, *Cardiology*, 116(4), pp. 279–285. Available at: <https://doi.org/10.1159/000321123>.
- Chen, Y. és mtsai. (2020) ‘Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV.’, *Biochemical and biophysical research communications*, 525(1), pp. 135–140. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.071>.
- Cole-Jeffrey, C.T. és mtsai. (2015) ‘ACE2 and Microbiota: Emerging Targets for Cardiopulmonary Disease Therapy.’, *Journal of cardiovascular pharmacology*, 66(6), pp. 540–550. Available at: <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000307>.
- Coto, E., Avanzas, P. and Gómez, J. (2021) ‘The Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Coronavirus Disease 2019.’, *European cardiology*, 16, p. e07. Available at: <https://doi.org/10.15420/ecr.2020.30>.
- Crackower, M.A. és mtsai. (2002) ‘Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function.’, *Nature*, 417(6891), pp. 822–828. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature00786>.
- Cruz, N., Miranda, J.D. and Crespo, M.J. (2016) ‘Modulation of Vascular ACE by Oxidative Stress in Young Syrian Cardiomyopathic Hamsters: Therapeutic Implications.’, *Journal of clinical medicine*, 5(7). Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm5070064>.
- Csongrádi, A. és mtsai. (2018) ‘Optimized angiotensin-converting enzyme activity assay for the accurate diagnosis of sarcoidosis.’, *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 56(7), pp. 1117–1125. Available at: <https://doi.org/10.1515/cclm-2017-0837>.
- Dai, S. és mtsai. (2019) ‘Associations of ACE I/D polymorphism with the levels of ACE, kallikrein, angiotensin II and interleukin-6 in STEMI patients.’, *Scientific reports*, 9(1), p. 19719. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56263-8>.
- Danilov, S.M. és mtsai. (2010) ‘Conformational fingerprinting of the angiotensin I-converting enzyme (ACE). 1. Application in sarcoidosis.’, *Journal of proteome research*, 9(11), pp. 5782–5793. Available at: <https://doi.org/10.1021/pr100564r>.
- Danilov, S.M. és mtsai. (2019) ‘Tissue ACE phenotyping in lung cancer.’, *PloS one*, 14(12), p. e0226553. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226553>.
- Danser, A.H. és mtsai. (1995) ‘Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism.’, *Circulation*, 92(6), pp. 1387–1388. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.cir.92.6.1387>.

- Defendini, R. és mtsai. (1983) 'Angiotensin-converting enzyme in epithelial and neuroepithelial cells.', *Neuroendocrinology*, 37(1), pp. 32–40. Available at: <https://doi.org/10.1159/000123512>.
- Docherty, K.F. és mtsai. (2020) 'Sacubitril/Valsartan: Neprilysin Inhibition 5 Years After PARADIGM-HF.', *JACC. Heart failure*, 8(10), pp. 800–810. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2020.06.020>.
- Enyedi, A. és mtsai. (2020) 'Combined application of angiotensin converting enzyme and chitotriosidase analysis improves the laboratory diagnosis of sarcoidosis.', *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 500, pp. 155–162. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.10.010>.
- Esler, M. and Esler, D. (2020) 'Can angiotensin receptor-blocking drugs perhaps be harmful in the COVID-19 pandemic?', *Journal of hypertension*, 38(5), pp. 781–782. Available at: <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000002450>.
- European Medicines Agency (no date) *European Medicines Agency recommends new contraindications and warnings for aliskiren-containing medicines*. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/news/european-medicines-agency-recommends-new-contraindications-warnings-aliskiren-containing-medicines>.
- Fagyas, M., Úri, K., Siket, I.M., Daragó, A., és mtsai. (2014a) 'New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) I: endogenous angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition.', *PloS one*, 9(4), p. e87843. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087843>.
- Fagyas, M., Úri, K., Siket, I.M., Fülöp, G.Á., és mtsai. (2014) 'New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) II: albumin suppresses angiotensin converting enzyme (ACE) activity in human.', *PloS one*, 9(4), p. e87844. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087844>.
- Fagyas, M., Úri, K., Siket, I.M., Daragó, A., és mtsai. (2014b) 'New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) III: endogenous inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) provides protection against cardiovascular diseases.', *PloS one*, 9(4), p. e93719. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093719>.
- Fagyas, M. és mtsai. (2021) 'Level of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 activity is highly elevated in old-aged patients with aortic stenosis: implications for ACE2 as a biomarker for the severity of COVID-19', *GeroScience*, 43(1), pp. 19–29. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11357-020-00300-2>.
- Fagyas, M. és mtsai. (2022) 'Circulating ACE2 activity predicts mortality and disease severity in hospitalized COVID-19 patients', *International Journal of Infectious Diseases*, 115, pp. 8–16. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.11.028>.

- Fang, L., Karakiulakis, G. and Roth, M. (2020) 'Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection?', *The Lancet. Respiratory medicine*, p. e21. Available at: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30116-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30116-8).
- Fürst, Z. and Gyires, K. (2011) *A farmakológia alapjai*. Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt.
- Gaddam, R.R., Chambers, S. and Bhatia, M. (2014) 'ACE and ACE2 in inflammation: a tale of two enzymes.', *Inflammation & allergy drug targets*, 13(4), pp. 224–234. Available at: <https://doi.org/10.2174/1871528113666140713164506>.
- Gardemann, A. és mtsai. (1998) 'ACE I/D gene polymorphism: presence of the ACE D allele increases the risk of coronary artery disease in younger individuals.', *Atherosclerosis*, 139(1), pp. 153–159. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(98\)00040-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(98)00040-9).
- Hagaman, J.R. és mtsai. (1998) 'Angiotensin-converting enzyme and male fertility.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), pp. 2552–2557. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2552>.
- Hanafy, S., Tavasoli, M. and Jamali, F. (2011) 'Inflammation alters angiotensin converting enzymes (ACE and ACE-2) balance in rat heart.', *Inflammation*, 34(6), pp. 609–613. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10753-010-9269-1>.
- Hashimoto, T. és mtsai. (2012) 'ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation.', *Nature*, 487(7408), pp. 477–481. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature11228>.
- Hoffmann, M. és mtsai. (2020) 'SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor.', *Cell*, 181(2), pp. 271–280.e8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>.
- Holshue, M.L. és mtsai. (2020) 'First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States.', *The New England journal of medicine*, 382(10), pp. 929–936. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001191>.
- Hui, D.S.C. and Zumla, A. (2019) 'Severe Acute Respiratory Syndrome: Historical, Epidemiologic, and Clinical Features.', *Infectious disease clinics of North America*, 33(4), pp. 869–889. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2019.07.001>.
- Hussain, M. és mtsai. (2020) 'Association of ACE I/D Polymorphism with Risk of Diabetes in Cardiovascular Disease Patients.', *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 128(2), pp. 82–88. Available at: <https://doi.org/10.1055/a-0824-6515>.
- Ingraham, N.E. és mtsai. (2020) 'Understanding the renin-angiotensin-aldosterone-SARS-CoV axis: a comprehensive review.', *The European respiratory journal*, 56(1). Available at: <https://doi.org/10.1183/13993003.00912-2020>.

Ishiyama, Y. és mtsai. (2004) 'Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 after myocardial infarction by blockade of angiotensin II receptors.', *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 43(5), pp. 970–976. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000124667.34652.1a>.

Iwai, M. and Horiuchi, M. (2009) 'Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis.', *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 32(7), pp. 533–536. Available at: <https://doi.org/10.1038/hr.2009.74>.

Koiter, J. és mtsai. (1998) 'Sample dilution: a methodological pitfall in the measurement of tissue but not serum ace-activity.', *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 39(1), pp. 45–49. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1056-8719\(97\)00099-3](https://doi.org/10.1016/s1056-8719(97)00099-3).

Kovács, Á. és mtsai. (2016) 'Renin overexpression leads to increased titin-based stiffness contributing to diastolic dysfunction in hypertensive mRen2 rats.', *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 310(11), pp. H1671-82. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00842.2015>.

Kuno, T. és mtsai. (2020) 'Meta-Analysis Evaluating the Effects of Renin-Angiotensin-Aldosterone System Blockade on Outcomes of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction.', *The American journal of cardiology*, 125(8), pp. 1187–1193. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2020.01.009>.

Leite, R. és mtsai. (1997) 'Role of endothelium in angiotensin II formation by the rat aorta and mesenteric arterial bed.', *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 30(5), pp. 649–656. Available at: <https://doi.org/10.1590/s0100-879x1997000500013>.

Luo, Y. és mtsai. (2019) 'Association of ACE2 genetic polymorphisms with hypertension-related target organ damages in south Xinjiang.', *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 42(5), pp. 681–689. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41440-018-0166-6>.

McMurray, J.J. V és mtsai. (2013) 'Dual angiotensin receptor and neprilysin inhibition as an alternative to angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with chronic systolic heart failure: rationale for and design of the Prospective comparison of ARNI with ACEI to Determine Impac', *European journal of heart failure*, 15(9), pp. 1062–1073. Available at: <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hft052>.

Metzger, R. és mtsai. (2011) 'Heterogeneous distribution of angiotensin I-converting enzyme (CD143) in the human and rat vascular systems: vessel, organ and species specificity.', *Microvascular research*, 81(2), pp. 206–215. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2010.12.003>.

- Miller, A.J. és mtsai. (2020) 'Angiotensin-(1-7) Improves Integrated Cardiometabolic Function in Aged Mice.', *International journal of molecular sciences*, 21(14). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21145131>.
- Mitrani, R.D., Dabas, N. and Goldberger, J.J. (2020) 'COVID-19 cardiac injury: Implications for long-term surveillance and outcomes in survivors.', *Heart rhythm*, 17(11), pp. 1984–1990. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2020.06.026>.
- Momoniat, T., Ilyas, D. and Bhandari, S. (2019) 'ACE inhibitors and ARBs: Managing potassium and renal function.', *Cleveland Clinic journal of medicine*, 86(9), pp. 601–607. Available at: <https://doi.org/10.3949/ccjm.86a.18024>.
- Nadaud, S. és mtsai. (1992) 'Functional study of the germinal angiotensin I-converting enzyme promoter.', *Biochemical and biophysical research communications*, 189(1), pp. 134–140. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(92\)91535-x](https://doi.org/10.1016/0006-291x(92)91535-x).
- Nyolczas, N. (2017) 'A 2016-ban publikált új ESC szívelégtelenség irányelv krónikus szívelégtelenség diagnózisára és kezelésére vonatkozó ajánlásai', *Cardiologia Hungarica*, 47(2), pp. 73–81. Available at: <https://doi.org/10.26430/CHUNGARICA.2017.47.2.73>.
- Oranger, M. és mtsai. (2020) 'Continuous positive airway pressure to avoid intubation in SARS-CoV-2 pneumonia: a two-period retrospective case-control study.', *The European respiratory journal*. Available at: <https://doi.org/10.1183/13993003.01692-2020>.
- Parkin, E.T., Turner, A.J. and Hooper, N.M. (2004) 'Secretase-mediated cell surface shedding of the angiotensin-converting enzyme.', *Protein and peptide letters*, 11(5), pp. 423–432. Available at: <https://doi.org/10.2174/0929866043406544>.
- Patel, V.B. és mtsai. (2017) 'Recombinant Human ACE2 and the Angiotensin 1-7 Axis as Potential New Therapies for Heart Failure.', *The Canadian journal of cardiology*, 33(7), pp. 943–946. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2016.12.012>.
- Piroth, L. és mtsai. (2021) 'Comparison of the characteristics, morbidity, and mortality of COVID-19 and seasonal influenza: a nationwide, population-based retrospective cohort study.', *The Lancet. Respiratory medicine*, 9(3), pp. 251–259. Available at: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30527-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30527-0).
- Qi, Y. és mtsai. (2013) 'Diminazene aceturate enhances angiotensin-converting enzyme 2 activity and attenuates ischemia-induced cardiac pathophysiology.', *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 62(4), pp. 746–752. Available at: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01337>.
- Rathinasabapathy, A. és mtsai. (2018) 'rhACE2 Therapy Modifies Bleomycin-Induced Pulmonary Hypertension via Rescue of Vascular Remodeling.', *Frontiers in physiology*, 9, p. 271. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00271>.

- Rigat, B. és mtsai. (1990) 'An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels.', *The Journal of clinical investigation*, 86(4), pp. 1343–1346. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI114844>.
- Ryan, J.W. és mtsai. (1979) 'Mammalian inhibitors of angiotensin converting enzyme (kininase II).', *Advances in experimental medicine and biology*, 120B, pp. 599–606.
- Sama, I.E. és mtsai. (2020) 'Circulating plasma concentrations of angiotensin-converting enzyme 2 in men and women with heart failure and effects of renin-angiotensin-aldosterone inhibitors.', *European heart journal*, 41(19), pp. 1810–1817. Available at: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa373>.
- Seferovic, P.M. és mtsai. (2019) 'Clinical practice update on heart failure 2019: pharmacotherapy, procedures, devices and patient management. An expert consensus meeting report of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.', *European journal of heart failure*, 21(10), pp. 1169–1186. Available at: <https://doi.org/10.1002/ejhf.1531>.
- Siddell, S.G. és mtsai. (1983) 'Coronaviridae.', *Intervirology*, 20(4), pp. 181–189. Available at: <https://doi.org/10.1159/000149390>.
- Silverstein, E., Friedland, J. and Setton, C. (1978) 'Angiotensin-converting enzyme in macrophages and Freund's adjuvant granuloma.', *Israel journal of medical sciences*, 14(3), pp. 314–318.
- Skeggs, L.T.J., Kahn, J.R. and Shumway, N.P. (1956) 'The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme.', *The Journal of experimental medicine*, 103(3), pp. 295–299. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.103.3.295>.
- Solomon, S.D. és mtsai. (2012) 'The angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in heart failure with preserved ejection fraction: a phase 2 double-blind randomised controlled trial.', *Lancet (London, England)*, 380(9851), pp. 1387–1395. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61227-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61227-6).
- Suryamohan, K. és mtsai. (2021) 'Human ACE2 receptor polymorphisms and altered susceptibility to SARS-CoV-2.', *Communications biology*, 4(1), p. 475. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02030-3>.
- Tajbakhsh, A. és mtsai. (2021) 'COVID-19 and cardiac injury: clinical manifestations, biomarkers, mechanisms, diagnosis, treatment, and follow up.', *Expert review of anti-infective therapy*, 19(3), pp. 345–357. Available at: <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1822737>.
- The human protein atlas consortium (no date a) *ACE*. Available at: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000159640-ACE>

The human protein atlas consortium (no date b) 'ACE2'. Available at:
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000130234-ACE2>

The human protein atlas consortium (no date c) *The human protein atlas*. Available at:
<https://www.proteinatlas.org/>

Tóth, A. és mtsai. (2012) 'Dilution based inhibition assay.' Available at:
<https://patents.google.com/patent/EP2664920A1/en>

Ueda, S. és mtsai. (1998) 'ACE (I/D) genotype as a predictor of the magnitude and duration of the response to an ACE inhibitor drug (enalaprilat) in humans.', *Circulation*, 98(20), pp. 2148–2153. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.cir.98.20.2148>.

Úri, K. és mtsai. (2014) 'New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) IV: circulating ACE2 as a biomarker of systolic dysfunction in human hypertension and heart failure.', *PloS one*, 9(4), p. e87845. Available at:
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087845>.

Úri, K. és mtsai. (2016) 'Circulating ACE2 activity correlates with cardiovascular disease development.', *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*, 17(4). Available at: <https://doi.org/10.1177/1470320316668435>.

Vaduganathan, M. és mtsai. (2020) 'Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors in Patients with Covid-19.', *The New England journal of medicine*, 382(17), pp. 1653–1659. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMSr2005760>.

Volpe, M. és mtsai. (2015) 'Angiotensin II Receptor Blocker Neprilysin Inhibitor (ARNI): New Avenues in Cardiovascular Therapy.', *High blood pressure & cardiovascular prevention : the official journal of the Italian Society of Hypertension*, 22(3), pp. 241–246. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40292-015-0112-5>.

Wallentin, L. és mtsai. (2020) 'Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) levels in relation to risk factors for COVID-19 in two large cohorts of patients with atrial fibrillation.', *European heart journal*, 41(41), pp. 4037–4046. Available at: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa697>.

Walls, A.C. és mtsai. (2020) 'Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein.', *Cell*, 181(2), pp. 281–292.e6. Available at:
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>.

Wang, J. és mtsai. (2015) 'Balance between angiotensin converting enzyme and angiotensin converting enzyme 2 in patients with chronic heart failure.', *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*, 16(3), pp. 553–558. Available at:
<https://doi.org/10.1177/1470320315576257>.

Whelton, P.K. és mtsai. (2018) '2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart

Association Task ', *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 71(6), pp. 1269–1324. Available at: <https://doi.org/10.1161/HYP.0000000000000066>.

Williams, B. és mtsai. (2018) '2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension.', *European heart journal*, 39(33), pp. 3021–3104. Available at: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy339>.

Wright, J.W., Kawas, L.H. and Harding, J.W. (2013) 'A Role for the Brain RAS in Alzheimer's and Parkinson's Diseases.', *Frontiers in endocrinology*, 4, p. 158. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00158>.

Zannad, F. és mtsai. (2000) 'Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators.', *Circulation*, 102(22), pp. 2700–2706. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.cir.102.22.2700>.

Zhang, H. és mtsai. (2020) 'Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target.', *Intensive care medicine*, 46(4), pp. 586–590. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05985-9>.

Zheng, Y.-Y. és mtsai. (2020) 'COVID-19 and the cardiovascular system.', *Nature reviews. Cardiology*, 17(5), pp. 259–260. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0360-5>.

12. Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR

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

Nyilvántartási szám: DEENK/1/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bánhegyi Viktor
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10057399

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Fagyas, M.*, Bánhegyi, V.*, Uri, K., Enyedi, A., Lizanecz, E., Mányiné Siket, I., Mártha, L., Fülöp, G. Á., Radovits, T., Pólos, M., Merkely, B., Kovács, Á., Szilvássy, Z., Ungvári, Z., Édes, I., Csanádi, Z., Boczán, J., Takács, I., Szabó, G., Balla, J., Balla, G., Seferović, P. M., Papp, Z., Tóth, A.: Changes in the SARS-CoV-2 cellular receptor ACE2 levels in cardiovascular patients: a potential biomarker for the stratification of COVID-19 patients. *GeroScience*. [Epub ahead of print], 2021.
* Megosztott első szerzős közlemény.
IF: 7.713 (2020)
2. Bánhegyi, V., Enyedi, A., Fülöp, G. Á., Oláh, A., Mányiné Siket, I., Váradi, C., Bottyán, K., Lódi, M., Csongrádi, A., Umar, M. A. J., Fagyas, M., Czuriga, D., Édes, I., Pólos, M., Merkely, B., Csanádi, Z., Papp, Z., Szabó, G., Radovits, T., Takács, I., Tóth, A.: Human Tissue Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Activity Is Regulated by Genetic Polymorphisms, Posttranslational Modifications, Endogenous Inhibitors and Secretion in the Serum, Lungs and Heart. *Cells*. 10 (7), 1-13, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells10071708>
IF: 6.6 (2020)

További közlemények

3. Fagyas, M., Kertész, A. B., Mányiné Siket, I., Bánhegyi, V., Kracsó, B., Szegedi, A., Szokol, M., Vajda, G., Rácz, I., Gulyás, H., Szkibák, N., Rácz, V., Csanádi, Z., Papp, Z., Tóth, A., Sipka, S. i.: Level of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 activity is highly elevated in old-aged patients with aortic stenosis: implications for ACE2 as a biomarker for the severity of COVID-19. *GeroScience*. 43 (1), 19-29, 2021.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s11357-020-00300-2>
IF: 7.713 (2020)





4. Fülöp, G. Á., Oláh, A., Csipő, T., Kovács, Á., Pórszász, R., Veress, R., Horváth, B., Nagy, L., Bódi, B., Fagyas, M., Helgadottir, S. L., Bánhegyi, V., Juhász, B., Bombicz, M., Priksz, D., Nánási, P. P. i., Merkely, B., Édes, I., Csanádi, Z., Papp, Z., Radovits, T., Tóth, A.: Omecamtiv mecarbil evokes diastolic dysfunction and leads to periodic electromechanical alternans. *Basic Res. Cardiol.* 116 (1), 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-021-00866-8>
IF: 17.165 (2020)
5. Lódi, M., Bánhegyi, V., Bódi, B., Gyöngyösi, A., Kovács, Á., Árokszállási, A., Hamdani, N., Fagyas, M., Édes, I., Csanádi, Z., Czuriga, I., Kisvárdy, Z., Lekli, I., Bai, P., Tóth, A., Papp, Z., Czuriga, D.: Prophylactic, single-drug cardioprotection in a comparative, experimental study of doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J. Transl. Med.* 18 (1), 1-48, 2020.
IF: 5.531
6. Santer, D., Nagel, F., Gonçalves, I. F., Kaun, C., Wojta, J., Fagyas, M., Krššák, M., Balogh, Á., Papp, Z., Tóth, A., Bánhegyi, V., Trescher, K., Kiss, A., Podesser, B. K.: Tenascin-C aggravates ventricular dilatation and angiotensin-converting enzyme activity after myocardial infarction in mice. *ESC Heart Failure.* 7 (5), 2113-2122, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ehf2.12794>
IF: 4.411
7. Nagy, L., Gódeny, I., Nánási, P. P. i., Leskó, Á., Balogh, L., Bánhegyi, V., Bódi, B., Csipő, T., Csongrádi, A., Fülöp, G. Á., Kovács, Á., Lódi, M., Papp, Z.: A szív pozitív inotróp támogatása a miozin-aktivátor hatású omecamtiv-mecarbil segítségével. *Cardiol. Hung.* 47 (1), 69-76, 2017.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 49,133

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
14,313

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

Debrecen, 2022.01.05.



13. Tárgyszavak

renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

ACE

ACE2

polimorfizmus

szöveti

keringő

forrás

kardiovaszkuláris kontinuum

endogén inhibitor

SARS-CoV-2

mortalitás

14. Keywords

renin-angiotensin-aldosterone system

ACE

ACE2

polymorphism

tissue related

circulating

source

cardiovascular continuum

endogen inhibitor

SARS-CoV-2

mortality

15. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani elsősorban témavezetőmnek **Professzor Dr. Tóth Attilának**, akinek szakmai-emberi tanácsaira, támogatására mindig számíthattam Ph.D. tanulmányaim alatt. Köszönöm a példamutatást a tudatos kísérlettervezés, a minőségi tudományos publikálás és a szakmai elhivatottság terén.

Tisztelettel köszönöm tanszékvezetőnknek **Professzor Dr. Papp Zoltánnak**, hogy biztosította számomra a kutatómunka eszközös- és szakmai-anyagi háttérét, illetve támogatott tudományos munkámban és ösztöndíjpályázataimban.

Köszönetet szeretnék mondani **Dr. Fagyas Miklós, Dr. Czuriga Dániel és Dr. Csató Viktória** tanszéki kollégáimnak, illetve **Dr. Bodoki Leventének** szakmai segítségükért, tanácsaikért és a közös munkáért.

Külön köszönöm **Mányiné Siket Ivetta** laboratóriumi asszisztens önzetlen segítségét, aki nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg ténylegesen.

Kollaborációs partnereink közül kiemelt köszönettel tartozom a Debreceni Egyetem **Mellkassebészeti Tanszék munkatársainak, Dr. Lódi Máriának, Dr. Varga Alíznek, Professzor Dr. Bácsi Attilának, Prof. Dr. med. Bruno Podessernek és Dr. Kiss Attilának.**

Köszönöm szépen a **Debreceni Egyetem Klinikai Fiziológiai Tanszék** minden volt és jelenlegi munkatársának készséges segítségét és támogatását kutatómunkámban.

Köszönöm Családomnak, Édesanyámnak, Feleségemnek az odaadó támogatást.

Munkámat Kisfiamnak Medárdnak és Kislányomnak Otíliaának ajánlom.

A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00043, GINOP-2.3.2-15-2016-00050 és az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 pályázatok támogatták. A projekt az Európai Unió támogatásával és Magyarország kormányának társfinanszírozásával valósult meg.

