

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A keringő angiotenzin-konvertáló enzim 2 szerepe kardiovaszkuláris kórképekben

Úri Katalin

Témavezető: Dr. Lizanecz Erzsébet PhD



Debreceni Egyetem

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2016

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	1
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
A két szívelégtelenség típus patofiziológiája.....	7
A HFrEF patofiziológiája.....	8
A HFpEF patofiziológiája.....	9
Gyógyszeres kezelés	9
A B-típusú natriuretikus propeptid szívelégtelenségben.....	10
A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) és az ACE2 szerepe	10
CÉLKITŰZÉS	17
BETEGEK ÉS MÓDSZEREK	18
A vizsgált betegcsoportok	18
Etikai engedély.....	19
Echokardiográfiás mérések	20
A szérum gyűjtése	20
A szérum ACE aktivitásának meghatározása spektrofotometriás módszerrel.....	21
A szérum ACE2 aktivitásának mérése fluoreszcens módszerrel	22
A szérum ACE mennyiségének meghatározása.....	24
A B-típusú natriuretikus propeptid mérése	24
Statisztikai analízis.....	25
EREDMÉNYEK.....	26
A vizsgált csoportok klinikai jellemzése.....	26
A szérum ACE2 aktivitása pozitív korrelációt mutat a szisztolés szívelégtelen betegek klinikai státuszával.....	28
A biventrikuláris pacemaker hatása az echokardiográfiás paraméterekre	30
A szérum ACE2 aktivitásának összefüggése a kardiovaszkuláris megbetegedés előrehaladtával	32
A szérum ACE2 aktivitása összefüggést mutat a bal kamrai szisztolés funkció romlásával	33

Az ACE2 aktivitás és a bal kamrai diasztolés paraméterek közötti összefüggés	34
Az NT-proBNP összefüggést mutat a bal kamrai szisztolés funkció romlásával	35
Az ACE2 aktivitás és az NT-proBNP összefüggése.....	37
A szérumban ACE2 bal kamrai szisztolés diszfunkció biomarkerként történő klinikai alkalmazhatósága	38
A komorbiditások hatásai a szérumban ACE2 aktivitásra.....	40
A nem, kardiovaszkuláris kísérőbetegségek és a gyógyszeres terápia hatása a szérumban ACE2 aktivitásra	43
A szérumban ACE aktivitásának és az ACE koncentrációjának összefüggése a bal kamrai szisztolés funkcióval	45
MEGBESZÉLÉS	47
ÖSSZEFOGLALÁS	55
SUMMARY.....	56
IRODALOMJEGYZÉK	57
TÁRGYSZAVAK	65
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	66
FÜGGELÉK.....	67
New Perspectives in the Renin-Angiotensin Aldosterone System (RAAS) IV: Circulating ACE2 as a Biomarker of Systolic Dysfunction in Human Hypertension and Heart Failure.....	67
Circulating ACE2 activity correlates with cardiovascular disease development.....	81

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AA	aldoszteron antagonistá
ACC/AHA	American Coll3ge of Cardiology / American Heart Association
ACE	angiotenzin-konvertáló enzim (angiotensin-converting enzyme)
ACE2	angiotenzin-konvertáló enzim 2 (angiotensin-converting enzyme 2)
ACEi	angiotenzin-konvertáló enzim gátló (angiotensin-converting enzyme-inhibitor)
ADAM17	ADAM metalloproteáz domén 17
Ang	angiotenzin
Ang(1-7)	angiotenzin (1-7)
Ang(1-9)	angiotenzin (1-9)
AngII	angiotenzin II
AngIII	angiotenzin III
AngIV	angiotenzin IV
ARB	angiotenzin-receptor blokkoló
AT-receptor	angiotenzin II-receptor
AT ₁ R	1-es típusú angiotenzin receptor
AT ₂ R	2-es típusú angiotenzin receptor
BB	béta blokkoló
BK	bradykinin
BMI	testtömeg index
BNP	B-típusú natriuretikus peptid
CCB	kálcium-csatorna blokkoló
CRP	C-reaktív protein
CRT	kardiális reszinkronizációs terápia (Cardiac Resynchronisation Therapy)
DPBS	Dulbecco-féle foszfát puffer (Dulbecco's phosphate buffer saline)
EDD	végdiasztolés átmérő (end-diastolic diameter)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav (ethylene-diamine-tetra acetic acid)
EF	ejekciós frakció (ejection fraction)
EKG	elektrokardiogram
ELISA	enzim kötött immunoszorbens vizsgálat (enzyme linked immunosorbent assay)
ESC	Európai Kardiológiai Társaság (European Society of Cardiology)
ESD	végshisztolés átmérő (end-systolic diameter)
FAPGG	(N-(3-(2-furil)akrilóil)-L-fenilalanin-glicil-glicin)
GFR	glomeruláris filtrációs ráta
HEPES	N-2 hidroxietil-piperazin-N-2-etánszulfonsav

HFpEF	szívelégtelenség megtartott ejekciós frakcióval (heart failure with preserved ejection fraction)
HFrEF	szívelégtelenség csökkent ejekciós frakcióval (heart failure with reduced ejection fraction)
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
IL-6	interleukin 6
IRAP	inzulin-regulált aminopeptidáz
Mca-APK(Dnp)	7-metoxikumarin-4-il)acetyl-Ala-Pro-Lys(2,4-dinitrofenil)-OH
mts	munkatársai
NaCl	nátrium-klorid
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NEP	nepilysin
NO	nitrogén-monoxid
NT-proBNP	B-típusú natriuretikus propeptid N terminális fragmentje (Amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide)
NYHA	New York Heart Association
PBS	foszfát-puffer (phosphate buffer saline)
PKG	protein kináz G
PG	prostaglandin
PGE-5 inhibitor	foszfodiészteráz 5 inhibitor
RAAS	renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (renin-angiotensin-aldosterone system)
SEM	átlag közepes hibája (standard error of the means)
TACE	tumor nekrosis faktor α –konvertáló enzim
TMB	tetrametil-benzidin
TNF- α	tumor nekrosis faktor α
TRIS-HCl	trisz(hidroximetil)-aminometán klorid
ZnCl ₂	cink-klorid

BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A kardiovaszkuláris megbetegedések vezető haláloknak számítanak, mind a fejlődő, mind a fejlett országokban. Az összhalálozás mintegy egyharmadáért ez a betegcsoport a felelős. A World Health Organization adatai szerint 2008-ban 17,3 millióan haltak meg valamilyen kardiovaszkuláris megbetegedésben és 2030-ra ennek becsült értéke meghaladja a 23,3 milliót.

A fejlett országokban hozzávetőleg a populáció 0,5-2%-a szenved szívelégtelenségben (prevalencia), évente megjelenő új esetek száma 5-10/1000 fő (incidencia). Előfordulási gyakorisága szorosan összefügg az életkorral és a nemmel. Míg 50 év alatt 0,7%, 50 év felett már 5% és a 70 évnél idősebbek körében 10% fölé emelkedik. Nagyobb gyakorisággal van jelen férfiaknál (15/1000 fő), mint nőknél (12/1000 fő) [1, 2].

Ma a szívelégtelenség prevalenciája Magyarországon 1,6%, ami megközelítőleg 160 ezer szívelégtelenségben szenvedő beteget jelent, az incidencia 30-40 ezer között változik.

A szívelégtelenség (heart failure – HF) egy olyan komplex klinikai szindróma, melyet bármely strukturális vagy funkcionális kardiális rendellenesség létrehozhat, amely a bal kamra szisztolés és/vagy diasztolés funkcióját károsítja.

Dazu és Braunwald kardiovaszkuláris kontinuumról alkotott képe adott először áttekintést a szívelégtelenség patofiziológiájáról [3]. A kardiovaszkuláris megbetegedés kaszkádja a rizikófaktorokkal kezdődik, amelyek a hipertónia, a vaszkuláris károsodások, szöveti sérülések, szív és vaszkuláris remodelling. Ezek megjelenését szervi rendellenességek követik.

A betegek egy részénél ezek a rizikófaktorok a koszorúér elmeszesedéséhez és szívinfarktushoz vezetnek. Az agresszív koronária revaszkularizáció ellenére is szisztolés szívelégtelenség alakul ki, a bal kamra szisztolés funkciójának súlyos károsodásával (HFrEF). A szisztolés szívelégtelenség ilyen szempontból a hipertónia, a szívkoszorúér valamint a szívbillentyű betegségek végstádiuma lesz.

A betegek egy másik, jelentős részénél ugyanazon rizikófaktorok megléte mellett a szívelégtelenség tünetei jelentkeznek, ugyanakkor a bal kamrának izoláltan a diasztolés funkciója károsodik (HFpEF). Még mindig nem tisztázott, hogy mi lehet az a döntő momentum a kardiovaszkuláris megbetegedés kialakulásának láncolatában, ahol a két szívelégtelenség típus patofiziológiája kettévál.

Mivel a kardiovaszkuláris megbetegedések mindmáig vezető haláloknak számítanak és még a mai napig sincs rá optimális biomarker, ami a diagnózis felállításában valamint a betegség nyomon követésében specifikus biomarker lehetne, ezért nagyszámú betegpopulációban megvizsgáltuk a szívelégtelenség és az angiotenzin konvertáló enzim 2 (ACE2) aktivitás összefüggését.

Az Európai Kardiológiai Társaság (ESC) szerint a szívelégtelenség klinikai definíciója:

- szívelégtelenségre jellemző panaszok és tünetek nyugalomban vagy terhelésre
- nyugalomban a kardiális diszfunkció (szisztolés és/vagy diasztolés) igazolása objektív módszerrel (elsősorban echokardiográfia)
- a szívelégtelenség javulása megfelelő kezelésre (azokban az esetekben, ahol a diagnózis bizonytalan).

A szívelégtelenség diagnózisának fennállásához az első két kritériumnak minden esetben teljesülnie kell. [4, 5].

Az ESC 2012-es ajánlása alapján a betegség diagnózisához ajánlott vizsgálatok közé tartozik a transztorakális echokardiográfia, a 12 elvezetéses EKG, a laboratóriumi vizsgálatok (vérkép, szérum elektrolitok, vesefunkciós értékek, pajzsmirigyfunkciós tesztek, vércukor, szérumalbumin, máj-enzimek, szérum lipidek) és a mellkasröntgen vizsgálat. Kiemelt fontosságú a biomarkerek, elsősorban a natriuretikus peptid vizsgálat, mint pl. B-típusú natriuretikus peptid (BNP) vagy B-típusú natriuretikus propeptid N terminális fragmentje (NT-proBNP), amelyek jelenleg a „gold standard”-et jelentik a diagnózisalkotás során, bár korántsem tekinthetőek tökéletes biomarkereknek [5].

A szívelégtelenség egy nemrég elkülönített csoportja a diasztolés szívelégtelenség vagy más néven megőrzött ejekciós frakciójú szívelégtelenség. Fennállnak a szívelégtelenségre jellemző tünetek és panaszok. Normális vagy közel normális bal kamrai ejekciós frakció (LVEF>50%), a diasztolés diszfunkció objektív jelei, struktúrális és funkcionális szívbetegség (abnormális bal kamra relaxáció, bal kamra töltődés, bal kamra hipertrófia, bal pitvar megnagyobbodás) és emelkedett BNP szint [5-7].

A szívelégtelen betegek 30-50%-a diasztolés diszfunkció tüneteit mutatja [8]. Az akut szívelégtelen betegek körülbelül felének van megőrzött szisztolés funkciója vagy csak enyhe diszfunkciója [9]. Talán ez lehet az egyik oka annak, hogy a gyógyszeres kezelések kiábrándító eredményeket mutatnak az akut szívelégtelenség kezelésében. Ezek a vizsgálatok nem szelektáltak külön a megtartott vagy csökkent ejekciós frakciójú betegeket, habár a két csoportnak a patofiziológiája teljesen különböző.

Egy közelmúltban végzett 405 idős beteget felölelő, hosszú távú követés során fény derült arra, hogy a HFpEF betegeket az esetek 90%-ában nem diagnosztizálták, az észlelt szívelégtelen esetek 76%-át pedig helytelenül diagnosztizálták [10]. Ez is jól illusztrálja, hogy a szívelégtelenség közös/általános jelei és tünetei alapján könnyű tévesen diagnosztizálni a két szívelégtelenség típust. Az elmúlt 2 évtizedben a diasztolés szívelégtelenség prevalenciája 38%-ról 54%-ra nőtt különösen a nők és az idősek körében [6, 11, 12]. Leggyakoribb okai a kezeletlen magas vérnyomás, a cukorbetegség, a pitvarfibrilláció és az elhízás, ami kiemelt jelentőségű, mivel a tanulmányok szerint a diasztolés szívelégtelenek 80%-a túlsúlyos vagy elhízott [13-15].

A két szívelégtelenség típus patofiziológiája

Jelenlegi ismereteink szerint a csökkent ejekciós frakcióval járó szívelégtelenség (heart failure with reduced ejection fraction – HFrEF), amit szisztolés szívelégtelenségnek is nevezünk, elsősorban a szív tünetegyüttesének, egy szív szindrómának lehet tekinteni, melynek kiindulópontja a szívizomsejtek direkt károsodása.

Ezzel szemben a megtartott ejekciós frakcióval járó szívelégtelenség (heart failure with preserved ejection fraction – HFpEF), más néven diasztolés szívelégtelenség, egy szisztémás metabolikus szindróma, melynek kialakulásáért elsősorban kardiovaszkuláris rizikófaktorok a felelősek.

Elmondhatjuk tehát, hogy két különböző szindrómáról beszélünk, ahol az egyik a szívből indul ki és a perifériáig vezet (HFrEF) a másik a perifériáktól indul ki és a szívig vezet (HFpEF) [16].

A HFrEF patofiziológiája

Szisztolés szívelégtelenség során a bal kamra remodellinget a szívműködés elhalása indítja be [17]. A szívműködés elhalás különböző formái jelenhetnek meg, mint pl. autofágia, apoptózis vagy nekrozis, melyek kiváltója a szívműködésben jelenlévő oxidatív stressz [18-20]. A kiváltó okok rendszerint az isémia, fertőzés vagy toxikus ártalmak. Bármilyen is a kiváltó ok, a legfontosabb következmények:

- a szimpatikus idegrendszer aktivációja,
- a RAAS aktiválódása,
- a vazóaktív ágensek egyensúlyának felborulása, vazokonstriktor hatású molekulák szerepének érvényesülése [21].

Fibrotikus területek alakulnak ki [22], ami a bal kamra excentrikus remodellingjét eredményezi. Előrehaladott szisztolés szívelégtelenségben a szisztémás és koronária endotél diszfunkció egyaránt jelen van, ami circulus vitiosusként, vazokonstriktor ágensek túlsúlyra jutása révén, tovább rontja a bal kamra funkcióját [23, 24].

A HFpEF patofiziológiája

A HFpEF mai megközelítése szerint a kardiovaszkuláris rizikófaktorok, és kitüntetetten az elhízás szisztémás gyulladást hoznak létre a szervezetben. A proinflammatorikus állapot miatt a koronária mikroér endotélsejtek reaktív oxigén gyököket (ROS) termelnek, amelyek csökkentik a nitrogén-monoxid (NO) felhasználhatóságát, ezáltal a szívizomsejt protein kináz G (PKG) aktivitását. Az alacsony PKG aktivitás koncentrikus bal kamra remodellinget indukál, illetve a titin hipofoszforilációja révén fokozza a szívizomsejtek passzív feszülését. A merev szívizomsejtek és a hipertrófia egyaránt diasztolés bal kamra diszfunkciót okoznak [16]. A legfontosabb komorbiditások a túlsúly/elhízás, a magas vérnyomás, a diabetes, a krónikus obstruktív légúti betegség, a vérszegénység, a krónikus vesebetegség. Mindezen betegségek együttes előfordulása a szisztémás gyulladás előfordulásának esélyét növelik [25].

Gyógyszeres kezelés

A szívelégtelenség terápiájának célja manapság nem csak a panaszok és tünetek visszaszorítása, hanem a betegség progressziójának csökkentése vagy megakadályozása, a kórházi felvételek számának redukálása és a túlélés meghosszabbítása. Fontos tehát, hogy terápiás próbálkozásaink a szívelégtelenség patomechanizmusában kulcsszerepet játszó molekuláris rendszereket célozzák meg. Így kerültek a kezelés fókuszába a béta-receptor blokkolók, a RAAS-on ható ACE-gátlók, ARB-k és aldosteron antagonisták, valamint a szisztolés vagy diasztolés diszfunkció folyamányaként kialakuló volumenretenció ellen ható diuretikumok. Ezeknek a gyógyszereknek a kombinációja képezi az aktuálisan érvényes szívelégtelenség kezelési irányelvek alapját [5].

Az elmúlt néhány év vizsgálatait illetve korábbi vizsgálatok utólagos elemzései arra hívták fel azonban a figyelmet, ahogy ami HFrEF-ben jelentősen csökkenti a mortalitást/morbiditást, annak eredményessége messze elmarad a HFpEF-ben [26-29]. Így adódott a feltételezés is, hogy a HFpEF patofiziológiájában valószínűleg nem kulcsfontosságú a RAAS aktiválódása.

A B-típusú natriuretikus propeptid szívelégtelenségben

A kardiológia egyre inkább elfogadja a diagnózis felállításakor a különböző biomarkerek használatát, mint például a B típusú nátriuretikus peptidét (BNP) vagy a prekursorát az N terminális-proBNP-ét, melyek a klasszikus szisztolés szívelégtelenség során megemelkednek. Másrészt a diasztolés szívelégtelen betegek nagy részének szignifikánsan alacsonyabb NT-proBNP szintjük van, mint a szisztolés szívelégteleneknek [30, 31]. Ez magyarázható azzal is, hogy kimutatták, hogy a végdiasztolés falfeszülés, ami a BNP termelés és felszabadulás fő kiváltó tényezője, a diasztolés szívelégtelenekben sokkal alacsonyabb [30]. Mivel a diasztolés szívelégtelenek körében minden 3. betegnek normál szinten van a BNP szintje, így ez alapján nem lehet kizárni a diasztolés betegeket és így a bal kamra ejekciós frakció marad a legjobb opció arra, hogy különbséget tegyünk a két betegcsoport között [32].

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) és az ACE2 szerepe

A RAAS számos, koordinált enzimatikus reakcióból álló kaszkárendszer, melynek kulcshormonja az angiotenzin II (AngII). A kaszkád első tagja a vese által szekretált proteáz, a renin, ami a máj által termelt, a vérben keringő prekuzort, az angiotenzinogént hasítja. A reakció eredményeként jön létre az angiotenzin I, mely biológiailag inaktív. Ebből az angiotenzin-konvertáz enzim (ACE) hasítással hozza létre az aktív, biológiai hatásokért felelős oktapeptidet, az angiotenzin II-t. Az angiotenzin II hatását célsejtjein lévő receptoraihoz kötődve fejt ki. Receptorai G-proteinhez kapcsolatosak és 4 típusuk van. A két legjobban ismert és legjobban jellemzett az 1-es típusú (AT₁R) és 2-es típusú (AT₂R) angiotenzin receptor [33, 34]. Az AT₁R aktiváció felel az AngII fő kardiovaszkuláris hatásaiért, melyek a következők: vazokonstriktio, mitogén és hipertrofikus hatások, gyulladáshoz vezető válaszreakció, só- és vízretenció. Ezen hatások komplex szignalizációs útvonalak interakciója révén valósulnak meg. Fontos szerepet játszanak többek között a foszfolipidek, a NAD(P)H oxidáz stimulációja, a reaktív oxigén gyökök, bizonyos gének indukciója, a tirozin kinázok aktivációja [33]. Az AngII AT₁R-hoz kötődve a baroreflex deszenzitizációját, fokozott vízfelvételt, megnövekedett vazopresszin felszabadulást és

fokozott szimpatikus aktivitást hoz létre, mely hatások mindegyike hozzájárul a vérnyomás emelkedéshez [35]. Az AT₂R aktiváció elsősorban bradykinin (BK) és nitrogén-monoxid (NO) mediált folyamatokat indít el, melyek az előzőekkel szembeni ellenregulációs hatásokért felelnek, mint például az apoptózis, a nátriurézis, a vazodilatáció. Az AngII gyorsan lebomlik a keringésben vagy a szöveti peptidázok ún. angiotenzinázok által, angiotenzin (1-7), AngIV és angiotenzin (3-8) jön létre [33].

A RAAS elsődleges funkciója a perfúzió fenntartása, legfőbb ingere a vérvolumen csökkenése illetve a hipotenzio. A rendszer aktivációja, és az ennek következtében termelődő AngII szabályozza az artériás nyomást. Azáltal, hogy növeli a szimpatikus tónust, vazokonstriktiót és aldosteron szekréciót vált ki. Utóbbi nátrium és vízretenciót eredményez. A RAAS homeosztatisz egyensúlyának megbomlása számos kardiovaszkuláris és renális betegségben szerepet játszik, pl. magas vérnyomás, szívelégtelenség, ateroszklerózis, nefroszklerózis, szív hipertrófiás remodellingje, miokardiális infarktusz [33].

A klasszikus RAAS mellett ma már egy „*alternatív RAAS*” –ról is beszélhetünk, mely az utóbbi években felfedezett számos új biológiailag aktív peptidet és receptoraikat, valamint a már korábban is ismert komponensek újonnan felismert biológiai hatásait foglalja magába (1. ábra). Az új angiotenzin peptidekről - Ang(1-7), AngIII és AngIV - kimutatták, hogy a Mas, AT₁, AT₂ receptorokhoz és az inzulin-regulált aminopeptidázhoz (IRAP) kötődnek és szignifikáns biológiai aktivitásuk van. A legfontosabb az Ang(1-7), mely az AngII-vel ellentétes hatásokat hoz létre. Az AngIV szerepét a memória funkciókban és a vízfelvétel szabályozásában ismerték fel, a proreninnek és a reninnek pedig új, az angiotenzin termeléstől független hatásait mutatták ki, mely a prorenin receptorhoz (PRR) való kötődés és a mitogén aktivált protein kinázt (MAPK) is magába foglaló szignalizációs kaszkádrendszeren keresztül valósul meg [34].

A szintézis-, illetve a biológiai hatás helye szerint elkülöníthetünk keringő/szisztémás, lokális (szöveti és intracelluláris) RAAS-t. Szisztémás szinten az angiotenzinogént a máj, a renint a vese választja ki a keringési rendszerbe, az ACE helye a vaszkuláris endotél sejtek membránja. A szöveti rendszerben illetve intracellulárisan az AngII a lokálisan jelenlévő előanyagokból a helyi enzimrendszer által jön létre, itt valószínűleg a renin mellett cathepsin és chymase is részt vesz az AngII termelésben.

Korábbi megközelítések szerint úgy gondolták, hogy a szöveti RAAS mind a funkciót, mind a szabályozást tekintve független a szisztémás rendszertől [34]. Az utóbbi évtizedek kutatásai világítottak rá ezen, lokális rendszer kiemelt fontosságára a patofiziológiában és a terápiás hatás szempontjából egyaránt. Ez egy auto-, para- és intracrine rendszer, mely a szív remodellingben és egyéb szövetek hipertóniával összefüggésben lévő patológiás elváltozásaiban bizonyítottan szerepet játszik. Tanulmányok bizonyítják, hogy a szöveti ACE szint korrelál a miokardiális falfeszüléssel. Szintje emelkedett a miokardiális infarktuszban, a szívelégtelenségben, a szívhipertrofiában. Az eredmények szerint a plazma-RAAS szerepe az akut hemodinamikai stabilitásban elsődleges, míg a szöveti-RAAS a hosszú távú hemodinamikai hatások közvetítésében, szöveti homeosztázisban és remodellingben meghatározó [33]. A különböző típusú szövetek és sejtek renin-angiotenzin rendszerének működése és fontossága fiziológiás és patológiás körülmények között is jelentősen eltérő [34].

A rendszerben a sebesség-meghatározó lépés az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) működése. Az ACE egy dipeptidil karboxipeptidáz, mely két C-terminális aminosav (dipeptid) lehasításával fő szubsztrátjából, az AngI molekulából, a RAAS fő effektor molekuláját, az AngII-t hozza létre [36, 37]. A potens vazokonstriktor képzésén kívül szerepe van vazodilatátorok (pl. bradykinin) katabolizmusában és inaktiválásában is. A közelmúltban sikerült igazolni a szervezetben egy endogén ACE-gátló, a humán szérum albumin (HSA) jelenlétét, melynek következtében a keringő ACE aktivitása csaknem teljesen gátolva van fiziológiás körülmények között, *in vivo*. Valamint kiderült, hogy a HSA nemcsak a keringésben lévő ACE-aktivitást gátolja, hanem az endotél sejtek felszínén horgonyzott ACE-ra is gátló hatással van. A különböző mértékben hígított szérum minták specifikus aktivitásának mérése alkalmas a betegek ACE-gátló kezelésének objektív megítélésére, ezáltal a személyre szabott kezelés megvalósítására [38-40].

2000-ben két, egymástól független kutatócsoport fedezte fel [33] a RAAS ellenregulatórikus enzimét, az ACE enzim homológját, az angiotenzin konvertáló enzim 2-t (ACE2). Az ACE2 gént az X kromoszómán detektálták, az ACE-hoz hasonlóan ez is egy cink-metalloproteináz [41]. A teljes hosszúságú ACE2 cDNS egy 805 aminosavból álló, 120 kDa molekulásúlyú glikoproteint kódol, melynek szekvenciája 42%-ban homológ az ACE szekvenciával. Az aktív centrumot az amino-terminális, extracelluláris rész

tartalmazza, melyet a hidrofób transzmembrán domén köt össze a rövid, intracelluláris karboxi-terminális farok résszel [42, 43]. Ektoenzim, az extracelluláris elhelyezkedésű katalitikus helynek köszönhetően az ACE-hoz hasonlóan képes a keringő szubsztrátok hasítására, illetve a sejtfelszínről való lehasítása után szolubilis enzimként való funkcionálásra. Az ACE-val ellentétben nincsenek izoformái [33, 35]. Ismert, hogy hagyományos ACE blokkolókkal ez az enzim nem gátolható, amit a ligandkötő zseb szerkezetében, szubsztrát specificitásában és a célmolekula hasítási helyében való különbségek magyaráznak [33].

Expresszióját eredetileg a szívben, vesében és herékben mutatták ki, a polarizált sejtek apikális membránjában, míg az ACE egyenlő arányban oszlik meg az apikális és a bazális sejtmembrán között. Ezt a lokalizációs különbséget a jelentősen eltérő C-terminális szekvenciával magyarázták. A legújabb kutatások alacsonyabb koncentrációban számos más szövetből (máj, bél, tüdő, agy) is izolálták [35, 36]. Sejtszinten főleg a vaszkuláris endotél sejtekben és a renális tubuláris epitéliumban található meg, de kisebb mennyiségben a vaszkuláris simaizom sejtekben is kimutatható [35]. Mivel az ACE2 számos kardiovaszkuláris szempontból lényeges szövetben jelen van, jelentős hatással van a kardiovaszkuláris homeosztázisra. Az enzim megváltozott expressziója és funkciója összefügg a kardiovaszkuláris betegségekkel, szerepe van a renális betegségekben [44].

Funkcióját tekintve mono-karboxipeptidáz, az ACE-val szemben csak egy C-terminális aminosavat hasít le a cél molekuláról. Bár szubsztrátja az AngI és az AngII is, a szerkezeti hasonlóság ellenére az ACE2 nem alakítja az AngI-et AngII-vé. Az AngI gyenge affinitással kötődik az enzimhez, hidrolízisével angiotenzin (1-9) jön létre. Feltételezik, hogy az ACE2 az Ang(1-9) termelésével is hozzájárulhat az ACE aktivitás ellensúlyozásához, mert a molekula az AngI-el verseng az aktív helyhez való kötődésért, s így csökkenti az AngII termelést. Az ACE2 fő szubsztrátja az AngII, melynek hasításával az enzim katalitikus aktivitásának fő terméke, a vazodilatatív Ang(1-7) keletkezik. Az Ang(1-9) inaktív, belőle egyéb enzimek (ACE, NEP-nepilisin) vazodilatatív Ang(1-7) molekulát hoznak létre [35, 41]. Az ACE2 számos egyéb, fontos vasoaktív peptidet hasít, specificitása nem korlátozódik a RAAS-hoz tartozó peptidekre. Szubsztrátjai között szerepelnek az apelinek, [des-Arg9]-bradykinin, [des-Arg10]-kallidin, neurotenzin, opioidpeptidek (dynorphinA) [33, 45]. Mindezekből valószínűsíthető, hogy az ACE2 egy

multifunkcionális enzim. Összetett szabályozó szerepe van a kardiovaszkuláris funkciók mellett a neurotransmisszióban, a gyulladásos válaszban is. Az AngII termelés csökkentése mellett az ACE2 egyik fő hatásának ma az Ang(1-7) létrehozását tartjuk, mely molekula szerepét a kardiovaszkuláris kontroll (vazoaktív és növekedést okozó faktorok ellensúlyozása) egyik fő tényezőjének tekintjük. Az Ang(1-7) stimulálja a vazodilatatív prosztoglandinok szintézisét, növeli a nitrogén-monoxid termelést, potenciózza a bradykinin hatását. Antiproliferatív, antihipertrofikus hatása is van. Ezen hatások által az ACE2, mint negatív feedback hormon, ellensúlyozza az AngII vazopresszor és trofikus hatásait [33].

Az Ang(1-7) molekula receptora a Mas receptor, így az ACE2/Ang(1-7)/Mas tengely által elindított szignalizációs útvonal képviseli a RAAS ellenregulatórikus ágát. Az Ang(1-7) jótékony hatásai számos mechanizmus által valósulnak meg. Ismert például, hogy gátolja a miokardiális NAD(P)H oxidázt, így a szabadgyök képződést csökkenti, aktiválja a myocita Na-pumpát, lerövidíti az akciós potenciál időtartamát, növeli a vezetési sebességet. A ligandkötött Mas receptor hetero-oligomert képez az AT₁-receptorral, s így AngII antagonistá hatása jön létre [44].

Számos állatkísérlettel igazolták, hogy az ACE2 megváltozott expressziója, génjének hiánya vagy mutációja és a kardiovaszkuláris rendszer patológiás változásai között összefüggés lehet. Kimutatták, hogy az ACE2 gén deléció szívelégtelenséghez vezethet, illetve, hogy ez a folyamat felfüggeszthető, ha az ACE gén is deléciót szenved. A kísérleti modellekben az Ang(1-7) gátolta az AngII által stimulált remodellinget és javította a posztinfarktuszos egyedek szívfunkcióját.

Humán kísérletek eredményei szerint az ACE2 gén expressziója mind a miokardiális infarktust elszenvedett, mind a szívelégtelen betegekben növekszik. Ezek az eredmények szintén az ACE2 aktivitás ellenregulatórikus szerepe mellett szólnak.

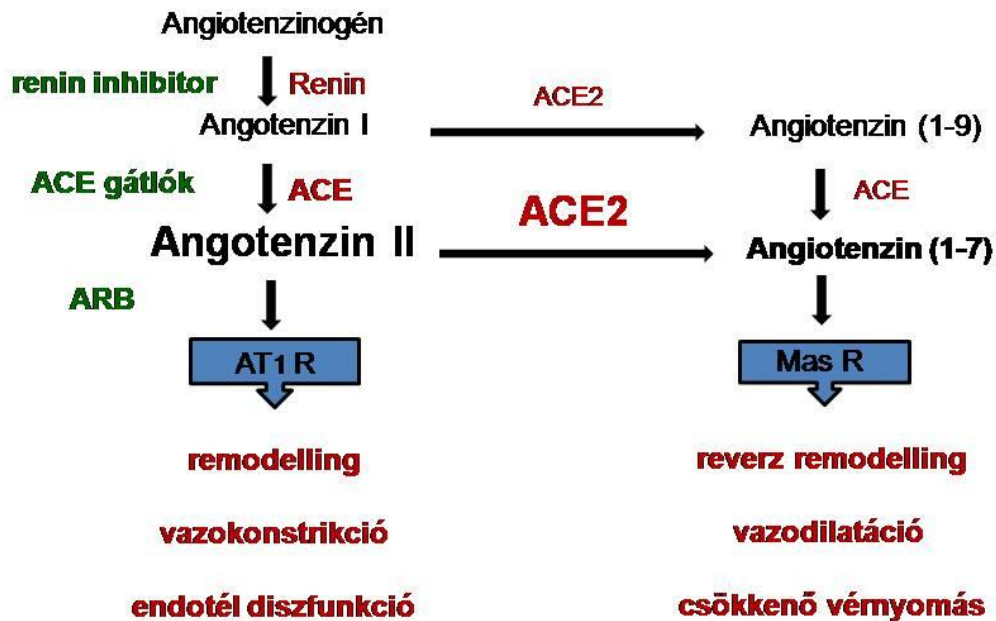
Az ACE2 enzimnek a plazmában keringő formája is ismert. A szolubilis formák immunoblott analízisével, különböző antitestek felhasználásával kimutatták az intracelluláris domének hiányát, alátámasztva ezzel, hogy a keringő forma az ektodomén lehasítása útján keletkezhet [43]. A membránhoz kötött ACE2 tehát proteolitikus hasításon megy keresztül, felszabadítva, s keringésbe juttatva ezzel az enzimatikusan aktív ektodomént. A szolubilis forma képzése a membránkötött ACE2-ből két, különböző

mechanizmussal történik. Van egy konstitutív, alacsony szintű lehasítás, és egy szabályozható útvonal, ami pl. forbol-észterrel stimulálható. Azonosították az ADAM17 (ADAM metalloproteáz domén 17) ilyen szerepét, ami a stimulált ACE2 hasítás mediátora. Másik neve a tumor nekrozis faktor α –konvertáló enzim (TACE). Az ADAM17 overexpressziója szignifikánsan megnövelte az ACE2 ektodomén termelést. Az ACE enzimről is kimutatható az ektodomén lehasítás, de a felelős szekretázt még nem azonosították, azonban az ADAM17 ilyen szerepe bizonyos tanulmányok szerint kizárható, aminek valószínűleg a juxtamembrán régióban való szekvencia eltérés az oka [43].

A szívelégtelen páciensek plazma ACE2 aktivitásának növekedését is leírták, mely nem mutatott összefüggést az etiológiával (isémiás/nem isémiás szívelégtelenség). Az eredmények azt demonstrálják, ez az emelkedés lépcsőszerűen követi a NYHA stádium illetve BNP szintje által jellemzett betegségstádiumot. Az emelkedés a prognózis becslésére is szolgálhat. A plazmából mért enzimaktivitás növekedésének hátterében a sejtfelszínről való lehasítás fokozódását valószínűsítik, mely a tumor nekrozis faktor α –konvertáló enzim (TACE) aktivitás növekedésével függ össze, mely szintén emelkedést mutat szívelégtelenségben. A jövőben a kezdődő, még tünetmentes betegekben a fokozott enzim aktivitás kimutatása lehetséges módszere lehet a korai diagnózisnak [37].

Megfigyelések szerint az ACE2 expresszió az életkorral is összefüggést mutat, úgynevezett korfüggő szöveti ACE2 aktivitás csökkenésről beszélhetünk, mely a nemtől független. Ez az idősebb betegek rosszabb klinikai kimenetelét, az ebben a korcsoportban jellemző nagyobb fokú remodellinget magyarázhatja.

A szívelégtelen betegekben a keringő ACE2 aktivitás megemelkedése jele lehet az adaptív válasznak, vagy akár a maladaptív folyamatoknak is. Ismert, hogy e betegekben a hasításért felelős proteáz szintje emelkedik, s következményként a membránkött forma relatív hiánya is megfigyelhető. Ami hozzájárulhat a kardiális diszfunkcióhoz. Ugyanakkor a keringő forma emelkedése kompenzációs lehetőséget kínál szívelégtelenségben [45].



1. ábra – A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

A rendszer egyik kulcsenzime az angiotenzin konvertáló enzim 2, melynek fő szubsztrátja az angiotenzin II, aminek hasításával az enzim katalitikus aktivitásának fő terméke, a vazodilatatív angiotenzin 1-7 keletkezik. (ACE: angiotenzin-konvertáló enzim, ACE2: angiotenzin-konvertáló enzim 2, AT1R: 1-es típusú angiotenzin receptor, ARB: angiotenzin-receptor blokkoló).

CÉLKITŰZÉS

Tudjuk, hogy a RAAS túlaktiválódása kulcsfontosságú úgy a hipertónia, mint a bármilyen eredetű HFrEF kialakulásában. Azt is tudjuk, hogy a HFrEF a betegség klinikai súlyosságával párhuzamosan emelkedő szérumban ACE2 aktivitással társul. Nem ismert azonban, hogy a HFpEF fennállásakor hogyan alakul a keringő ACE2 aktivitás.

Amennyiben a HFrEF-ben és a HFpEF-ben szenvedő betegek szérumban ACE2 aktivitása különbséget mutat, szerepet játszhat –e ez a kétféle szívelégtelenség eltérő patomechanizmusában? További kérdésünk volt, hogy a szérumban ACE2 aktivitás változása milyen információt hordozhat a „gold standard” NT-proBNP-hez viszonyítva.

Kutatásaim során célul tűztem ki, hogy:

- szisztolés szívelégtelenségben szenvedő és CRT hatására javuló bal kamra funkciójú betegekben vizsgáljam a keringő szérumban ACE2 aktivitás változását,
- karakterizáljam a szérumban ACE2 aktivitását hipertóniás, diasztolés illetve szisztolés szívelégtelenségben szenvedő betegekben,
- vizsgáljam a szérumban ACE2 aktivitás összefüggését az ejekciós frakcióval,
- megvizsgáljam a szérumban ACE2 aktivitás és az NT-proBNP változások összefüggését,
- felmérjem a szérumban ACE2 aktivitás prediktív értékét a szívelégtelenség lehetséges biomarkereként.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgált betegcsoportok

Vizsgálatunkban 4 csoportot különítettünk el, a betegbeválasztás folyamatát a 2. ábrán szemléltetjük.

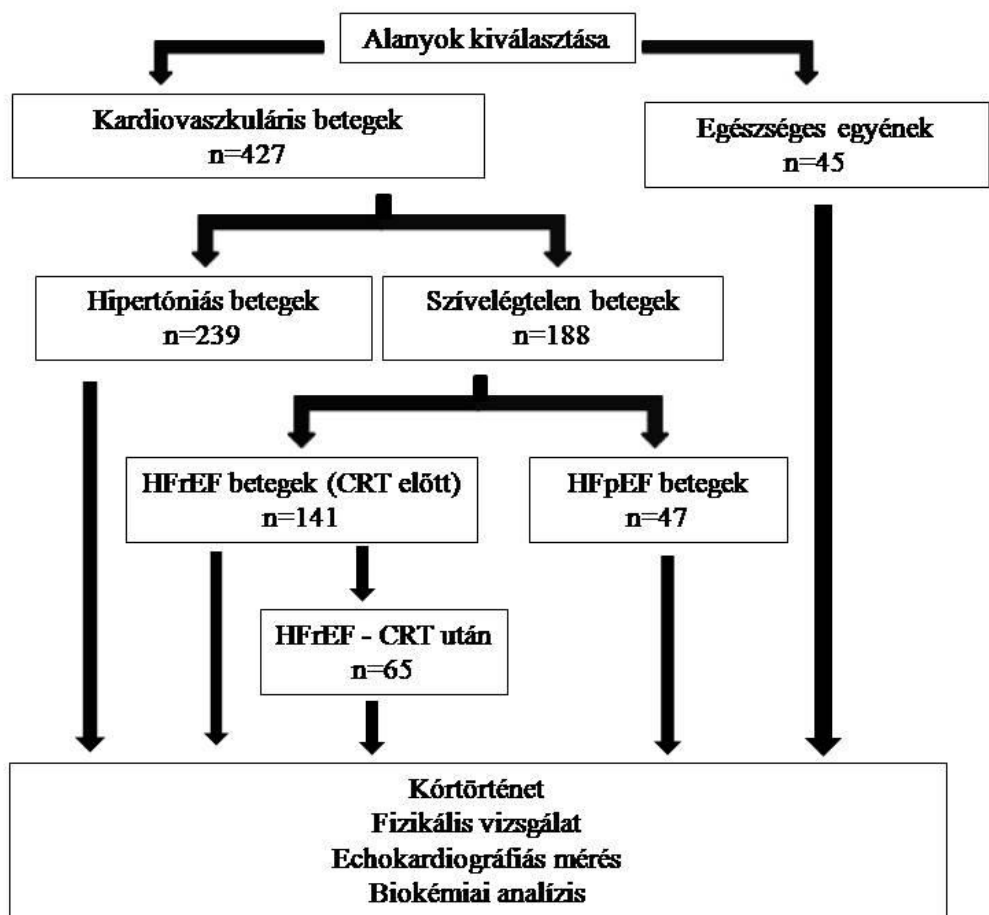
Az egészséges csoporthoz 45 személy tartozik, akiknél a bal kamrai szisztolés funkció megtartott, a morfológiai paraméterek az egészséges vagy a normális tartományban vannak, illetve gyógyszeres kezelésben nem részesültek.

A második csoportba, az általános klinikai ellenőrzésük idején, nagyszámú hipertóniás (n=239), RAAS-gátló gyógyszert szedő, de normális szisztolés kamrafunkciójú egyén is beválogatásra került.

A harmadik csoportba 141 középsúlyos/súlyos bal kamrai szisztolés diszfunkciós beteget (HF_rEF) vontunk be, akik a standard gyógyszeres kezelés mellett reszinkronizációs kezelés (CRT) céljából pacemaker beültetésre vártak. Ezeket a betegeket nyomon követtük, és a pacemaker beültetést követő 6. és 9. hónap között végzett kontrollvizsgálaton 65 beteg jelent meg (HF_rEF – CRT után).

A negyedik csoportot 47, megtartott ejekciós frakció mellett középsúlyos/súlyos diasztolés funkciózavarral rendelkező beteg (HF_pEF) alkotta, akiket egy alkalommal, a diagnózis felállításakor vontunk be a vizsgálatba.

A vizsgálatba beválogatott betegek részletes szóbeli és írásbeli tájékoztatást követően írásos beleegyezésüket adták adataik és mintáik felhasználásához.



2. ábra – Betegbeválogatás

Az egészséges egyének (Egészséges, n=45), mint kontrol csoport mellett, hipertóniás (Hipertóniás, n=239), csökkent ejekciós frakcióval járó, szisztolés szívelégteleneket (HFrEF, n=141) valamint megtartott ejekciós frakcióval járó, diasztolés szívelégtelen betegeket (HFpEF, n=47) vontunk be a tanulmányba. A HFrEF csoportból 65 betegnél került sor ismételt klinikai vizsgálatra a pacemaker beültetés után 6-9 hónappal (HFrEF – CRT után, n=65).

Etikai engedély

Minden egyes vizsgálat a Regionális- és Intézményi Kutatásetikai Bizottság (DEOEC REC/IEC: 3261-2010) engedélyével készült.

Echokardiográfias mérések

A transztorakális echokardiográfiai méréseket Accuson Sequoia (Siemens AG, Németország), valamint Vivid E9 (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom) ultrahang készülékekkel végeztük. A méréseket két, egymástól független, tapasztalt kardiológus végezte. Standard metszetekből meghatározták a bal kamrai végszisztolés (ESD) és végdiasztolés (EDD) átmérőket, valamint a Simpson módszer használatával mérték a bal kamrai ejekciós frakciót (EF). A szisztolés diszfunkcióval jellemezhető csoportban (HFrEF) jelentős mitralis regurgitáció esetén kiegészítő Doppler vizsgálatot végeztek a kontraktilitást jellemző dp/dt érték meghatározására. A megtartott szisztolés bal kamra funkciójú szívelégtelen betegeknél (HFpEF) további Doppler és szöveti Doppler méréseket végeztek (E/A érték, E/e' érték) a diasztolés diszfunkció kvantifikálására; amennyiben nem állt fenn pitvarfibrilláció és a betegek megfelelő akusztikus ablakkal rendelkeztek ehhez.

A szérum gyűjtése

Vizsgálataink során a vérmintákat aszeptikus standard technikával gyűjtöttük. A natív vér 60 percig szobahőmérsékleten inkubálódott. A szérum elkülönítése az alakos elemektől 15 perces centrifugálással történt (1,500 g), melyet a biokémiai mérésekig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztóban tároltunk.

A szérumban ACE aktivitásának meghatározása spektrofotometriás módszerrel

Az ACE aktivitás meghatározása spektrofotometriás méréssel történt Beneteau valamint Ronca-Testoni és munkatársai [46, 47] módszerének átdolgozott változata szerint. A mérés alapja a magas fényelnyelő képességű mesterséges ACE szubsztrát, a FAPGG (*N*-(3-(2-furil)akrilóil)-*L*-fenilalanin-glicil-glicin) (Sigma, St. Louis, MO, USA) hasítást követő optikai denzitás csökkenése. A 200 µl-es reakcióelegy 25 mM HEPES (*N*-2-hidroxiethyl-piperazin-*N*-2-etánszulfonsav) pufferben 0,5 mM FAPGG-t, 300 mM NaCl-ot és szükséges mennyiségű humán szérumot tartalmazott 8,2-es pH-n.

A reakció során az ACE enzim a FAPGG-t 2-furilakrilóil-*L*-fenilalanin-ra (FAP) és glicil-glicin-re (GG) bontja, ami 320 nm-es hullámhosszon mérhető optikai denzitás csökkenést eredményez. A reakció elegyet 96 lyukú lemezekben állítottuk össze (GreinerBio-One, Frickenhauser, Germany). Az optikai denzitás változást 5 perces időközönként rögzítettük legalább 90 percen keresztül 37 °C-on. A méréshez NOVostar Plate Reader berendezést használtunk (BMG Labtech GmbH, Offenburg, Germany). Az optikai denzitás változást az idő függvényében ábrázoltuk és a pontokra egyenest illesztettünk. Az illesztést akkor fogadtuk el, ha az illeszkedés mértéke (r^2) meghaladta a 0,9-et.

Az ACE aktivitást az alábbi képlet alapján számítottuk:

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

ahol az S az illesztés meredeksége (1/min), k 1 µmol FAPGG komplett hasítása során bekövetkező optikai denzitás változás, D a szérumban hígítás mértéke. 1U (egység) megfelel annak az enzim mennyiségnek, ami 1 µmol FAPGG-t egy perc alatt elbont 37 °C-on.

A szérum ACE2 aktivitásának mérése fluoreszcens módszerrel

Az ACE2 aktivitás meghatározása egy speciális fluoreszcens szubsztrát felhasználásával, a fluoreszcens jelintenzitás változásának mérése alapján történt. A mérések kivitelezése már leírt módon történt [45, 48-50] kisebb módosítással. A 200 µl-es reakcióelegy összetétele: 20 µl szérum, 80 µl puffer és 100 µl (50 µM) ACE2 specifikus fluoreszcens szubsztrát (*7-metoxikumarin-4-il*)*acetyl-Ala-Pro-Lys(2,4-dinitrofenil)-OH* [Mca-APK(Dnp)] (EZ Biolab, Carmel, USA). Az Mca-APK(Dnp), az ACE2 fluorogén szubsztrátja. A Dnp csoport kioltja az Mca fluoreszcenciáját, amíg le nem hasítódik róla. Az ACE2 hasítja le a kioltó részt, ami a bomlással párhuzamosan egy fluorszcens jelintenzitás-növekedést eredményez. A reakció puffer proteáz inhibitor koktélt is tartalmaz: 10 µM Bestatin-hidroklorid, 10 µM Z-prolyl-prolinal (Enzo Life Science, Exeter, UK), 5 µM Amastatin-hidroklorid, 10 µM Captopril, a következő puffer oldatban: 500 mM NaCl, 100 µM ZnCl₂, 75 mM TRIS HCl, pH 6,5.

A reakcióelegyet 96 lyukú, fekete lemezekben állítottuk össze (GreinerBio-One, Frickenhauser, Germany). Ezután folyamatosan mértük a növekvő fluoreszcencia jelintenzitást (excitációs hullámhossz=320 nm, emissziós hullámhossz=405 nm). A méréshez NOVOstar Plate Reader berendezést használtunk (BMG Labtech GmbH, Offenburg, Germany).

A kezdeti aktivitás meghatározása után 120 percen keresztül követtük a fluoreszcenciás intenzitás lineáris növekedését.

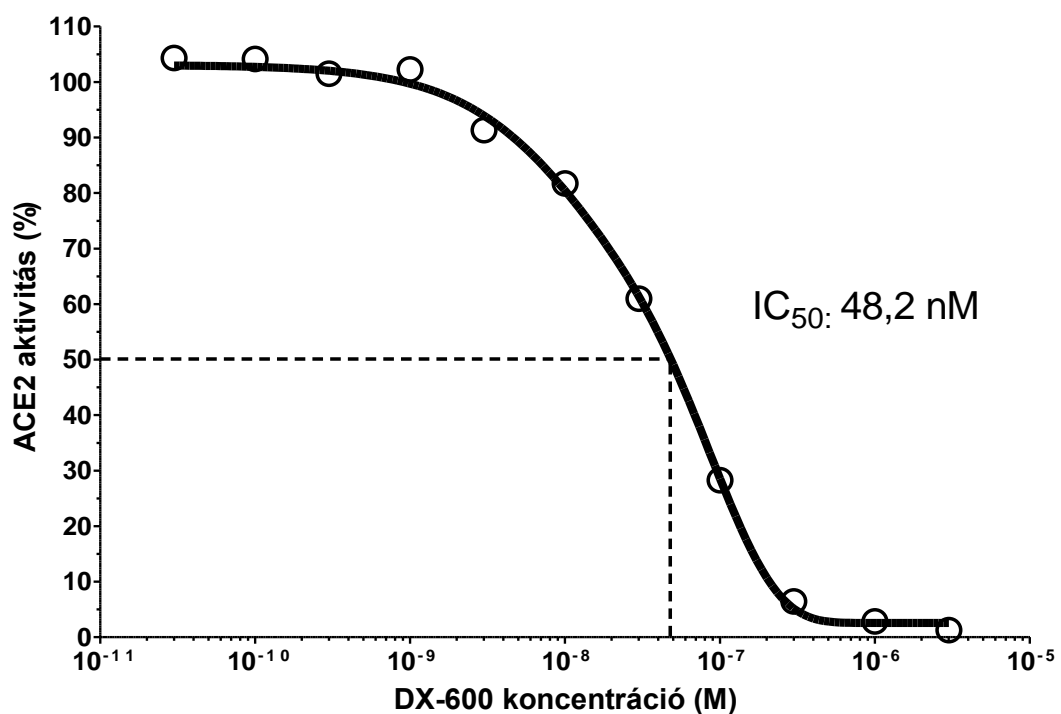
Az ACE2 aktivitást az alábbi képlet alapján számítottuk:

$$\text{ACE2 aktivitás} = -(S/k) * D,$$

ahol, S a fluoreszcens denzitás növekedésének mértéke, k 0,1 nmol Mca-APK(Dnp) komplett hasítása során bekövetkező fluoreszcens intenzitás-változás, D a szérum hígításának mértéke. 1U (egység) megfelel annak az enzim mennyiségnek, ami 0,1 nmol Mca-APK(Dnp)-t 60 perc alatt elbont 37 °C-on.

A mérés specificitását humán ACE2 gátló (DX-600) hozzáadásával ellenőriztük, mely megfelelő koncentrációban képes az ACE2 aktivitást 0-ra csökkenteni. A mért

fluoreszcens jel intenzitás-növekedése csak a hozzáadott, szérumban található ACE2 enzimnek köszönhető. A 3. ábrán látható, hogy a DX600-as inhibitor, az ACE2 aktivitás gátlásával összhangban, koncentráció függő módon gátolta az Mca-APK(Dnp) hasítását. Az illesztést akkor fogadtuk el, ha az illeszkedés mértéke (r^2) meghaladta a 0,9-et.



3. ábra – Az Mca-APK(Dnp) hidrolízis specificitása

Humán szérumból mintát 120 percig inkubáltunk, 0-3 μM koncentrációjú szérumból ACE2 inhibitor, DX600 jelenlétében. Az inhibitor az ACE2 aktivitás gátlásával összhangban, koncentráció függő módon gátolta az Mca-APK(Dnp) hidrolízisét.

A szérum ACE mennyiségének meghatározása

A szérum ACE mennyiségét egy kereskedelmi forgalomban kapható ACE ELISA Development kittel (catalog No. DY929; R&D System, Inc, Minneapolis, USA) határoztuk meg, a gyártó utasításai szerint, kisebb módosításokkal. A 96 lyukú ELISA lemezeket (GreinerBio-One, Frickenhauser, Germany) 80 ng DPBS-ben (Dulbecco foszfát puffer, Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA) feloldott, kecskében termeltetett humán ACE-ellenes capture vagy elkapó) antitesttel fedtük le (az inkubáció egy éjszakán át történt, szobahőmérsékleten). A szabadon maradt kötőhelyeket reagens hígítóval (10 mg/ml borjú szérum albumin DPBS-ben oldva, Sigma, St. Louis, MO, USA) fedtük le. A reagens hígítóban (10 mg/ml borjú szérum albumin DPBS-ben oldva) 100-szorosára hígított szérumot adtunk a lyukakba és 2 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az antitest-antigén komplexet biotinált, szintén kecskében termeltetett humán ACE-ellenes detekciós antitesttel (20 ng/well) inkubáltuk 2 órán keresztül. Ezután egy 20 perces 200-szorosára hígított streptavidin konjugált torna-preoxidázos inkubáció történt. A lemezhez kötött komplexek mennyiségét szubsztrát oldattal határoztuk meg, ami 0,3 mg/ml tetrametil-benzidint (TMB), 0,1 μM H_2O_2 -t és 50 mM ecetsavat tartalmazott. A reakciót körülbelül 20 perc elteltével 0,5 M sósavval állítottuk le és 450 nm-en detektáltuk az optikai denzitást NOVOstar Plate Reader segítségével (BMG Labtech GmbH, Offenburg, Germany). Az ACE koncentrációt rekombináns ACE-standard sor segítségével számoltuk ki. A méréseket legalább háromszor ismételtük meg, hogy a szórás legfeljebb 15% legyen. A szérum ACE koncentrációt ng/ml-ben kaptuk meg.

A B-típusú natriuretikus propeptid mérése

Az NT-proBNP szint mérését szérumból végeztük egy kereskedelemben elérhető kittel, a gyártó által meghatározott utasítások szerint (Elecsys pro BNP II., Roche Ltd., Mannheim, Germany).

Statisztikai analízis

Az eredményeket minden csoportban átlag \pm S.E.M. szerint adtuk meg. A biokémiai mérések statisztikai értékelését egyszempontos variancia analízissel (one-way ANOVA) végeztük (a szérum ACE2 és a szérum ACE mérések során), az egyes csoportok többszörös összehasonlítását Kruskal-Wallis teszttel (4, 5 A-C, 6, 9 A, 12, 14 ábrák) végeztük. A páros összehasonlítást nemparametrikus Wilcoxon próbával végeztük (4 C, 5 D ábrák). A szérum ACE2 aktivitás és a klinikai paraméterek közötti összefüggéseket lineáris regressziós analízissel hasonlítottuk össze (7, 8, 9 B-C, 10 ábrák). Minden esetben a $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A statisztikai elemzésekhez a következő szoftvert használtuk: GraphPad Prism, version 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

EREDMÉNYEK

A vizsgált csoportok klinikai jellemzése

A betegek klinikai paraméterei, kardiovaszkuláris rizikófaktorai, valamint gyógyszeres terápiájuk az 1-es táblázatban láthatóak. Vizsgálatunkban 4 csoportot különítettünk el: egészséges csoport, hipertóniás betegek csoportja, szisztolés szívelégtelen csoport (HFrEF) és diasztolés funkciózavarral rendelkező beteg csoport (HFpEF).

Az egészséges csoport tagjai normál szívműködéssel és morfológiával rendelkeznek a szívelégtelenség jelei/tünetei nélkül. Ezen csoport gyógyszeres kezelés alatt nem állt. A betegeket úgy vontuk be a tanulmányba, hogy a kardiovaszkuláris kontinuum minden főbb stádiumát reprezentálni tudjuk egy-egy betegcsoporttal.

A szívelégtelen csoportban a kardiovaszkuláris kísérőbetegségek közül a magas vérnyomás volt a leggyakoribb. A szisztolés szívelégtelen (HFrEF) csoportban megnagyobbodott bal kamrai végszisztolés és végdiasztolés átmérők mellett a szív ejekciós frakciója minden esetben nagymértékben csökkent. A betegek közepsúlyos (NYHAI) – súlyos (NYHAIII-IV) szisztolés szívelégtelenségben szenvedtek, valamint a biventrikuláris pacemaker (CRT-D) beültetés összes kritériumának megfeleltek (HFrEF – CRT előtt). A szisztolés szívelégtelen csoportból 65 betegnél került sor ismételt klinikai vizsgálatra a pacemaker beültetés után 6-9 hónappal (HFrEF – CRT után). A magas vérnyomásos valamint a diasztolés szívelégtelen (HFpEF) csoport betegek normál bal kamrai átmérőkkel és megőrzött szisztolés bal kamra funkcióval rendelkeztek ($EF > 50\%$).

A vizsgálatokra a bevonás alkalmával került sor (egészséges és HFpEF csoport) vagy az általános klinikai ellenőrzés idején (hipertóniás csoport). A szisztolés szívelégtelen csoportban közvetlenül a pacemaker implantáció előtt (HFrEF – CRT előtt), valamint 6-9 hónappal az implantáció után (HFrEF – CRT után). Minden fizikális vizsgálat alkalmával történt echokardiográfiás mérés, valamint vérvétel a biokémiai mérésekhez. A NYHA stádiumot két független klinikus állapította meg, akik nem voltak tudatában az echokardiográfiás értékeknek. A betegek kórtörténete és korábbi gyógyszeres kezelése is rögzítésre került. A betegek gyógyszeres kezelése megfelelt a hazai és nemzetközi ajánlásoknak.

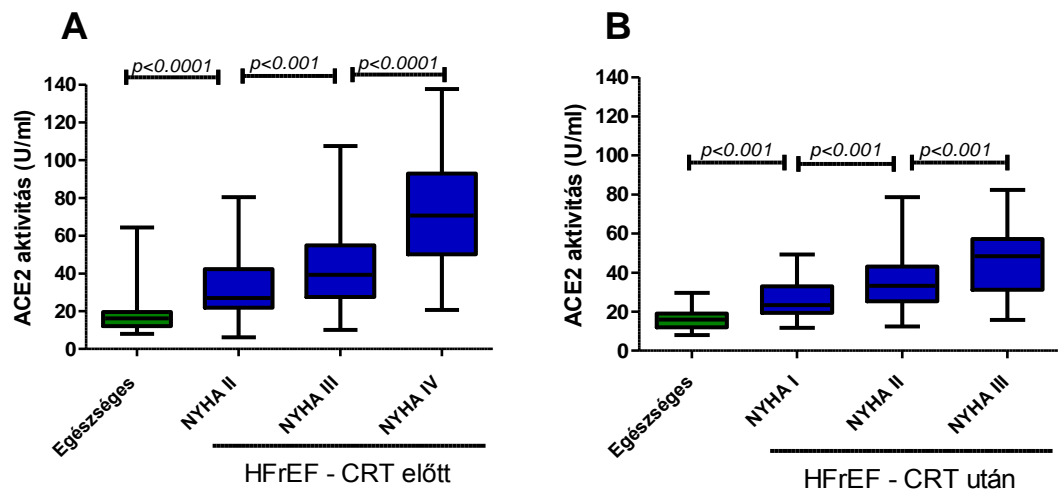
1. Táblázat				
Betegcsoport	Egészséges csoport n=45	Hipertenzív betegek n=239	HFpEF betegek n=47	HFrEF betegek n=141
Kor, év (átlag±szórás)	30,2±8,7	62,3± 9,6*	70,1±8,8*#	63± 10,8*#
Nem: férfi, %	45	59	22	77
Kardiovaszkuláris komorbiditások, %				
Hipertónia	0	100	100	73
Diabétesz	0	23	36	30
Diszlipidémia	0	70	75	72
Pitvarfibrilláció	0	7	34	21
CRP (mg/l)	-	-	3,6±2,6	6,2±7,6
Vese funkció				
GFR>90 ml/min/1,73m ² (%)	-	-	25.7	33.3
GFR: 60-89 ml/min/1,73m ² (%)	-	-	41.8	40.2
GFR: 30-59 ml/min/1,73m ² (%)	-	-	30.2	25
GFR<30 ml/min/1,73m ² (%)	-	-	2.3	1.5
BMI (kg/m ²)	24,9±4,0	29,9±5,5*	31,9±5,4*#	27,7±5,8*#
Echokardiográfiás paraméterek (átlag±szórás)				
LVEF, %	62,0±4,2	56,6± 4,6*	60,9±6,9#	28,6± 5,7*#
LVEDD, mm	48,6±3,9	51,7± 5,7*	51,1±6,7	67,2± 9,5*#
LVESD, mm	29,9±3,6	33,4± 5,4*	32,3±6,2	56,3± 9,9*#
Gyógyszeres kezelés, %				
ACE inhibitor	0	83	57	91
ARB	0	15	39	9
β-Blokkoló	0	79	96	100
Aldoszteron antagonistá	0	6	8.2	100
Diuretikum	0	53	96	92
*: egészséges vs. többi csoport #: hipertenzív vs. többi csoport				

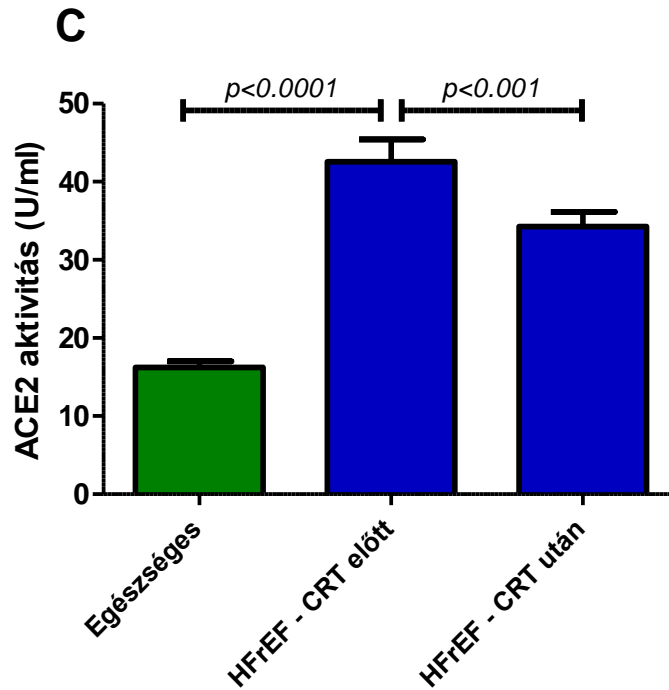
1. táblázat - A tanulmányba bevont betegcsoportok általános jellemzői

A tanulmányban 4 csoportot különböztünk meg: egészséges, hipertóniás, szívelégtelen megtartott bal kamra funkcióval (HFpEF) valamint szívelégtelen csökkent bal kamra funkcióval (HFrEF). A csoportok közötti statisztikai különbségeket egytényezős variancia analízissel állapítottuk meg (ANOVA). *: jelöli az egészséges csoporttól való szignifikáns eltérést, #: jelöli a hipertóniás csoporttól való szignifikáns eltérést. A HFrEF csoportnál a BMI értékek esetén 64 betegnek volt elérhető/alkalmazható adata.

A szérumban ACE2 aktivitása pozitív korrelációt mutat a szisztolés szívelégtelen betegek klinikai státuszával

A közepes/súlyos szívelégtelenségben szenvedő és biventrikuláris pacemaker implantációra (CRT) váró betegeknél (CRT előtt) azt találtuk, hogy a szérumban ACE2 aktivitás szoros összefüggést mutat a funkcionális stádium romlásával (HFrEF - CRT előtt: NYHAII: $32,8 \pm 2,5$ U/ml, NYHAIII: $43,0 \pm 2,4$ U/ml, NYHAIV: $72,3 \pm 6,3$ U/ml, 4. A ábra). Ezen összefüggés változatlan maradt a pacemaker implantáció után 6-9 hónappal is (HFrEF - CRT után: NYHA I: $25,8 \pm 2,5$ U/ml, NYHAII: $35,4 \pm 2,3$ U/ml, NYHAIII: $45,9 \pm 6,0$ U/ml, 4. B ábra). A klinikai státusz a legtöbb HFrEF beteg esetében javult. Azoknál a betegeknél, akiknél a CRT-t követően el lehetett végezni a 6-9 hónapos kontroll vizsgálatot, jelentős ACE2 aktivitás csökkenést tapasztaltunk a pacemaker beültetés után a reverz remodellinggel összhangban (HFrEF - CRT után: $38,3 \pm 3,1$ U/ml; $p < 0,001$, 4. C ábra).



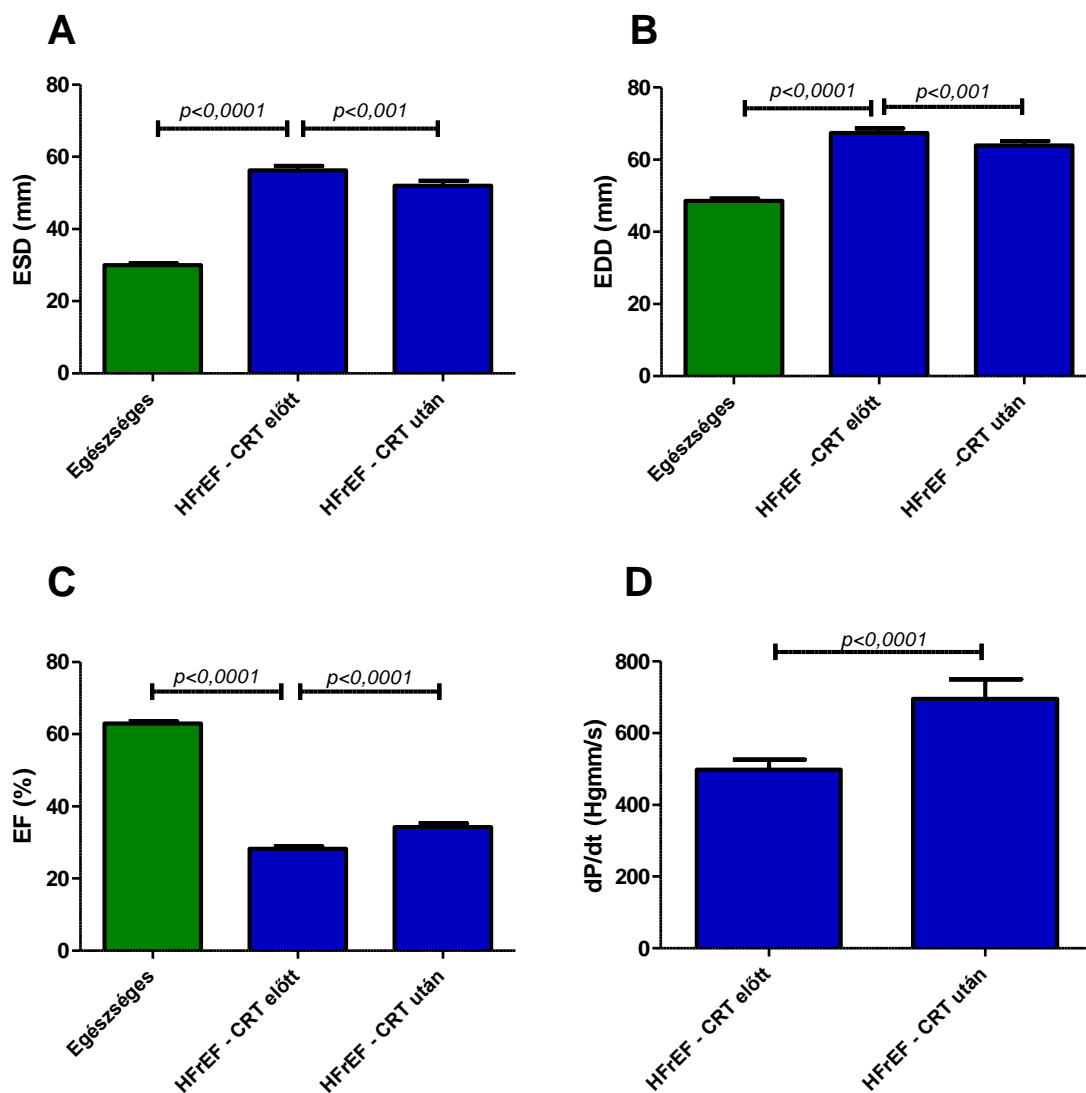


4. ábra – Emelkedő ACE2 aktivitás a funkcionális stádium romlásával párhuzamosan

Az ábra a szérumban lévő ACE2 aktivitását mutatja közepes/súlyos szisztolés szívelégtelen betegekben a biventrikuláris pacemaker terápia előtt (HFrEF-CRT előtt, n=141) valamint 6-9 hónappal a beültetés után (HFrEF-CRT után, n=65) egészséges egyének értékeivel összehasonlítva (Egészséges, n=45). A betegeket a NYHA funkcionális stádium szerint csoportosítottuk (HFrEF - CRT előtt: NYHAI: n=47; NYHAII: n=73; NYHAIV: n=21, A ábra; HFrEF - CRT után: NYHAI: n=17; NYHAII: n=37; NYHAIV: n=11, B ábra). A csoportok együttes összehasonlítása nemparametrikus Kruskal-Wallis teszttel történt (A, B, C ábra), a páros összehasonlítás pedig nemparametrikus Wilcoxon próbával (HFrEF-CRT előtt és után, n=65, C ábra). Az oszlopok az átlag értéket és a szórást mutatják. A statisztikailag szignifikáns különbségeket a *p* érték mutatja.

A biventrikuláris pacemaker hatása az echokardiográfiás paraméterekre

A szisztolés szívelégtelen betegeknél a reszinkronizációs kezelés előtt (HF_rEF-CRT előtt) a bal kamra tág, nagy a végszisztolés és a végdiasztolés átmérő az egészséges egyénekhez képest (5. A és B ábra). A funkcionális paramétereket vizsgálva látható, hogy a szisztolés szívelégtelen csoportban a reszinkronizációs terápia kezdetén jelentősen csökkent az ejekciós frakció (5. C ábra). A betegek biventrikuláris pacemakerrel történő kezelésének már az első 6-9 hónapját követően szignifikáns csökkenést látunk a bal kamrai átmérőkben (HF_rEF-CRT után: ESD: 56,3±1,2 mm-ről 51,9±1,4 mm-re; $p < 0,001$, EDD: 67,2±1,2 mm-ről 63,9±1,2 mm-re; $p < 0,01$, 5. A, B ábra). A pumpafunkció a kezelés hatására szintén szignifikáns emelkedést mutat már 6-9 hónap után, a reverz remodelling folyamatával összhangban (HF_rEF-CRT után: EF: 28,3±0,7 %-ról 34,2±1,1 %-ra; $p < 0,001$, 5. C ábra). Azoknál a szisztolés szívelégtelen betegeknél, akiknél echokardiográfiával jól mérhető mitralis regurgitáció áll fenn, a bal kamra kontraktilitását jellemző dP/dt érték mérhető. Ez normálisan 1200 Hgmm/s körüli érték. Súlyos bal kamra diszfunkció esetén a dP/dT alacsony, a CRT hatására pedig jelentős javulást mutat (HF_rEF-CRT után: dP/dt: 498,2±27,1 Hgmm/s-ről 695,4±54,0 Hgmm/s-ra, $p < 0,001$, 5. D ábra).

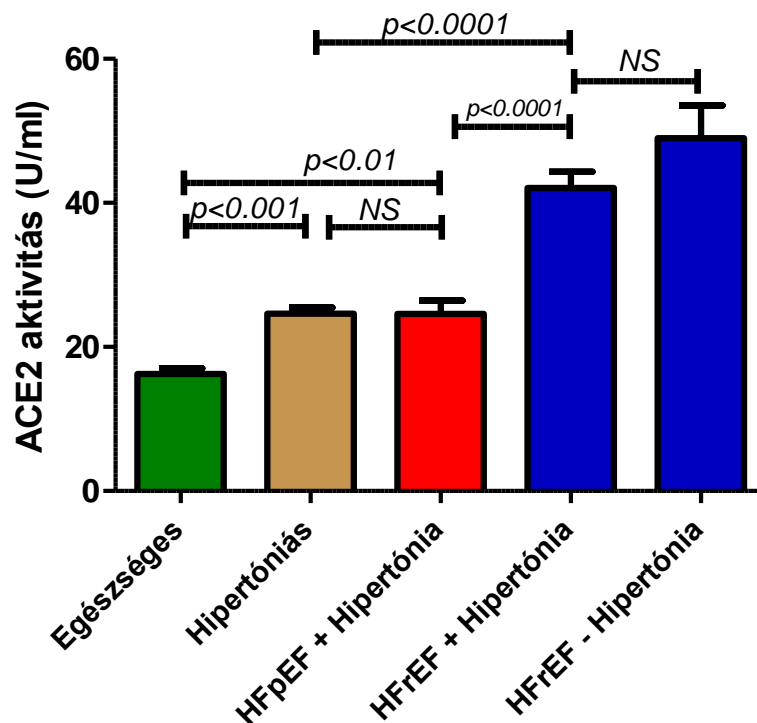


5. ábra – A CRT kezelés hatására javuló echokardiográfiai paraméterek

A középsúlyos/súlyos szisztolés szívelégtelenségben szenvedő betegek (HFrEF, n=65) bal kamrai végszisztolés (ESD, A ábra), végdiasztolés átmérőjét (EDD, B ábra) és ejekciós frakcióját (EF, C ábra) egészséges egyénekével (Egészséges, n=45) hasonlítottuk össze, illetve a szisztolés szívelégtelen betegekénél megmértük a kamrai kontraktilitást jellemző dP/dt értéket (HFrEF, n=22, D ábra). A CRT után valamennyi vizsgált paraméterben jelentős javulást tapasztaltunk. A csoportok együttes összehasonlítása nemparametrikus Kruskal-Wallis teszttel történt (A-C ábra) a páros összehasonlítás pedig nemparametrikus Wilcoxon próbával (HFrEF-CRT előtt és után: A-C ábra, dP/dt: D ábra). Az oszlopok az átlag értéket és a szórást mutatják. A statisztikailag szignifikáns különbségeket a p érték mutatja.

A szérumban ACE2 aktivitásának összefüggése a kardiovaszkuláris megbetegedés előrehaladtával

A szérumban ACE2 aktivitás szintje az egészséges csoportban a legalacsonyabb (Egészséges: $16,2 \pm 0,8$ U/ml). Amikor a kardiovaszkuláris kontinuumban elhelyezve betegeinket a hipertóniás betegeket vizsgáltuk, megtartott bal kamra funkció mellett egy mérsékelt ACE2 aktivitás emelkedést (Hipertóniás: $24,8 \pm 0,8$ U/ml) tapasztaltunk. Az ACE2 szint még tovább emelkedett, amikor a magas vérnyomás mellé még szisztolés szívelégtelenség is társult (HF_rEF+Hipertónia: $42,1 \pm 2,2$ U/ml). A legmagasabb ACE2 aktivitást a hipertónia nélküli HF_rEF csoportban detektáltuk (HF_rEF-Hipertónia: $49,0 \pm 4,5$ U/ml). Ezzel szemben a megőrzött bal kamra funkcióval rendelkező szívelégtelen csoportnak, ahol minden beteg egyben hipertóniás is, az ACE2 szintje megegyezik a pusztán magas vérnyomásos betegekével (HF_pEF+Hipertónia: $24,6 \pm 1,9$ U/ml). Ez a megfigyelés alátámasztotta azt a hipotézisünket, hogy az ACE2 enzim specifikus markere lehetne a szisztolés szívelégtelenségnek.

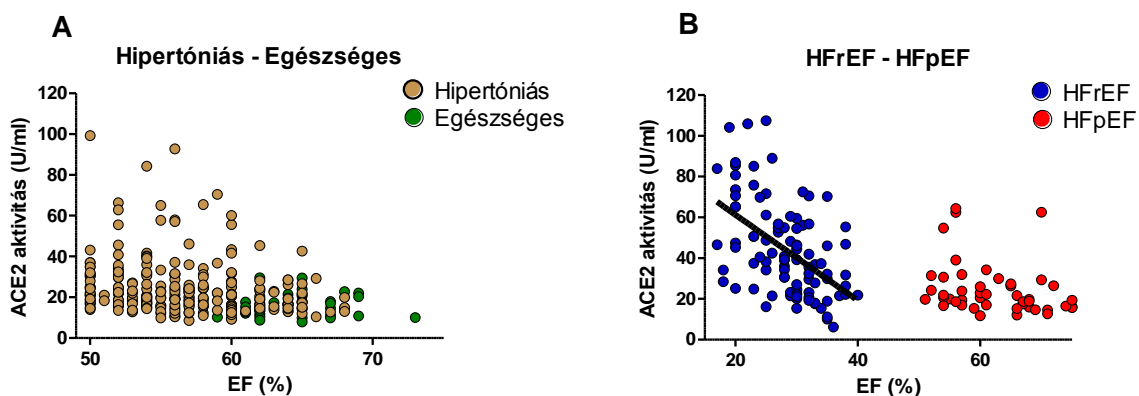


6. ábra – Eltérő ACE2 aktivitás a kardiovaszkuláris kontinuum különböző fázisaiban

A szérumban ACE2 aktivitását meghatároztuk egészséges egyéneknél (Egészséges, n=45), hipertóniás betegeknél (Hipertóniás, n=239), közepsúlyos/súlyos szisztolés szívelégtelen betegeknél (HFrEF, n=141) valamint diasztolés szívelégtelen betegeknél (HFpEF+Hipertónia, n=47) egyaránt. A diasztolés szívelégtelen csoportban a betegek 100%-a magas vérnyomásos volt. A szisztolés szívelégtelen csoportban elkülönítettük a hipertóniás és a nem hipertóniás betegeket (HFrEF+Hipertónia: n=102, HFrEF-Hipertónia: n=39). A csoportok együttes összehasonlítása nemparametrikus Kruskal-Wallis teszttel történt. Az oszlopok az átlag értéket és a szórást mutatják. A statisztikailag szignifikáns különbségeket p érték mutatja. A statisztikai különbség hiányát NS-el jelöltük.

A szérumban ACE2 aktivitása összefüggést mutat a bal kamrai szisztolés funkció romlásával

A szívelégtelenségben leggyakrabban mért objektív paraméter mindmáig az ejekciós frakció. Individuálisan megvizsgáltuk az egyes csoportokban az ACE2 aktivitás összefüggését az ejekciós frakcióval. Azt tapasztaltuk, hogy kizárólag a szisztolés szívelégtelen csoportban (HFrEF: $p < 0,0001$, $r^2 = 0,2$, 7. B ábra) mutat erős negatív korrelációt az ejekciós frakció és az ACE2 enzim aktivitás. Megtartott szisztolés bal kamra funkciók mellett (Egészséges, 7. A ábra; Hipertóniás, 7. A ábra; HFpEF, 7. B ábra), nem igazolható összefüggés.

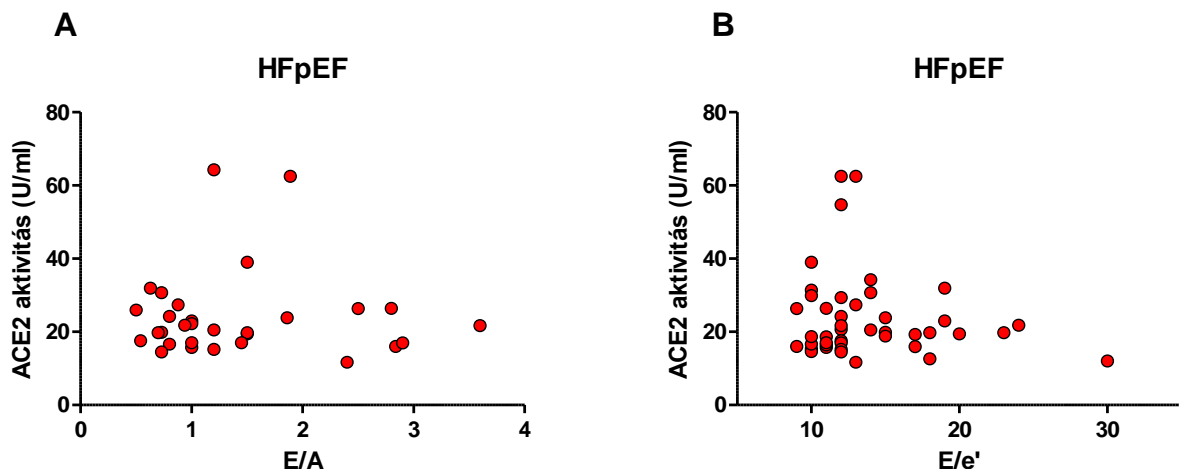


7. ábra – A szérumban ACE2 aktivitás összefüggése a bal kamrai ejekciós frakcióval

Az ábra a szérumban ACE2 aktivitás összefüggését mutatja a bal kamrai ejekciós frakcióval (Egészséges, n=45, A ábra), megőrzött szisztolés bal kamra funkciójú betegekben (Hipertóniás, n=239, A ábra; HFpEF, n=47, B ábra) valamint csökkent szisztolés bal kamra funkciójú betegekben (HFrEF, n=141, B ábra). Minden pont egy-egy individuális beteget jelöl. A pontokra egyenest illesztettünk, ahol $p < 0,05$, és $r^2 > 0,1$ korreláció állt fenn. A p a szignifikancia, az r^2 pedig a korrelációs együtthatót jelöli.

Az ACE2 aktivitás és a bal kamrai diasztolés paraméterek közötti összefüggés

Kiragadtunk két könnyen értékelhető bal kamra diszfunkciós paramétert és megvizsgáltuk, hogy a diasztolés diszfunkció súlyossága és az ACE2 között van-e bármi összefüggés. Azokban a betegekben, ahol a megőrzött szinuszritmus és/vagy a megfelelő akusztikus ablak lehetővé tette az E/A illetve az E/e' értékek meghatározását, nem találtunk összefüggést a szérumban ACE2 aktivitás és a bal kamrai diasztolés paraméterek között (E/A, 8. A ábra, E/e', 8. B ábra) a HFpEF csoportban.

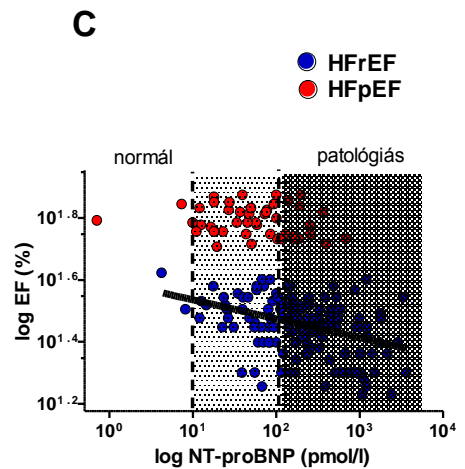
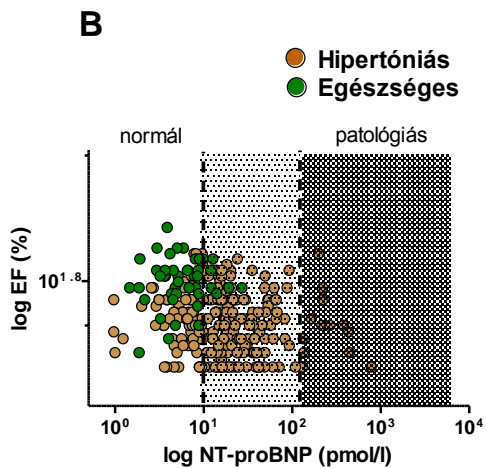
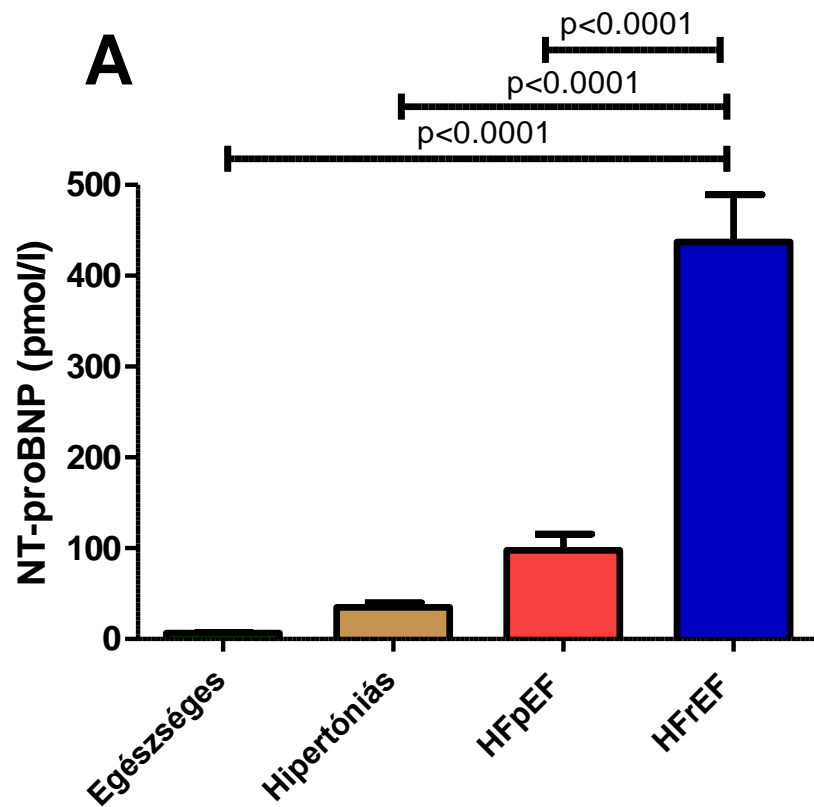


8. ábra –A szérumb ACE2 aktivitás és a diasztolés diszfunkciós paraméterek közötti összefüggés

A súlyos diasztolés diszfunkcióval jellemezhető HFpEF csoportban nem találtunk összefüggést a szérumb ACE2 aktivitás és a bal kamrai diasztolés paraméterek között (E/A: n=30, A ábra; E/e': n=43, B ábra). A korrelációt $p < 0,05$, és $r^2 > 0,1$ esetén állapítjuk meg. A p a szignifikancia, az r^2 pedig a korrelációs együtthatót jelöli.

Az NT-proBNP összefüggést mutat a bal kamrai szisztolés funkció romlásával

A B-típusú natriuretikus propeptid a leggyakrabban használt biokémiai marker a szívelégtelenség progressziójának vizsgálata során. Vizsgálatunkban egészséges egyénekhez képest már a hipertóniás, szívelégtelenségben nem szenvedő betegekben is enyhe emelkedést mutatott a szérumb NT-proBNP szintje (Egészséges: $6,5 \pm 0,7$ pmol/l; Hipertóniás: $32,5 \pm 4,8$ pmol/l, 9. A ábra). Látjuk, hogy a natriuretikus propeptid felszabadulás mindkét szívelégtelenség formában aktiválódik, miközben a HFpEF és HFrEF csoportok NT-proBNP értéke igen jelentősen eltért egymástól (HFpEF: 98 ± 18 pmol/l; HFrEF: 437 ± 52 pmol/l, 9. A ábra). Jelenleg klinikai irányelvek alapján, a szívelégtelenség diagnózisának felállításakor a natriuretikus peptidek határértéke nem különbözik a szisztolés és a diasztolés szívelégtelenség során, viszont az elmúlt egy évben megjelent irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a natriuretikus peptidek talán kevésbé hasznos prognosztikai és diagnosztikai markerek HFpEF fennállása során, mint a HFrEF esetében. Ezért individuálisan megvizsgáltuk az egyes vizsgálati csoportokban az NT-proBNP marker összefüggését az ejekciós frakcióval. Azt tapasztaltuk, hogy kizárólag a szisztolés szívelégtelen csoportban (HFrEF: $p < 0,0001$, $r^2 = 0,2$, 9. C ábra) mutat erős negatív korrelációt az ejekciós frakció és az NT-proBNP. Megtartott szisztolés bal kamra funkciók mellett (Egészséges, 9. B ábra; Hipertóniás, 9. B ábra; HFpEF: 9. C ábra), nem igazolható összefüggés.

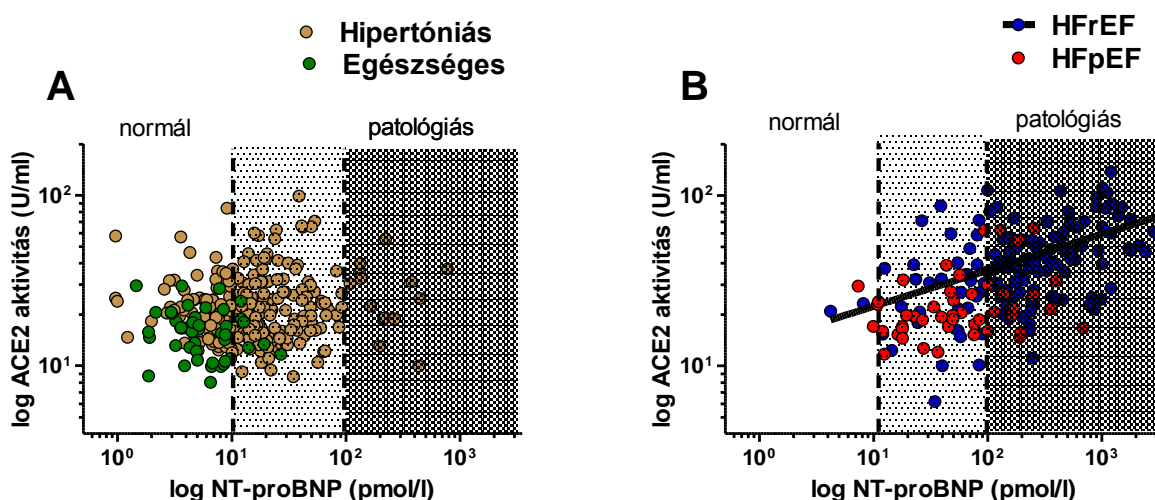


9. ábra – Az NT-proBNP szint összefüggése a bal kamrai ejekciós frakcióval

Az A panel az egyes vizsgálati csoportok NT-proBNP átlagos értékét mutatja (Egészséges, $n=45$, Hipertóniás, $n=239$, HFrEF, $n=141$, HFpEF, $n=47$). A csoportok együttes összehasonlítása nemparametrikus Kruskal-Wallis teszttel történt (A ábra). Az oszlopok az átlag értéket és a szórást mutatják. A statisztikailag szignifikáns különbségeket a p érték mutatja. A további panelek az NT-proBNP szint ejekciós frakcióval való összefüggését mutatják egészséges egyéneknél (Egészséges, $n=45$, A ábra), megőrzött szisztolés bal kamra funkciójú betegekben (Hipertóniás, $n=239$, A ábra; HFpEF, $n=47$, B ábra) valamint csökkent szisztolés bal kamra funkciójú betegekben (HFrEF, $n=141$, B ábra). Minden pont egy-egy individuális beteget jelöl. A pontokra egyenest illesztettünk, ahol $p < 0,05$, és $r^2 > 0,1$ korreláció állt fenn. A p a szignifikancia, az r^2 pedig a korrelációs együtthatót jelöli.

Az ACE2 aktivitás és az NT-proBNP összefüggése

Ezek után megvizsgáltuk a jelenlegi és a potenciális biomarkerünk összefüggését a vizsgálati csoportjainkban. Az individuális betegek szintjén vizsgálva az ACE2 aktivitást és az NT-proBNP értékek összefüggését, kizárólag a HFrEF csoportban találtunk erős, pozitív korrelációt (HFrEF: $p < 0,001$, $r^2 = 0,23$, 10. C ábra). Ezek az eredmények szintén alátámasztották azon hipotézisünket, hogy az ACE2 szisztolés diszfunkció biomarkerként alkalmazható.



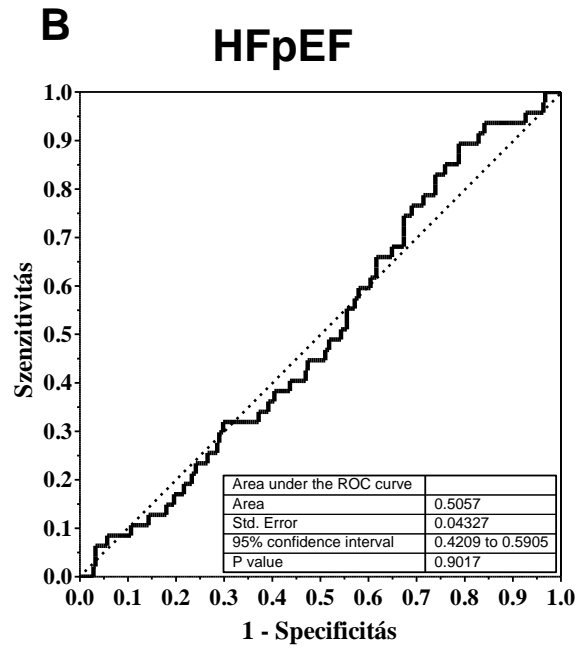
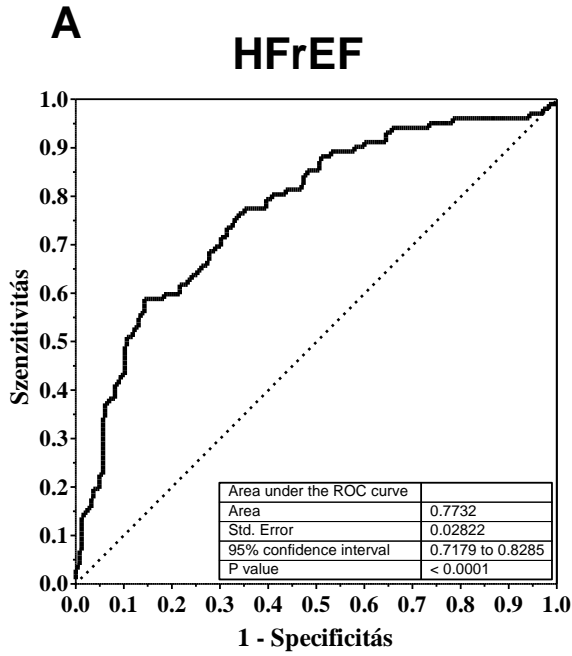
10. ábra – A szérumban ACE2 aktivitás és az NT-proBNP pozitív korrelációja szisztolés szívelégtelenségben

Az ábrán a szérumban ACE2 aktivitás összefüggését ábrázoltuk a B-típusú natriuretikus propeptid koncentrációval (Egészséges, n=45, B ábra), megőrzött bal kamra funkciójú betegekben (Hipertóniás, n=239, C ábra; HFpEF, n=47, E ábra) valamint csökkent bal kamra funkciójú betegekben (HFrEF, n=141, C ábra). Minden pont egy-egy individuális beteget jelöl. A pontokra egyenest illesztettünk, ahol $p < 0,05$, és $r^2 > 0,1$ korreláció állt fenn. A p a szignifikancia, az r^2 pedig a korrelációs együtthatót jelöli.

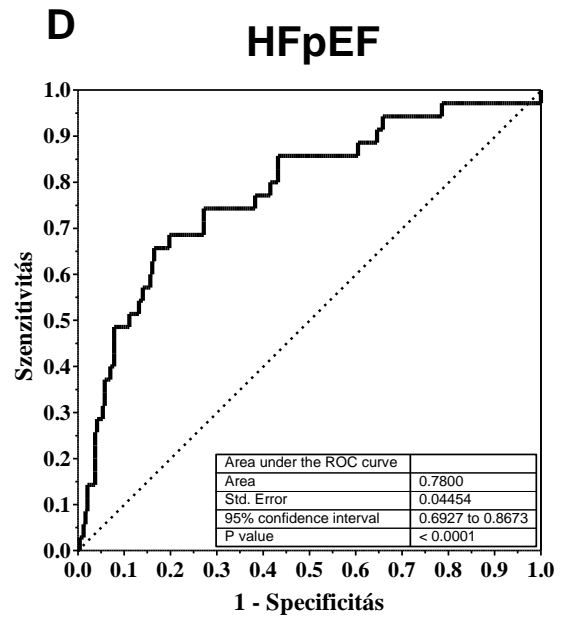
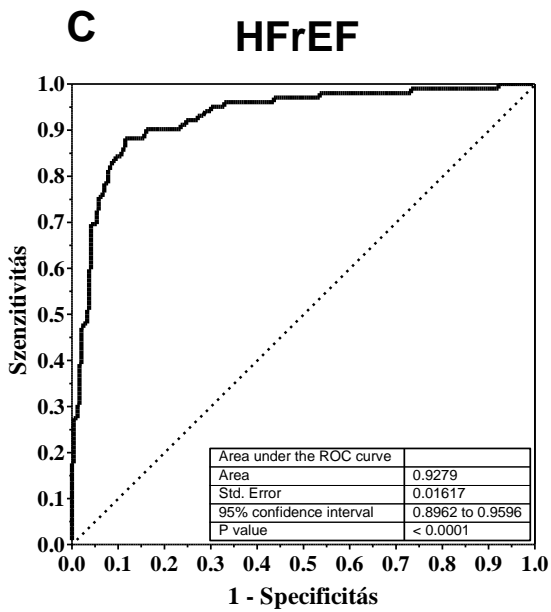
A szérumban ACE2 bal kamrai szisztolés diszfunkció biomarkerként történő klinikai alkalmazhatósága

Megvizsgáltuk a szérumban ACE2 klinikai alkalmazhatóságát a szisztolés bal kamra diszfunkció biomarkerként, összehasonlítva az NT-proBNP ilyen irányú alkalmazhatóságával. Mivel a HFpEF betegek valamennyien hipertóniások és a hipertónia önmagában is az ACE2 aktivitás enyhe emelkedését okozza, ezért a HFrEF betegek közül is csak a hipertóniások kerültek bele ebbe az értékelésbe (HFrEF+Hipertónia). Hogy megvizsgáljuk az ACE2 aktivitás mérés alkalmazhatóságát arra, hogy elkülönítse a hipertóniás betegeket a szívelégtelenségben szenvedőktől ROC görbe analízist végeztünk. A görbe alatti terület 0,77-nek adódott a HFrEF csoport esetében (11. A ábra), míg 0,51-nek a HFpEF csoportban (11. B ábra). Ugyanakkor az NT-proBNP-re vonatkozó görbe alatti terület 0,93 volt a HFrEF csoportban (11. C ábra), 0,78 a HFpEF csoportban (11. D ábra). ROC görbe analízis adatait elemezve kiderült, hogy az NT-proBNP inkább általános szívelégtelenség biomarkernek tekinthető. A szérumban ACE2 aktivitás viszont alkalmas biomarker lehet a két szívelégtelenség típus differenciál diagnosztikájában, mert megemelkedett NT-proBNP szintek mellett, a szisztolés szívelégtelenségben az ACE2 aktivitás magas, diasztolés szívelégtelenség során viszont nem emelkedik tovább a hipertóniás szintnél. Látható a ROC ábrán is hogy szisztolés szívelégtelenség során az ACE2 diagnosztikai hatékonysága jóval magasabb (11. A ábra). HFpEF során a ROC görbe pontjai a diagonális egyenes körül helyezkednek el (11. B ábra).

ACE2 aktivitás (U/ml)



NT-proBNP koncentráció (pmol/l)

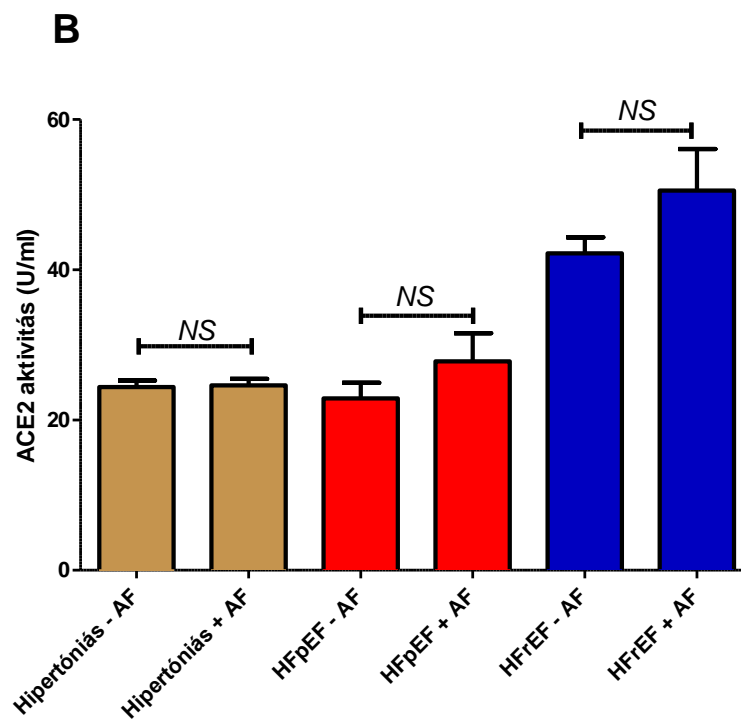
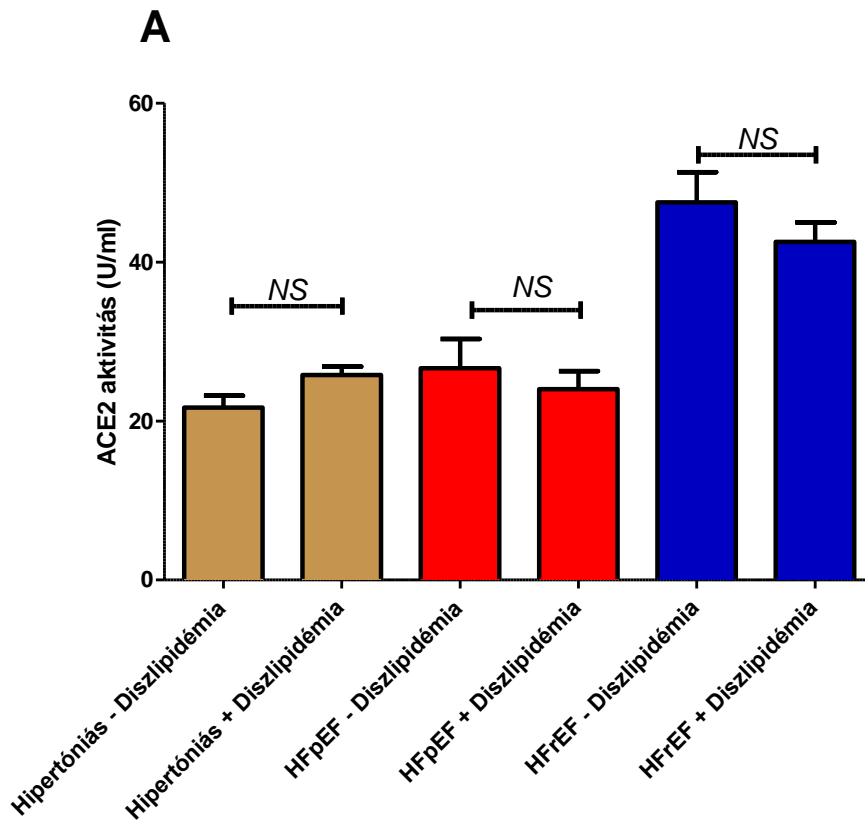


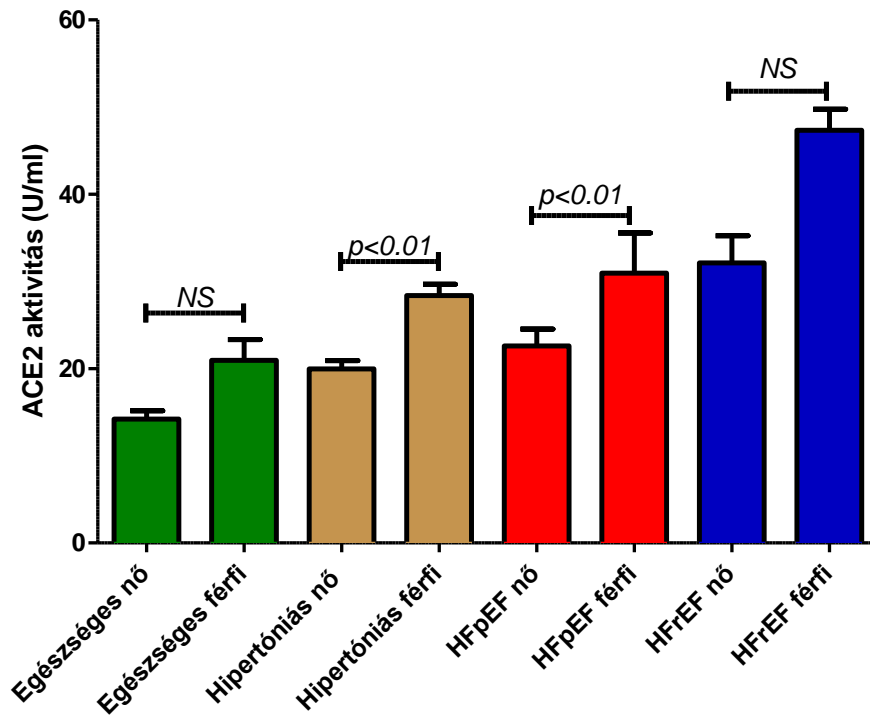
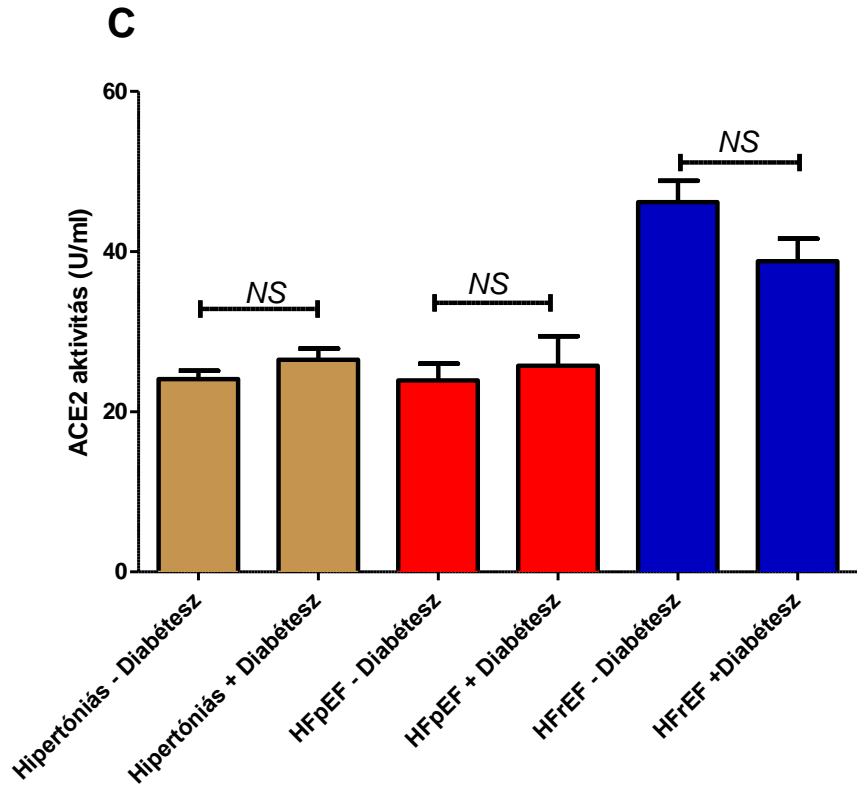
11. ábra – A szérumban ACE2 aktivitás és az NT-proBNP koncentráció prognosztikus értékének összehasonlítása

Az ábra az ACE2 aktivitás (A, B ábra) és az NT-proBNP (C, D ábra) diagnosztikai értékét mutatja ROC analízis formájában, abból a szempontból, hogy mennyire alkalmazhatóak a szívelégtelenséggel társult és a szívelégtelenség nélküli hipertónia között. A HFrEF-ben és egyben hipertóniában is szenvedő betegek (HFrEF+Hipertónia, n=102) valamint a hipertóniás csoport (Hipertóniás, n=239) összehasonlításait az A és a C ábra mutatja. A HFpEF-ben és egyben hipertóniában is szenvedő betegek (HFpEF+ Hipertónia, n=47) valamint a hipertóniás csoport (Hipertóniás, n=239) összehasonlítását a B és D ábra mutatja.

A komorbiditások hatásai a szérumban ACE2 aktivitásra

A különböző kardiovaszkuláris betegpopulációkban megvizsgáltuk bizonyos komorbiditások (diszlipidémia, 12. A ábra, pitvarfibrilláció, 12. B ábra, diabétesz, 12. C ábra) és a nem (12. D ábra) szérumban ACE2 aktivitásra tett hatásait. A hipertóniás és a HFpEF csoportban a férfiaknál szignifikánsan magasabb szérumban ACE2 aktivitást találtunk (Hipertóniás nő: $19,9 \pm 0,9$ U/ml vs. Hipertóniás férfi: $28,4 \pm 1,3$ U/ml, $p < 0,01$, 12. D ábra; HFpEF nő: $32,2 \pm 3,1$ U/ml vs. HFpEF férfi: $47,3 \pm 2,4$ U/ml, $p < 0,01$, 12. D ábra). A HFrEF csoportban is látható egy ilyen tendencia, bár a különbség itt nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak (HFrEF: $p = 0,12$, 12. D ábra). A vizsgált kardiovaszkuláris komorbiditásoknak nem volt befolyása a szérumban ACE2 aktivitás alakulására, egyik vizsgálati populációban sem.



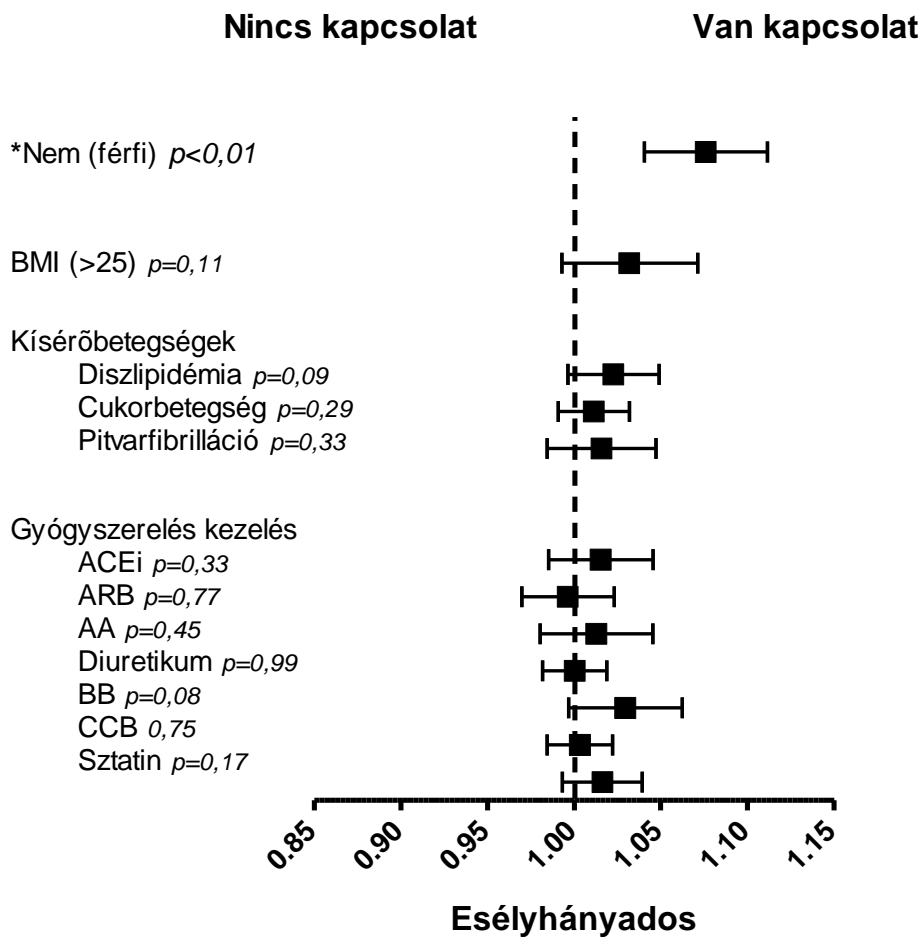


12. ábra – A kardiovaszkuláris komorbiditások és a nem hatása a szérumban ACE2 aktivitására

Az ábra a kardiovaszkuláris komorbiditások és a nem befolyását mutatja a szérumban ACE2 aktivitására, egészséges egyéneknél (Egészséges, n=45), hipertóniás betegekben (Hipertóniás, n=239), szisztolés szívelégtelen betegekben (HFrEF, n=141) valamint diasztolés szívelégtelen betegekben (HFpEF, n=47). A csoportok komorbiditások valamint komorbiditások nélküli együttes összehasonlítását nemparametrikus Kruskal-Wallis teszttel végeztük. Az oszlopok az átlag értéket és a szórást mutatják. A statisztikailag szignifikáns különbségeket a p érték mutatja. A szignifikancia hiányát *NS*-el jelöltük.

A nem, kardiovaszkuláris kísérőbetegségek és a gyógyszeres terápia hatása a szérumban ACE2 aktivitásra

A fentebbi megfigyelést részletesebben elemeztük a hipertóniás betegek között. A logisztikus regressziós analízis kizárólag a nemről tudta igazolni, hogy az érdemileg befolyással bír a szérumban ACE2 aktivitásra ($p < 0,01$), ugyanakkor a túlsúly (testtömegindex (BMI) > 25: $p = 0,11$), a diszlipidémia ($p = 0,09$), a cukorbetegség ($p = 0,29$), a pitvarfibrilláció ($p = 0,33$), illetve a különböző kardiovaszkuláris gyógyszerek alkalmazása (ACE-gátlók (ACEi): $p = 0,33$; angiotenzin receptor gátlók (ARB): $p = 0,77$; aldosteron antagonisták (AA): $p = 0,45$; diuretikumok: $p = 0,99$; béta blokkolók (BB): $p = 0,08$; kalcium-csatorna blokkolók (CCB): $p = 0,75$; sztatinok: $p = 0,17$) nem volt jelentős hatással a szérumban ACE2 aktivitás alakulására.

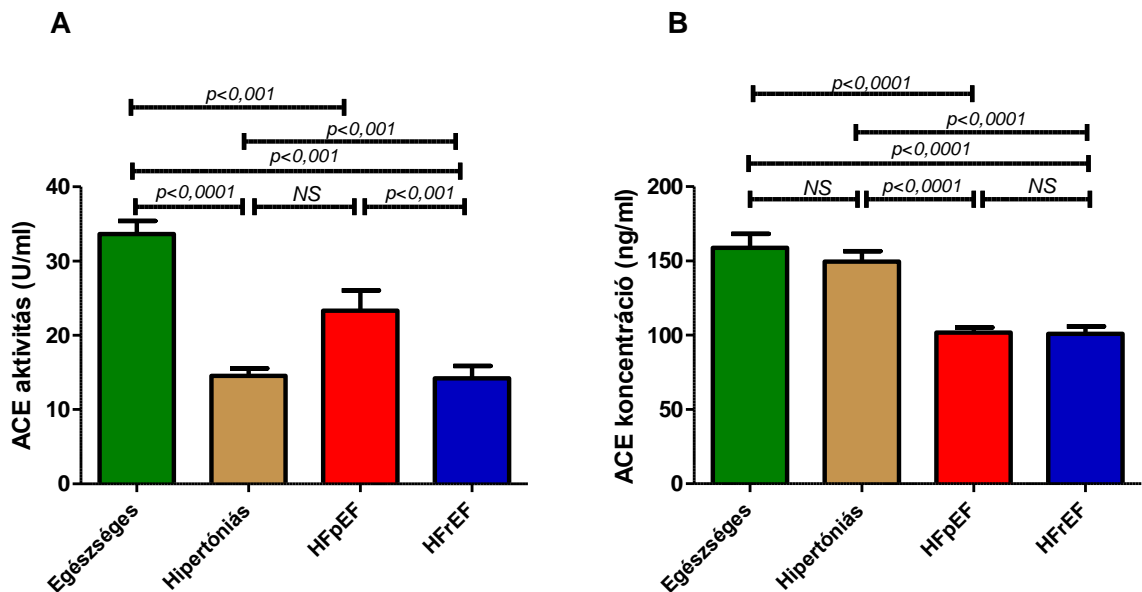


13. ábra – A hipertóniás csoport ACE2 aktivitásának logisztikus regressziós analízise különböző változókra: nem, túlsúly, kardiovaszkuláris megbetegedések és kardiovaszkuláris gyógyszeres terápia

A hipertóniás csoportban egyedül a nem befolyásolta az ACE2 aktivitás értékét ($p < 0,01$). A többi vizsgált klinikai paraméternek (BMI>25, cukorbetegség, diszlipidémia vagy pitvarfibrilláció) jelenléte vagy az alkalmazott gyógyszeres terápiának (angiotenzin-konvertáz enzim gátlók (ACEi), angiotenzin receptor gátlók (ARB), aldosteron antagonisták (AA), béta blokkolók (BB), kalcium-csatorna blokkolók (CCB)) nem volt befolyása az ACE2 aktivitás alakulására.

A szérumban ACE aktivitásának és az ACE koncentrációjának összefüggése a bal kamrai szisztolés funkcióval

A szérumban ACE aktivitása az egészséges csoportban volt a legmagasabb (Egészséges: $33,6 \pm 1,7$ U/ml), a hipertóniás (Hipertóniás: $14,5 \pm 0,9$ U/ml) valamint a HFpEF (HFpEF: $14,22 \pm 1,6$ U/ml) csoportokban szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk. Az eredmény egybeesik azzal, hogy ezekben a csoportokban a betegek jelentős része hatékony ACE gátló terápiában részesült (14. A ábra). Mivel a HFpEF csoportban lévő betegeknek csak az 58%-a szedett valamilyen ACE gátló szert, ezért ezen csoport ACE aktivitásának értéke az egészséges és a sikeresen gátolt hipertóniás és a HFpEF csoportok ACE aktivitás értékei között helyezkedik el (HFpEF: $23,3 \pm 2,8$ U/ml, 14. A ábra). A szívelégtelenségben szenvedő betegek (HFpEF: $100,9 \pm 5,1$ ng/ml; HFrEF: $101,7 \pm 3,5$ ng/ml, 14. B ábra) - függetlenül annak típusától – alacsonyabb ACE koncentráció értékekkel rendelkeztek, mint a két, szívelégtelenség jeleit nem mutató csoport (Egészséges: $159,0 \pm 9,3$ ng/ml; Hipertóniás: $149,6 \pm 6,9$ ng/ml, 14. B ábra).



14. ábra – A szérumban ACE aktivitása és ACE koncentrációja egészséges egyénekben és a különböző betegcsoportokban

Az ábra a szérumban ACE aktivitását (A ábra) és ACE mennyiségét (B ábra) mutatja egészséges egyénekben (Egészséges, n=45), hipertóniás betegekben (Hipertóniás, n=40), diasztolés szívelégtelenségben (HFpEF, n=47) illetve szisztolés szívelégtelenségben szenvedő betegekben (HFrEF, n=141). Az együttes összehasonlítás nemparametrikus Kruskal-Wallis teszttel történt (A, B ábra). Az oszlopok az átlag értéket és a szórást mutatják. A statisztikailag szignifikáns különbségeket a *p* érték mutatja. A szignifikancia hiányát *NS*-el jelöltük.

MEGBESZÉLÉS

A kardiovaszkuláris megbetegedések az élen állnak a halálozási okok között a fejlett országokban [51]. A szív és érrendszer megbetegedések megjelenése egy egymásba fűződő eseménysorozat, amit számos tényező aktivál, mint például a magas vérnyomás, magas koleszterin szint és a cukorbetegség [3]. A folyamat beavatkozás nélkül feltartóztathatatlanul halad előre és a magas vérnyomás, kardiomiopátiához, koszorúér-betegséghez, stroke-hoz, periférás artériás betegséghez, neuropátiához és számos más patológiás elváltozáshoz vezethet, amik végül növelik a halálozási arányt. Érdekes módon a legtöbb beteg esetében (több mint 95%-ban) a magas vérnyomásnak nincs azonosítható oka (esszenciális magas vérnyomás). Hatásos terápiák léteznek a magas vérnyomásértékek csökkentésére és célértéken tartására, viszont nincs rá végleges gyógymód. Ami annak tudható be, hogy legtöbbször a betegséget kiváltó ok ismeretlen. A betegek vérnyomása a gyógyszeres kezelés hatására optimális szinten tartható, viszont a magas vérnyomás hátterében álló patológiás ok kezeletlen marad.

Munkacsoportunk írta le először, hogy:

- a szérum ACE2 aktivitása emelkedett magas vérnyomás esetén (szívelégtelenség jelei vagy tünetei nélkül) az egészséges egyénekhez képest
- a vizsgált magas vérnyomásos csoportban a betegek ejekciós frakciója már kismértékben csökkent az egészséges egyénekhez képest, ugyanezen csoport NT-proBNP szintje is enyhe emelkedést mutat.

Habár ez az első alkalom, hogy emelkedett ACE2 aktivitást sikerült kimutatni humán magas vérnyomás esetén, az ACE2 és a vérnyomás szabályozás kapcsolatának megléte nem új keletű megfigyelés. Korábbi állatkísérletes eredményekből tudjuk, hogy az ACE2 overexpressziója SHRSP patkányokban csökkentette a magas vérnyomást [52]. Az ACE2 idegrendszerben történő túltermeltetése szintén vérnyomás csökkentő szereppel bír [53], mintegy védő szerepet biztosítva magas vérnyomás esetén. Az ACE2 genetikai inaktivációja negatívan befolyásolta a RAAS vérnyomás szabályozó szerepét [54, 55].

Genetikai tanulmányok szerint szoros összefüggés van az ACE2 polimorfizmus és a magas vérnyomás között a különböző humán populációkban, de semmilyen adattal nem szolgáltak, hogy ezen polimorfizmus milyen hatással van a keringő ACE2 aktivitásra [56-58].

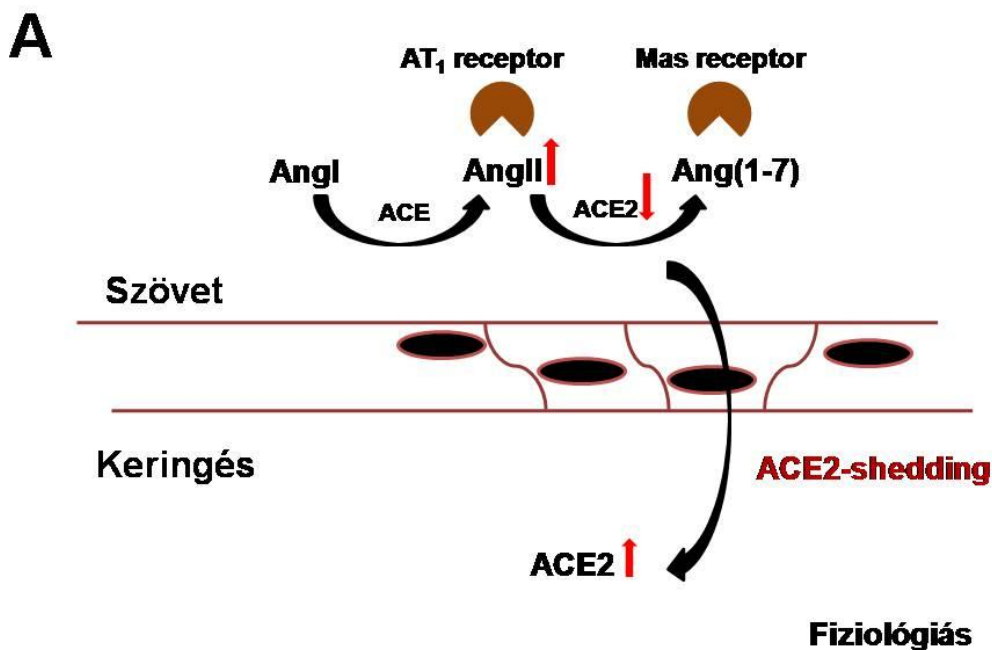
Feltevődik a kérdés, hogy a keringésben mérhetően megemelkedett ACE2 aktivitás a hipertóniás betegekben egy kompenzatórikus mechanizmus része-e, vagy éppen azért alakul már ki a hipertónia is, mert a keringésben meglévő ACE2 aktivitás emelkedésnek hátterében, a szöveti szinten ACE2 „hiány” állhat fenn.

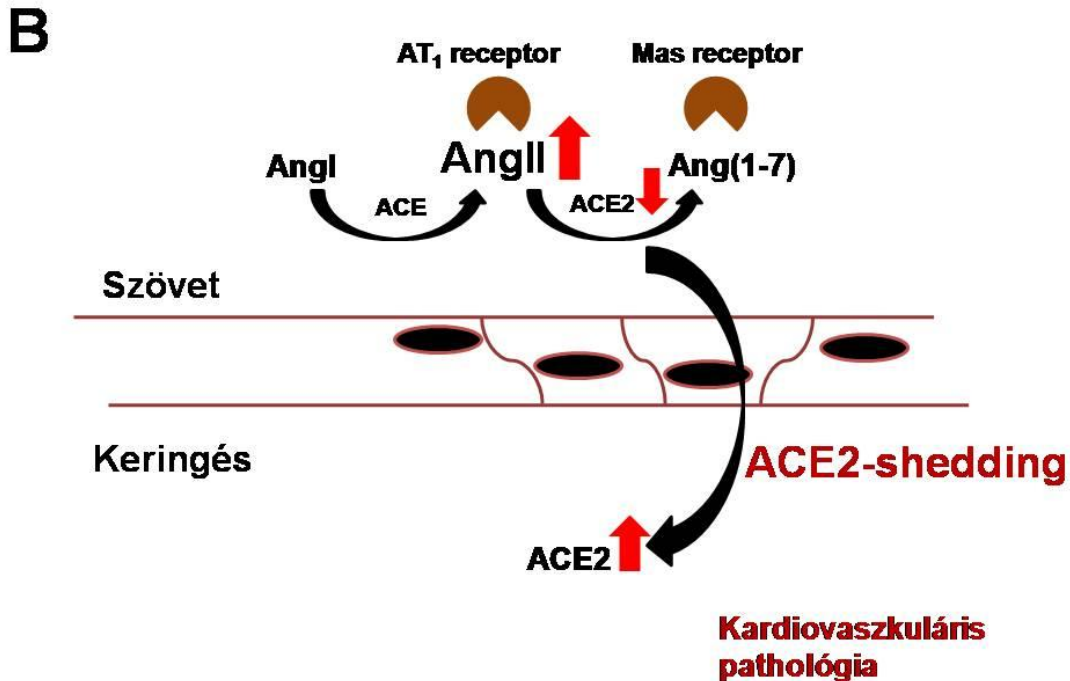
Szívelégtelenségben szenvedő betegek mintáit vizsgálva sikerült egyértelműen igazolnunk, hogy a szisztolés diszfunkció további jelentős szérum ACE2 aktivitás emelkedést eredményez. Míg az izolált diasztolés diszfunkció nem okoz ACE2 aktivitás emelkedést a HFpEF betegekben a hipertóniás csoporthoz képest. A CRT hatására javuló szisztolés bal kamra funkció csökkenő szérum ACE2 aktivitást eredményezett. Ez a megfigyelésünk alátámasztja azt a feltételezésünket, hogy a szisztolés szívelégtelenség patomechanizmusában fontos lépés lehet a keringő ACE2 aktivitás emelkedése. Ezzel párhuzamosan szöveti szinten csökken az ACE2 aktivitás és az ezt feltehetően előidéző ún. ACE2 shedding. Ezen eredményeinkhez kapcsolódó hipotézisünket, a humán szívelégtelenség során lezajló szöveti valamint keringő ACE és ACE2 újraeloszlásáról a 15. ábrán szemléltetjük.

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszeren belül megtalálható pozitív feedback reakciót már egerekben megfigyelték, ahol az 1-es típusú angiotenzin receptor (AT1R) aktivációja növelte az ADAM17 enzim expresszióját, ami a szöveti ACE2 hasításáért felelős [59, 60]. A hasításért felelős ADAM17 különböző ágensekkel gátolható, mint például, forbol-észterrel, kalcium-ionofiorral, növekedési faktorokkal vagy kalmodulinnal [43, 61]. A hasítás eredménye a keringésben is detektálható ACE2 aktivitás emelkedés lesz [62]. Egészséges egyénekből származó plazma minták Western blot-os analízise kimutatta, hogy a plazmából származó ACE2 fehérje sokkal kisebb méretű, mint a teljes hosszúságú, membrán kötött ACE2 fehérje mérete. Ezzel is alátámasztva a tényt, hogy a keringésben megjelenő ACE2 fehérje proteolitikus hasítás eredménye [62]. Az ADAM17 közvetítette humán ACE2 ektodomén hasítása a juxtamembrán régió területén történik [63]. Iwata és

munkatársai írták le, hogy az ACE2 fehérjének két jól elkülöníthető formája van jelen a keringésben (80 kDa és 70 kDa méretű), amelyek aktivitása megegyező volt ACE2 fehérjét túltermelő sejtvonalban [64]. Vizsgálataikból kiderült, hogy az ADAM17 enzim a nagyobb, 80 kDa-os forma hasításáért volt felelős, viszont a kisebb szolubilis fragment folyamatos hasításáért nem. Így feltételezhetően más hasító enzimek is szerepet játszanak az ACE2 fehérje szolubilis formájának a megjelenésében [64].

Korábbi tanulmányokból tudjuk, hogy az ACE2 jelen van éppúgy a humán egészséges vaszkulaturában, mint a beteg artériákban. Szintén kimutatták, hogy a humán érrelmeszesedéses nyaki erek léziója során megnőtt az ACE2 mRNS expressziója. A stabil és kiszakadt érrelmeszesedéses plakkokat összehasonlítva, a kiszakadt plakkokban emelkedett szöveti ACE2 aktivitást mértek [65].





15. ábra – A RAAS szabályozás hipotetikus modellje szívelégtelenségben

Az AngI-et az ACE enzim alakítja AngII-vé. Az AngII hasítását az ACE2 enzim végzi el, aminek az aktív terméke az Ang(1-7) lesz, mely a Mas receptoron keresztül fejti ki hatásait. Az ACE és ACE2 enzimek szövetben lokalizált és szolubilisan keringő aránya határozza meg az angiotenzin peptidek lokális szintjét. Feltételezzük, hogy jelentős mértékű szöveti valamint keringő ACE és ACE2 újraeloszlás zajlik le humán szívelégtelenség során. Ami reverzibilis lehet ha a szív pumpafunkciójában javulás következik be. Egészséges körülmények között a szérumban ACE2 eliminálja a rendszerből az AngII-t, létrehozva az Ang(1-7)-et. A folyamat Mas receptor stimulációt eredményez, mely igen kedvező hatásokkal bír kardiovaszkuláris megbetegedés során. Feltehetően az ACE2 újra eloszlása (ACE2-shedding) már kezdődő szívelégtelenség (pl. hipertónia) során is beindul (A ábra). Ennek eredményeként az ACE2 aktivitás megemelkedik a keringésben, viszont a szövetekben csökken a szintje, így a lokális AngII szint emelkedni fog, ami egy fokozott AT1 receptor stimulációt és egy csökkenő Mas receptor aktivitást von magával (B ábra). (ACE: angiotenzin-konvertáló enzim, ACE2: angiotenzin-konvertáló enzim 2, AngII: angiotenzin II, AngI: angiotenzin I, Ang(1-7): angiotenzin 1-7).

Eddig nem ismert olyan tanulmány az szakirodalomban, ahol humán vizsgálatokban párhuzamosan mérték volna a szöveti és a keringő ACE2 aktivitását. Így tehát nem bizonyított, hogy az megemelkedett keringő ACE2 aktivitás a fokozott szöveti ACE2 mRNS szintézis vagy a megnövekedett szöveti ACE2 hasítás következménye.

Figyelembe véve, hogy az ACE2 aktivitás emelkedése eltérően viselkedik a HFrEF és a HFpEF csoportban, a tény fontos lehet a kétféle szívelégtelenség patomechanizmusának szétválasztásában. Ez a tulajdonság pedig a jövőben alkalmassá teszi a szérum ACE2 aktivitás mérést arra, hogy a szisztolés bal kamra diszfunkció biomarkere legyen. A Biomarker Társaság ajánlása szerint, nemcsak a betegség progressziójával korrelál, csökkenő értéke korrelál a diszfunkció javulásával is, egyúttal azonban magában a patomechanizmusban is részt vesz [66]. A növekedett plazma BNP és NT-proBNP szintek a morbiditás és mortalitás független prediktorai szívelégtelenség esetén. A különböző biomarkerek használata támogatja a kardiológusokat a diagnózis felállításakor. Az egyik ilyen gold standard biomarker szívelégtelenségesetében a B-típusú nátriuretikus peptid (BNP) vagy a prekuzora, a B-típusú nátriuretikus propeptid N terminális fragmentje (NT-proBNP). Melyek tipikusan megemelkednek a klasszikus szisztolés szívelégtelenség során. Korábbi irodalmi adatokból tudjuk, hogy mind a BNP, mind az NT-proBNP értékek megemelkedtek HFrEF és HFpEF esetén is a kontroll csoporthoz képest [67-69]. Viszont HFpEF-ben a betegek nagy részének szignifikánsan alacsonyabb NT-proBNP szintje van, mint a HFrEF betegeknek [30, 31]. Ez magyarázható azon adattal is, hogy a végdiasztolés falfeszülés, ami a BNP termelés és felszabadulás fő kiváltó tényezője, a diasztolés szívelégtelen betegekben sokkal alacsonyabb [30]. A HFpEF betegekben az emelkedő NT-proBNP szint összefüggést mutatott a diasztolés diszfunkció súlyosságával [70]. A jelenleg érvényben lévő klinikai tanulmányok alapján, a szívelégtelenség diagnózisának felállításakor a nátriuretikus peptidek cut off értéke nem különbözik a szisztolés és a diasztolés szívelégtelenség során [71]. Néhány érdekes különbség található a nátriuretikus peptidek viselkedésében a két szívelégtelenség csoport között. Először is az emelkedett NT-proBNP szint kevésbé kifejezett a HFpEF csoportban [30, 67, 68]. Ugyanazon NYHA stádiumban szenvedő HFpEF betegeknek alacsonyabb az NT-proBNP szintje, mint az azonos NYHA státuszú HFrEF betegeknek [72]. A nátriuretikus peptidek talán kevésbé hasznos prognosztikai és diagnosztikai eszközök

HFpEF betegség során, mint a HFrEF esetében. Megfigyelésünk alátámasztja az előbb említett irodalmi adatokat. Az NT-proBNP szintje a hipertóniás betegekben hatszoros emelkedést mutat az egészséges egyénekéhez képest és még tovább emelkedett a HFpEF (további 3-szoros emelkedés) valamint a HFrEF betegekben (további 12-szeres emelkedés). Ebből arra következtetünk, hogy a natriuretikus propeptid felszabadulás mindkét szívelégtelenség formában aktiválódik. Munkánk során megvizsgáltuk az NT-proBNP diagnosztikus értékét, hogy mennyire alkalmas elkülöníteni a hipertóniás betegeket a szívelégtelenségben szenvedőktől. A ROC görbe analízis adatait elemezve kiderült, hogy az NT-proBNP inkább a szívelégtelenség általános biomarkerének tekinthető, tekintet nélkül a szívelégtelenség fajtájára.

A kétféle szívelégtelenségben feltételezett patomechanizmusbeli különbség magyarázatot adhat arra, hogy a HFpEF betegekben a RAAS-gátlás nem eredményezett a tenziócsökkentésen túlmenően hasznot a morbiditásban és a mortalitásban. A jelenlegi klinikai tanulmányok szerint a RAAS gátlás az egyik elsődleges terápiás lehetőség magas vérnyomás esetén [73-76], valamint a szisztolés szívelégtelenség kezelésére [77-80], viszont diasztolés szívelégtelenség során a RAAS gátlás a hipertónia kezelésén kívül nem hozott további pozitív eredményeket [26-29, 81]. Mindkét szívelégtelenség típust egyszerre figyelembe véve, a RAAS inhibitorok első metaanalíziséből kiderült, hogy az összhalálást 11%-kal, a szív és érrendszeri halálást 14%-kal és a szívelégtelenség miatti kórházi kezelést 20%-kal csökkentik [82]. Amikor az ejekciós frakció alapján csoportosították ezeket a klinikai vizsgálatokat, azt figyelték meg, hogy az ejekciós frakció növekedésével szignifikánsan csökken a terápiás hatékonysága a RAAS gátló szereknek. Az alcsoport analízisek során szignifikáns különbségeket találtak. A RAAS inhibitorok előnyös hatásai legnagyobb mértékben, abban az esetben mutatkoztak, ahol az EF a legalacsonyabb volt. Ebben a csoportban a RAAS inhibitorok az összhalálás rizikóját 26%-kal csökkentették a szív és érrendszeri megbetegedést 22%-kal és a kórházi ellátás is 30%-kal javult. Ahol viszont az átlagos ejekciós frakció meghaladta az 50%-ot, ott ezen 3 klinikai eredmény egyikében sem történt szignifikáns javulás RAAS gátló szerek hatására. Habár már rengeteg kezelést teszteltek diasztolés szívelégtelenség esetén, az európai irányelv az elsődlegesen követendő [71]. Egyik kezelés sem mutatott meggyőző eredményt a tekintetben, hogy csökkentették volna a morbiditást és mortalitást diasztolés

szívelégtelenség során. Ajánlott a diuretikum használata, ami kontrollálja a só és a víz visszatartást, enyhíti a légszomjat és az ödémát. Szintén ajánlottak a béta blokkolók, ACE inhibitorok vagy ARB-k a magas vérnyomás kezelésére. A jövőben a diasztolés szívelégtelenség kezelésének részei kell hogy legyenek mind az artériás magas vérnyomás, mind az endotél diszfunkció javítására irányuló gyógymódok [83]. Az angiotenzin-konvertáló enzim inhibitorok valamint az angiotenzin II receptor blokkolók használata kiábrándító eredményt hozott eddig, a diasztolés szívelégtelenség kezelése során. Nincs randomizált, kontrollált vizsgálati bizonyíték arra, hogy bármilyen klinikai előnnyel járna ezen ACE inhibitorok, ARB-k, endothelin antagonisták vagy metalloproteáz inhibitorok [26, 29, 71, 81] alkalmazása. Minden nagy tanulmány semleges kimenetelt mutatott [84]. Vannak azonban ígéretesnek tűnő klinikai tanulmányok, ahol már sikerült alátámasztani, hogy a statin kezelés megelőzi a hipertrófia kialakulását és csökkenti a fibrózis mértékét [85, 86]. Ezek az adatok korrelálnak azzal a tanulmánnyal, ahol kimutatták, hogy a 21 hónapos statin kezelés csökkentette az összmortalitást diasztolés szívelégtelenségben [87].

Összefoglalásként elmondható, hogy a szérumban ACE2 aktivitása kardiovaszkuláris megbetegedés progressziójával párhuzamosan emelkedik, valamint a biventrikuláris pacemaker terápia hatására, javuló szív pumpa funkció (EF) esetén, a szérumban ACE2 aktivitása csökken. Ezért ideális biomarkere lehet a szisztolés funkciónak, mivel nem csak a betegség progressziójával, hanem annak regressziójával is párhuzamosan változik. Adataink alapján feltételezzük, hogy a szérumban ACE2 részt vesz a betegség patomechanizmusában, párhuzamosan változik a betegség súlyosságával, valamint a betegség regressziójával is.

Az ACE2 már magas vérnyomás esetén is szignifikánsan megemelkedik, valamint szintje még tovább nő, amikor a szisztolés diszfunkció lép fel. A diasztolés szívelégtelenség irányába történő progresszió a hipertóniás betegekben nem növeli tovább a szérumban ACE2 aktivitást. A szérumban ACE2 aktivitásnak a patomechanizmusban betöltött eltérő szerepe az NT-proBNP-vel együtt mérve, alkalmassá teszi őt a diagnózis felállítására. A NT-proBNP egy általános szívelégtelenség biomarkernek tekinthető, ami megmutatja a szívelégtelenség jelenlétét, viszont ACE2 méréssel kiegészítve biztosabb képet kaphatunk arról, hogy a szívelégtelenség melyik formájával állunk szemben.

A Ph.D. értekezésemben, illetve annak alapjául szolgáló közleményekben megerősítettük, hogy

- a kardiovaszkuláris megbetegedés progressziója során, a szisztolés valamint a diasztolés szívelégtelenség patomechanizmusának szétválasztásában a szérum ACE2 aktivitás emelkedésének eltérő viselkedése jelzésértékű lehet,
- szisztolés valamint diasztolés szívelégtelenségben, a RAAS gátlás során tapasztalt különböző terápiás válaszok az ACE2 eltérő regulációjával lehetnek összefüggésben,
- a szérum ACE2 ideális biomarkere lehet a szisztolés funkciónak
- a szérum ACE2 aktivitás egy potenciális biomarker lehet, a szisztolés valamint a diasztolés szívelégtelenség elkülönítésére.

ÖSSZEFOGLALÁS

Irodalmi adatokból tudjuk, hogy az *in vivo* ACE aktivitás egy endogén inhibitor gátlása alatt áll, ami még inkább az angiotenzin-konvertáló enzim 2 (ACE2) általi Angiotenzin II eliminációra irányította a figyelmet. A szakirodalomban egyre több bizonyítékot találni arra, hogy az ACE2 biomarkerként szolgál szisztolés szívelégtelenség során (HFrEF). Kevés információnk van arról, hogyan változik az ACE2 szérumszintje kezdődő szívelégtelenség során (pl. hipertóniás betegek), reverz remodelling fenállásakor valamint diasztolés szívelégtelen betegekben (HFpEF). Vizsgálatunkban célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az ACE2 fehérjének a kardiovaszkuláris megbetegedés progressziójában betöltött szerepét.

A Debreceni Egyetem Kardiológiai Intézetében egy prospektív tanulmány keretén belül különböző betegeket vontunk be, klinikai, echokardiográfiás (ejekciós frakció (EF), végszisztolés (ESD) és végdiasztolés átmérő (EDD), dP/dt) és biokémiai vizsgálatok (ACE és ACE2 aktivitás, ACE koncentráció) elvégzésére, hogy felderítsük az ACE2 kardiovaszkuláris patológiában betöltött szerepét. Szisztolés szívelégtelen betegeket (HFrEF, NYHAI-IV, biventrikuláris pacemaker beültetésre kiválasztva (CRT), n=141) hasonlítottunk össze hipertóniás betegekkel (n=239), egészséges egyénnel (n=45) és diasztolés szívelégtelen betegekkel (HFpEF, EF>50%, n=47). A HFrEF betegek klinikai státuszát ellenőriztük CRT beültetés előtt (n=141) valamint 6-9 hónappal a beültetés után is (n=65).

Az ACE2 aktivitás szignifikánsan megemelkedett a hipertóniás csoportban, ahol a szívelégtelenség jelei és tünetei már enyhén mutatkoztak (kismértékben csökkent EF és emelkedett NT-proBNP szint) ($24,8 \pm 0,8$ U/ml) az egészséges egyénekhez képest ($16,2 \pm 0,8$ U/ml, $p < 0,01$). Az ACE2 aktivitás még tovább emelkedett a HFrEF betegekben ($43,9 \pm 2,1$ U/ml, $p < 0,001$), míg a CRT kezelés hatására megfigyelhető reverz remodelling során szintje csökkent ($38,3 \pm 3,1$ U/ml, $p < 0,001$). A szérumszintű ACE2 aktivitása a diasztolés szívelégtelen betegekben ($24,6 \pm 1,9$ U/ml) nem változott a hipertóniás betegekkel összehasonlítva. A HFrEF betegek ACE2 értéke negatívan korrelált az EF-val. Nem mutatható ki összefüggés ezen paraméterek között a hipertóniás, a HFpEF és az egészséges csoportban. A HFrEF betegekben az ACE2 pozitív korrelációt mutat a biomarkerként már jól ismert NT-proBNP-vel, ezzel szemben, megtartott szisztolés funkció mellett (egészséges, hipertóniás, HFpEF) a két paraméter normál tartományon belüli variabilitása nem függ egymástól.

A szérumszintű ACE2 aktivitásának változása összefüggésben van a kardiovaszkuláris megbetegedés progressziójával: már magas vérnyomás esetén is szignifikánsan megemelkedik, valamint szintje még tovább nő, amikor a szisztolés diszfunkció lép fel. A diasztolés szívelégtelenség irányába történő progresszió a hipertóniás betegekben nem növeli tovább a szérumszintű ACE2 aktivitást. A szérumszintű ACE2 aktivitásnak a patomechanizmusban betöltött eltérő szerepe az NT-proBNP-vel együtt mérve, alkalmas biomarkerré teheti a két különböző szívelégtelenség forma azonosítására.

SUMMARY

It has been shown recently that Angiotensin Converting Enzyme activity is limited by endogenous inhibition *in vivo*, highlighting the importance of Angiotensin II elimination by Angiotensin Converting Enzyme-2 (ACE2). Growing evidence supports ACE2 as a biomarker in definitive heart failure (HFrEF), but there is little information about changes in ACE2 activity in hypertension with imminent heart failure, in reverse remodeling or in HF patients with preserved ejection fraction (HFpEF). Potential contribution of the ACE2 to cardiovascular disease progression was addressed.

Patients were recruited for clinical, echocardiographic (ejection fraction (EF), left ventricular end-diastolic (EDD) and end-systolic diameter (ESD) and dP/dt) and biochemical analyses (ACE and ACE2 activity, ACE concentration) as part of a single centre, prospective study at the Institute of Cardiology University of Debrecen to identify the role of ACE2 in cardiovascular pathologies. Heart failure (HF) patients with reduced ejection fraction (HFrEF, NYHAII-IV, enrolled for cardiac resynchronisation therapy (CRT), n=141) were compared to hypertensive patients (n=239), healthy cohort (n=45) and HF patients with preserved ejection fraction (HFpEF, EF>50%, n=47). The status of the HFrEF patients were checked before (n=141) and after CRT (n=65).

ACE2 activity was significantly higher in hypertensive patients where signs for imminent heart failure (slightly decreased EF and barely increased NT-proBNP levels) were detected (24.8 ± 0.8 U/ml) than in healthy volunteers (16.2 ± 0.8 U/ml, $p < 0.01$). ACE2 activity further increased in HFrEF patients with definitive heart failure (43.9 ± 2.1 U/ml, $p < 0.001$) while ACE2 activity decreased with the improvement of the heart failure after CRT (reverse remodeling, 38.3 ± 3.1 U/ml, $p < 0.001$). Serum ACE2 activity did not change in HFpEF patients (24.6 ± 1.9 U/ml) when compared to hypertensive patients. Serum ACE2 activity negatively correlated with left ventricular systolic function in HFrEF, but not in hypertensive, HFpEF or healthy populations. Serum ACE2 activities positively correlated to NT-proBNP levels in HFrEF patients. There was no correlation between serum ACE2 activity and NT-proBNP in individuals with normal ventricular systolic function (healthy, hypertensive and HFpEF). Serum ACE2 activity had a fair diagnostic value to differentiate HFpEF from HFrEF patients in this study.

Serum ACE2 activity correlates with cardiovascular disease development: it increases when hypertension develops and further increases when the cardiovascular disease further progresses to systolic dysfunction, suggesting that ACE2 metabolism plays a role in these processes. In contrast, serum ACE2 activity does not change when hypertension progresses to HFpEF, suggesting a different pathomechanism for HFpEF and proposing a biomarker based identification of these HF forms.

IRODALOMJEGYZÉK

Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Mosterd, A. and A.W. Hoes, *Clinical epidemiology of heart failure*. Heart, 2007. **93**(9): p. 1137-46.
2. Lloyd-Jones, D.M., M.G. Larson, E.P. Leip, A. Beiser, R.B. D'Agostino, et al., *Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study*. Circulation, 2002. **106**(24): p. 3068-72.
3. Dzau, V. and E. Braunwald, *Resolved and unresolved issues in the prevention and treatment of coronary artery disease: a workshop consensus statement*. Am Heart J, 1991. **121**(4 Pt 1): p. 1244-63.
4. Swedberg, K., J. Cleland, H. Dargie, H. Drexler, F. Follath, et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology*. Eur Heart J, 2005. **26**(11): p. 1115-40.
5. McMurray, J.J., S. Adamopoulos, S.D. Anker, A. Auricchio, M. Bohm, et al., *ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur J Heart Fail, 2012. **14**(8): p. 803-69.
6. Paulus, W.J., C. Tschope, J.E. Sanderson, C. Rusconi, F.A. Flachskampf, et al., *How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology*. Eur Heart J, 2007. **28**(20): p. 2539-50.
7. Vasan, R.S. and D. Levy, *Defining diastolic heart failure: a call for standardized diagnostic criteria*. Circulation, 2000. **101**(17): p. 2118-21.
8. Fischer, M., A. Baessler, H.W. Hense, C. Hengstenberg, M. Muscholl, et al., *Prevalence of left ventricular diastolic dysfunction in the community. Results from a Doppler echocardiographic-based survey of a population sample*. Eur Heart J, 2003. **24**(4): p. 320-8.
9. Ferrari, R., M. Bohm, J.G. Cleland, W.J. Paulus, B. Pieske, et al., *Heart failure with preserved ejection fraction: uncertainties and dilemmas*. Eur J Heart Fail, 2015. **17**(7): p. 665-71.
10. Hancock, H.C., H. Close, J.M. Mason, J.J. Murphy, A. Fuat, et al., *High prevalence of undetected heart failure in long-term care residents: findings from the Heart Failure in Care Homes (HFinCH) study*. Eur J Heart Fail, 2013. **15**(2): p. 158-65.
11. Owan, T.E., D.O. Hodge, R.M. Herges, S.J. Jacobsen, V.L. Roger, et al., *Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction*. N Engl J Med, 2006. **355**(3): p. 251-9.
12. Hogg, K., K. Swedberg and J. McMurray, *Heart failure with preserved left ventricular systolic function; epidemiology, clinical characteristics, and prognosis*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(3): p. 317-27.
13. Takeda, Y., Y. Sakata, T. Mano, T. Ohtani, D. Kamimura, et al., *Competing risks of heart failure with preserved ejection fraction in diabetic patients*. Eur J Heart Fail, 2011. **13**(6): p. 664-9.

14. Stahrenberg, R., F. Edelmann, M. Mende, A. Kockskamper, H.D. Dungen, et al., *Association of glucose metabolism with diastolic function along the diabetic continuum*. Diabetologia, 2010. **53**(7): p. 1331-40.
15. From, A.M., C.G. Scott and H.H. Chen, *The development of heart failure in patients with diabetes mellitus and pre-clinical diastolic dysfunction a population-based study*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(4): p. 300-5.
16. Paulus, W.J. and C. Tschope, *A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(4): p. 263-71.
17. Gonzalez, A., S. Ravassa, J. Beaumont, B. Lopez and J. Diez, *New targets to treat the structural remodeling of the myocardium*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(18): p. 1833-43.
18. Gurusamy, N. and D.K. Das, *Autophagy, redox signaling, and ventricular remodeling*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(8): p. 1975-88.
19. Hare, J.M., *Oxidative stress and apoptosis in heart failure progression*. Circ Res, 2001. **89**(3): p. 198-200.
20. Penn, M.S., *The role of leukocyte-generated oxidants in left ventricular remodeling*. Am J Cardiol, 2008. **101**(10A): p. 30D-33D.
21. Janicki, J.S., G.L. Brower, J.D. Gardner, A.L. Chancey and J.A. Stewart, Jr., *The dynamic interaction between matrix metalloproteinase activity and adverse myocardial remodeling*. Heart Fail Rev, 2004. **9**(1): p. 33-42.
22. van Heerebeek, L., A. Borbely, H.W. Niessen, J.G. Bronzwaer, J. van der Velden, et al., *Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure*. Circulation, 2006. **113**(16): p. 1966-73.
23. Torre-Amione, G., S. Kapadia, C. Benedict, H. Oral, J.B. Young, et al., *Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD)*. J Am Coll Cardiol, 1996. **27**(5): p. 1201-6.
24. Lommi, J., K. Pulkki, P. Koskinen, H. Naveri, H. Leinonen, et al., *Haemodynamic, neuroendocrine and metabolic correlates of circulating cytokine concentrations in congestive heart failure*. Eur Heart J, 1997. **18**(10): p. 1620-5.
25. Ather, S., W. Chan, B. Bozkurt, D. Aguilar, K. Ramasubbu, et al., *Impact of noncardiac comorbidities on morbidity and mortality in a predominantly male population with heart failure and preserved versus reduced ejection fraction*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(11): p. 998-1005.
26. Massie, B.M., P.E. Carson, J.J. McMurray, M. Komajda, R. McKelvie, et al., *Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction*. N Engl J Med, 2008. **359**(23): p. 2456-67.
27. Senni, M., W.J. Paulus, A. Gavazzi, A.G. Fraser, J. Diez, et al., *New strategies for heart failure with preserved ejection fraction: the importance of targeted therapies for heart failure phenotypes*. Eur Heart J, 2014. **35**(40): p. 2797-815.
28. Yamamoto, K., *beta-Blocker therapy in heart failure with preserved ejection fraction: Importance of dose and duration*. J Cardiol, 2015. **66**(3): p. 189-94.
29. Yusuf, S., M.A. Pfeffer, K. Swedberg, C.B. Granger, P. Held, et al., *Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial*. Lancet, 2003. **362**(9386): p. 777-81.
30. Iwanaga, Y., I. Nishi, S. Furuichi, T. Noguchi, K. Sase, et al., *B-type natriuretic peptide strongly reflects diastolic wall stress in patients with chronic heart failure: comparison between systolic and diastolic heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(4): p. 742-8.

31. McKelvie, R.S., M. Komajda, J. McMurray, M. Zile, A. Ptaszynska, et al., *Baseline plasma NT-proBNP and clinical characteristics: results from the irbesartan in heart failure with preserved ejection fraction trial*. J Card Fail, 2010. **16**(2): p. 128-34.
32. Anjan, V.Y., T.M. Loftus, M.A. Burke, N. Akhter, G.C. Fonarow, et al., *Prevalence, clinical phenotype, and outcomes associated with normal B-type natriuretic peptide levels in heart failure with preserved ejection fraction*. Am J Cardiol, 2012. **110**(6): p. 870-6.
33. Der Sarkissian, S., M.J. Huentelman, J. Stewart, M.J. Katovich and M.K. Raizada, *ACE2: A novel therapeutic target for cardiovascular diseases*. Prog Biophys Mol Biol, 2006. **91**(1-2): p. 163-98.
34. Kumar, R., C.M. Thomas, Q.C. Yong, W. Chen and K.M. Baker, *The intracrine renin-angiotensin system*. Clin Sci (Lond), 2012. **123**(5): p. 273-84.
35. Clarke, N.E. and A.J. Turner, *Angiotensin-converting enzyme 2: the first decade*. Int J Hypertens, 2012. **2012**: p. 307315.
36. Burrell, L.M., J. Risvanis, E. Kubota, R.G. Dean, P.S. MacDonald, et al., *Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans*. Eur Heart J, 2005. **26**(4): p. 369-75; discussion 322-4.
37. Greenberg, B., *An ACE in the hole alternative pathways of the renin angiotensin system and their potential role in cardiac remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(9): p. 755-7.
38. Fagyas, M., K. Uri, I.M. Siket, G.A. Fulop, V. Csato, et al., *New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) II: albumin suppresses angiotensin converting enzyme (ACE) activity in human*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e87844.
39. Fagyas, M., K. Uri, I.M. Siket, A. Darago, J. Boczan, et al., *New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) III: endogenous inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) provides protection against cardiovascular diseases*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e93719.
40. Fagyas, M., K. Uri, I.M. Siket, A. Darago, J. Boczan, et al., *New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) I: endogenous angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e87843.
41. Crackower, M.A., R. Sarao, G.Y. Oudit, C. Yagil, I. Kozieradzki, et al., *Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function*. Nature, 2002. **417**(6891): p. 822-8.
42. Iwata, M., R.T. Cowling, S.J. Yeo and B. Greenberg, *Targeting the ACE2-Ang-(1-7) pathway in cardiac fibroblasts to treat cardiac remodeling and heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **51**(4): p. 542-7.
43. Lambert, D.W., M. Yarski, F.J. Warner, P. Thornhill, E.T. Parkin, et al., *Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2)*. J Biol Chem, 2005. **280**(34): p. 30113-9.
44. Wang, W., S. Bodiga, S.K. Das, J. Lo, V. Patel, et al., *Role of ACE2 in diastolic and systolic heart failure*. Heart Fail Rev, 2012. **17**(4-5): p. 683-91.
45. Epelman, S., W.H. Tang, S.Y. Chen, F. Van Lente, G.S. Francis, et al., *Detection of soluble angiotensin-converting enzyme 2 in heart failure: insights into the endogenous counter-regulatory pathway of the renin-angiotensin-aldosterone system*. J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(9): p. 750-4.
46. Beneteau, B., B. Baudin, G. Morgant, J. Giboudeau and F.C. Baumann, *Automated kinetic assay of angiotensin-converting enzyme in serum*. Clin Chem, 1986. **32**(5): p. 884-6.
47. Ronca-Testoni, S., *Direct spectrophotometric assay for angiotensin-converting enzyme in serum*. Clin Chem, 1983. **29**(6): p. 1093-6.

48. Uri, K., M. Fagyas, I. Manyine Siket, A. Kertesz, Z. Csanadi, et al., *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, 2014. **9**(4): p. e87845.
49. Vickers, C., P. Hales, V. Kaushik, L. Dick, J. Gavin, et al., *Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase*. J Biol Chem, 2002. **277**(17): p. 14838-43.
50. Patel, J.C., B.L. Maughan, A.M. Agarwal, J.A. Batten, T.Y. Zhang, et al., *Emerging molecularly targeted therapies in castration refractory prostate cancer*. Prostate Cancer, 2013. **2013**: p. 981684.
51. Mozaffarian, D., E.J. Benjamin, A.S. Go, D.K. Arnett, M.J. Blaha, et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2016. **133**(4): p. e38-360.
52. Rentzsch, B., M. Todiras, R. Iliescu, E. Popova, L.A. Campos, et al., *Transgenic angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in vessels of SHRSP rats reduces blood pressure and improves endothelial function*. Hypertension, 2008. **52**(5): p. 967-73.
53. Yamazato, M., Y. Yamazato, C. Sun, C. Diez-Freire and M.K. Raizada, *Overexpression of angiotensin-converting enzyme 2 in the rostral ventrolateral medulla causes long-term decrease in blood pressure in the spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 2007. **49**(4): p. 926-31.
54. Gurley, S.B., A. Allred, T.H. Le, R. Griffiths, L. Mao, et al., *Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice*. J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2218-25.
55. Wysocki, J., M. Ye, E. Rodriguez, F.R. Gonzalez-Pacheco, C. Barrios, et al., *Targeting the degradation of angiotensin II with recombinant angiotensin-converting enzyme 2: prevention of angiotensin II-dependent hypertension*. Hypertension, 2010. **55**(1): p. 90-8.
56. Zhong, J., R. Basu, D. Guo, F.L. Chow, S. Byrns, et al., *Angiotensin-converting enzyme 2 suppresses pathological hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction*. Circulation, 2010. **122**(7): p. 717-28, 18 p following 728.
57. Patel, S.K., B. Wai, M. Ord, R.J. MacIsaac, S. Grant, et al., *Association of ACE2 genetic variants with blood pressure, left ventricular mass, and cardiac function in Caucasians with type 2 diabetes*. Am J Hypertens, 2012. **25**(2): p. 216-22.
58. Lu, N., Y. Yang, Y. Wang, Y. Liu, G. Fu, et al., *ACE2 gene polymorphism and essential hypertension: an updated meta-analysis involving 11,051 subjects*. Mol Biol Rep, 2012. **39**(6): p. 6581-9.
59. Wang, J., N. Li, F. Gao, R. Song, S. Zhu, et al., *Balance between angiotensin converting enzyme and angiotensin converting enzyme 2 in patients with chronic heart failure*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2015. **16**(3): p. 553-8.
60. Patel, V.B., N. Clarke, Z. Wang, D. Fan, N. Parajuli, et al., *Angiotensin II induced proteolytic cleavage of myocardial ACE2 is mediated by TACE/ADAM-17: a positive feedback mechanism in the RAS*. J Mol Cell Cardiol, 2014. **66**: p. 167-76.
61. Lambert, D.W., N.E. Clarke, N.M. Hooper and A.J. Turner, *Calmodulin interacts with angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) and inhibits shedding of its ectodomain*. FEBS Lett, 2008. **582**(2): p. 385-90.
62. Lew, R.A., F.J. Warner, I. Hanchapola, M.A. Yarski, J. Ramchand, et al., *Angiotensin-converting enzyme 2 catalytic activity in human plasma is masked by an endogenous inhibitor*. Exp Physiol, 2008. **93**(5): p. 685-93.

63. Jia, H.P., D.C. Look, P. Tan, L. Shi, M. Hickey, et al., *Ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme 2 in human airway epithelia*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009. **297**(1): p. L84-96.
64. Iwata, M., J.E. Silva Enciso and B.H. Greenberg, *Selective and specific regulation of ectodomain shedding of angiotensin-converting enzyme 2 by tumor necrosis factor alpha-converting enzyme*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **297**(5): p. C1318-29.
65. Sluimer, J.C., J.M. Gasc, I. Hamming, H. van Goor, A. Michaud, et al., *Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and activity in human carotid atherosclerotic lesions*. *J Pathol*, 2008. **215**(3): p. 273-9.
66. van Kimmenade, R.R. and J.L. Januzzi, Jr., *Emerging biomarkers in heart failure*. *Clin Chem*, 2012. **58**(1): p. 127-38.
67. Palazzuoli, A., M. Gallotta, I. Quatrini and R. Nuti, *Natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP): measurement and relevance in heart failure*. *Vasc Health Risk Manag*, 2010. **6**: p. 411-8.
68. Maeder, M.T. and D.M. Kaye, *Heart failure with normal left ventricular ejection fraction*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **53**(11): p. 905-18.
69. Parekh, N. and A.S. Maisel, *Utility of B-natriuretic peptide in the evaluation of left ventricular diastolic function and diastolic heart failure*. *Curr Opin Cardiol*, 2009. **24**(2): p. 155-60.
70. Tschöpe, C., M. Kasner, D. Westermann, R. Gaub, W.C. Poller, et al., *The role of NT-proBNP in the diagnostics of isolated diastolic dysfunction: correlation with echocardiographic and invasive measurements*. *Eur Heart J*, 2005. **26**(21): p. 2277-84.
71. McMurray, J.J., S. Adamopoulos, S.D. Anker, A. Auricchio, M. Bohm, et al., *ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. *Eur Heart J*, 2012. **33**(14): p. 1787-847.
72. de Boer, R.A., D.J. Lok, T. Jaarsma, P. van der Meer, A.A. Voors, et al., *Predictive value of plasma galectin-3 levels in heart failure with reduced and preserved ejection fraction*. *Ann Med*, 2011. **43**(1): p. 60-8.
73. Julius, S., S.D. Nesbitt, B.M. Egan, M.A. Weber, E.L. Michelson, et al., *Feasibility of treating prehypertension with an angiotensin-receptor blocker*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(16): p. 1685-97.
74. Braunwald, E., M.J. Domanski, S.E. Fowler, N.L. Geller, B.J. Gersh, et al., *Angiotensin-converting-enzyme inhibition in stable coronary artery disease*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(20): p. 2058-68.
75. Simoons, M.L., J. Vos, P.J. de Feyter, M.L. Bots, W.J. Remme, et al., *EUROPA substudies, confirmation of pathophysiological concepts. European trial on reduction of cardiac events with perindopril in stable coronary artery disease*. *Eur Heart J*, 1998. **19 Suppl J**: p. J56-60.
76. *Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6,105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack*. *Lancet*, 2001. **358**(9287): p. 1033-41.
77. Cowley, A.J., K. Stainer, R.D. Wynne, J.M. Rowley and J.R. Hampton, *Comparison of the effects of captopril and enoximone in patients with severe heart failure: a placebo controlled double-blind study*. *Int J Cardiol*, 1989. **24**(3): p. 311-6.
78. *Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group*. *N Engl J Med*, 1987. **316**(23): p. 1429-35.

79. Garg, R. and S. Yusuf, *Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. Collaborative Group on ACE Inhibitor Trials.* JAMA, 1995. **273**(18): p. 1450-6.
80. Packer, M., P.A. Poole-Wilson, P.W. Armstrong, J.G. Cleland, J.D. Horowitz, et al., *Comparative effects of low and high doses of the angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril, on morbidity and mortality in chronic heart failure. ATLAS Study Group.* Circulation, 1999. **100**(23): p. 2312-8.
81. Cleland, J.G., M. Tendera, J. Adamus, N. Freemantle, L. Polonski, et al., *The perindopril in elderly people with chronic heart failure (PEP-CHF) study.* Eur Heart J, 2006. **27**(19): p. 2338-45.
82. Emdin, C.A., T. Callender, J. Cao, J.J. McMurray and K. Rahimi, *Meta-Analysis of Large-Scale Randomized Trials to Determine the Effectiveness of Inhibition of the Renin-Angiotensin Aldosterone System in Heart Failure.* Am J Cardiol, 2015. **116**(1): p. 155-61.
83. Piller, L.B., S. Baraniuk, L.M. Simpson, W.C. Cushman, B.M. Massie, et al., *Long-term follow-up of participants with heart failure in the antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial (ALLHAT).* Circulation, 2011. **124**(17): p. 1811-8.
84. Paulus, W.J. and J.J. van Ballegoij, *Treatment of heart failure with normal ejection fraction: an inconvenient truth!* J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(6): p. 526-37.
85. Takemoto, M., K. Node, H. Nakagami, Y. Liao, M. Grimm, et al., *Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy.* J Clin Invest, 2001. **108**(10): p. 1429-37.
86. Patel, R., S.F. Nagueh, N. Tsybouleva, M. Abdellatif, S. Lutucuta, et al., *Simvastatin induces regression of cardiac hypertrophy and fibrosis and improves cardiac function in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy.* Circulation, 2001. **104**(3): p. 317-24.
87. Fukuta, H., D.C. Sane, S. Brucks and W.C. Little, *Statin therapy may be associated with lower mortality in patients with diastolic heart failure: a preliminary report.* Circulation, 2005. **112**(3): p. 357-63.



Nyilvántartási szám: DEENK/236/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Úri Katalin
Neptun kód: HE4QYF
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Úri, K.**, Fagyas, M., Kertész, A. B., Borbély, A., Jenei, C., Bene, O., Csanádi, Z., Paulus, W. J., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A., Lizanecz, E.: Circulating ACE2 activity correlates with cardiovascular disease development.
J. Renin-Angio-Aldo S. "Accepted by Publisher", 2016.
IF: 2.35 (2015)
2. **Úri, K.**, Fagyas, M., Mányiné Siket, I., Kertész, A. B., Csanádi, Z., Sándorfi, G., Clemens, M., Fedor, R., Papp, Z., Édes, I., Tóth, A., Lizanecz, E.: New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) IV: circulating ACE2 as a biomarker of systolic dysfunction in human hypertension and heart failure.
PLoS One. 9 (4), 1-32, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087845>
IF: 3.234





További közlemények

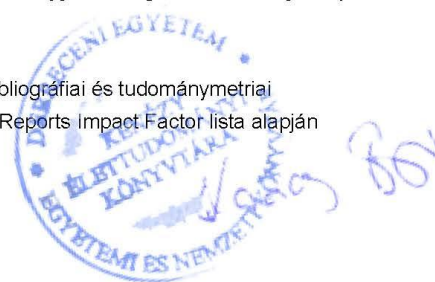
3. Fagyas, M., **Úri, K.**, Mányiné Siket, I., Daragó, A., Boczán, J., Bányai, E., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A.: New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) I: endogenous angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition.
PLoS One. 9 (4), 1-29, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087843>
IF: 3.234
4. Fagyas, M., **Úri, K.**, Mányiné Siket, I., Fülöp, G. Á., Csató, V., Daragó, A., Boczán, J., Bányai, E., Szentkirályi, I., Maros, T. M., Szerafin, T., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A.: New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) II: albumin suppresses angiotensin converting enzyme (ACE) activity in human.
PLoS One. 9 (4), 1-28, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087844>
IF: 3.234
5. Fagyas, M., **Úri, K.**, Mányiné Siket, I., Daragó, A., Boczán, J., Bányai, E., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A.: New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) III: endogenous inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) provides protection against cardiovascular diseases.
PLoS One. 9 (4), 1-29, 2014.
IF: 3.234

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,286

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 5,584

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

Debrecen, 2016.09.21.



TÁRGYSZAVAK

renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer	renin-angiotensin-aldosteron system
angiotenzin-konvertáló enzim 2	angiotensin-converting enzyme 2
szisztolés szívelégtelenség	systolic heart failure
diasztolés szívelégtelenség	diastolic heart failure
hipertónia	hypertension
kardiovaszkuláris betegségek	cardiovascular diseases
biomarker	biomarker
kardiális reszinkronizációs terápia	cardiac resynchronization therapy

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, *Dr. Lizanecz Erzsébetnek* az elmúlt évek során nyújtott magas szintű és precíz szakmai irányítást a kardiológia területén, a publikációk, valamint a disszertáció elkészítése során is. Kezdetől önzetlenül segített és hozzáállásával mindig végtelen nagy türelmet és higgadtságot sugárzott.

Köszönetemet fejezem ki *Dr. Édes István* professzor úrnak, aki lehetővé tette, hogy az általa vezetett Kardiológiai Intézet szárnyai alatt végezhessem munkámat.

Hálával tartozom *Prof. Dr. Papp Zoltánnak*, aki a Klinikai Fiziológiai Tanszék vezetőjeként megnyitotta előttem a kutatók világát nemzetközi szinten is, valamint *Prof. Dr. Tóth Attilának*, aki nem csak elméleti tanácsaival, hanem a lelkes kutatói hozzáállásával is példát mutatott.

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet a Klinikai Fiziológiai Tanszék összes munkatársának és Ph.D. hallgatójának a munkámhoz nyújtott segítségükért. Külön köszönet illeti *Dr. Fagyas Miklóst*, aki már TDK hallgató koromban szárnyai alá vett és aki mindig példaként járt előttem, valamint *Mányiné Siket Ivettát*, aki megkönnyítette és előrelendítette a laboratóriumi munkámat.

Hálásan köszönöm a Kardiológiai Intézet valamennyi orvosának valamint ambuláns nővérének hogy segítettek a beteg beválogatásban, valamint humán mintákat biztosítottak a kísérleteinkhez.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni szüleimnek, akik támogattak és lelket öntöttek belém a nem túl sikeres időkben, mert az ő szeretetük és biztatásuk nélkül jelen disszertáció nem készülhetett volna el.

Ezt a munkát nagy szeretettel ajánlom drága szüleimnek,

Úriné Bandi Ildikónak és Úri Máténak!