

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Dr. Fagyas Miklós

Témavezető: Dr. Tóth Attila



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2014

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Fagyas Miklós okleveles orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskola
(Kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

Témavezető: Dr. Tóth Attila, egyetemi docens

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Farsang Csaba, az MTA doktora
Prof. Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora

A doktori szigorlat helye, időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK
Laboratóriumi Medicina Intézet Könyvtára
2014. május 28. 11.00

Az értekezés bírálói: Dr. Páll Dénes, az MTA doktora
Dr. Balla András, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Farsang Csaba, az MTA doktora
Prof. Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora
Dr. Páll Dénes, az MTA doktora
Dr. Balla András, PhD

Az értekezés védésének helye, időpontja:

Debreceni Egyetem
Augusztai Központ Nagyelőadó Terme
2014. május 28. 13.00

1. Bevezetés és Irodalmi áttekintés

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

A kardiovaszkuláris megbetegedések többségében - ideértve a hipertóniát, a szisztolés szívelégtelenséget, a heveny koronária szindrómát, valamint a perifériás verőérbetegséget -, a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszerre (RAAS) ható gyógyszereket sikeresen alkalmazzák. Ez azt sugallja, hogy a RAAS-nak fontos szerepe van a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában, progressziójában. A RAAS-ra ható gyógyszerek közül a leggyakrabban alkalmazott gyógyszerek egyike az angiotenzin-konvertáló enzim gátlószerei (ACE-gátlók). Az ACE-gátlók akár 40%-kal is csökkenthetik a kardiovaszkuláris halálozás mértékét, mely a RAAS elemein belül az ACE kiemelt szerepére hívja fel a figyelmet.

Az ACE-gátló gyógyszerekkel elért sikerek árnyékában viszonylag keveset tudunk az ACE endogén szabályozásáról, ezen belül is az endogén ACE-gátló molekulák jelenlétéről, vagy hiányáról. Eddigi kutatómunkám során megkíséreltem kimutatni egy endogén ACE-gátló molekula jelenlétét a vérből, azonosítani azt, biokémiaailag karakterizálni és vaszkuláris hatásait leírni.

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

A májban termelődő α 2-globulin angiotenzinogén N-terminális végéről a vese juxtaglomeruláris apparatus granuláris sejtjei által előállított renin hasít le egy 10 aminosavból álló peptidet, az angiotenzin I-et. A renin elválasztásának legfőbb ingerei a veseperfúzió csökkenése, a nátrium-klorid koncentráció csökkenése a tubulusban, valamint a szimpatikus aktivitás fokozódása a juxtaglomeruláris apparátushoz futó szimpatikus idegvégződésekben. Az inaktív, közvetlen

hatásokkal nem rendelkező angiotenzin I C-terminálisáról az angiotenzin-konvertáló enzim hasít le két aminosavat, ezzel előállítva a RAAS legfőbb effektor molekuláját, a nyolc aminosavból álló angiotenzin II-t. Az angiotenzin II hatásait az 1-es (AT1) és 2-es (AT2) típusú angiotenzin II receptorokon keresztül fejti ki. Az AT1-receptoron keresztül fokozza az aldoszteron és a vazopresszin szekréciót, vazokonstriktiót hoz létre, szomjúságot okoz, elősegíti a fibrózist, a sejtnövekedést és a migrációt, stb. Az AT2-receptoron keresztül mediált hatásai többnyire ellentétesek az 1-es receptoron keresztül kifejtett hatásokkal: vazodilatációt okoz, fokozza a nitrogén-monoxid keletkezését és gátolja a sejtnövekedést. Az angiotenzin II-t az aminopeptidáz A angiotenzin III-má katabolizálja, mely az angiotenzin II hatásaival, de jelentősen rövidebb fél-életidővel rendelkezik. Az angiotenzin III-t az aminopeptidáz M angiotenzin IV-gyé hasítja, melynek már sokkal kisebb biológiai hatása van.

Az angiotenzin-konvertáló enzim

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

Az ACE-nak két izoenzimje ismert. A szomatikus ACE - mely a nagyobb méretű forma (150-180 kDa) - számos szövetben megtalálható, többek között az endotél sejtek felszínén, a kardiovaszkuláris rendszer elemeiben, a vesékben, a májban, stb. Szerkezetére jellemző, hogy egy rövid C-terminális citoplazmatikus domént követően egy hidrofób transzmembrán rész található benne, mely biztosítja az ACE megfelelő kihorgonyozását a sejt felszínére. A katalitikus centrumokat tartalmazó hatalmas, glikozilált globuláris domén a sejten kívül helyezkedik el. A szomatikus ACE két aktív centrummal rendelkezik. Az aktív centrumok kialakításában résztvevő aminosavak sorrendje azonos (HEMGH), mégis részben eltérő tulajdonságokkal és szubsztrát specificitással rendelkeznek. A C-terminális aktív centrum jobban függ a Cl⁻ ionok jelenlététől és kevésbé hőstabil, mint a

nagyobb mértékben glikozilált N-terminális aktív centrum. Mindkét aktív centrum hasonló hatékonysággal bontja a bradikinin, míg az angiotenzin I hasítása a C-domén aktív centrumon a hatékonyabb. Az ACE-szekretáz a transzmembrán régió extracelluláris oldalán hasítva az enzimet biztosítja annak keringésbe történő jutását.

A tesztikuláris, vagy germinális ACE csak a herékben expresszálandó forma (95-105 kDa), mely egyetlen aktív centrummal rendelkezik. Az ACE-knockout egerek jelentősen csökkent fertilitással rendelkeznek, mely rávilágít a tesztikuláris ACE kiemelt szerepére a reprodukció biztosításában.

A keringésben megtalálható ACE mennyisége jelentős egyének közötti variabilitást mutat. Ennek hátterében az ACE inzerciós/deléciós (I/D) polimorfizmusa áll, mely egy 287 bázispár hosszúságú nem kódoló repetitív szekvencia inzertálódása (I), vagy deléciója (D) az ACE-gén 16. intronjába. Az I/D polimorfizmus következtében a D-alléllal rendelkező egyének esetében nagyobb szérum ACE koncentrációt mérhetünk, mint az I-alléllal rendelkező egyének esetében.

ACE-gátló gyógyszerek

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

Az első ACE-gátló vegyületet Ferreira 1965-ben azonosította a *Bothrops jararaca* vipera mérgeiben (teprotid). 1975-re sikeresen kifejlesztették az első stabil, aktív ACE-gátló gyógyszert, a captopril, melyet követően újabb gyógyszerek jelentek meg a betegellátásban. Kémiai szerkezetük szerint 3 csoportba sorolhatók ezek a gyógyszerek: (1) szulfhidril-csoportot tartalmazók (captopril, zofenopril), (2) dikarboxilát-csoportot tartalmazók (enalapril, ramipril, perindopril, lizinopril

stb.) és a (3) foszfonát-csoportot tartalmazó gyógyszer (fozinopril). Csupán a captopril és a lizinopril az aktív hatóanyag, a többi ACE-gátló gyógyszer „pro-drugként” kerül a szervezetbe és a májban metabolizálódik aktív hatóanyaggá.

Az ACE-gátlók számos klinikai tanulmányban bizonyították hatékonyságukat, melyek alátámasztották, hogy az ACE-gátlók csökkentik a kardiovaszkuláris halálozást, a stabil koronária betegségben fellépő nem végzetes miokardiális infarktus és szívmegállás rizikóját. Javítják a prognózist és az 5-hetes mortalitást miokardiális infarktus után, csökkentik a bal kamrai remodeláció mértékét, késleltetik a hipertónia kialakulását, csökkentik a bal kamrai tömegindexet bal kamra hipertrófiában, csökkentik a mikroalbuminuria mértékét és a diabéteszes nefropátia kockázatát 2-es típusú diabéteszben, valamint csökkentik az újonnan diagnosztizált diabétesz előfordulását is.

Az ACE-gátlók kedvező hatásaikon túl változó mértékű, olykor súlyos mellékhatásokat is okozhatnak. A gyakoribb és kedvezőtlenebb mellékhatások között a köhögést, az angioödémát (Quincke-ödéma) és a vesefunkció romlását emelhetjük ki.

Természetes ACE-gátló vegyületek

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

A tejben megtalálható kazein, illetve a tejsavó egyéb fehérjei között számos ACE-gátló hatású vegyületet azonosítottak. Ezek közül a laktokininek és a kazokininek vérnyomáscsökkentő hatását igazolták spontán hipertóniás patkányokon, valamint humán kísérletes vizsgálatokban is hasonló hatásról számoltak be.

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

Számos tengeri állatfaj fehérjéinek hidrolizátumából nyertek ki ACE-gátló hatással rendelkező oligo- és polipeptid típusú vegyületeket. Ezek a peptidek a táplálék megemésztése során is keletkezhetnek, azonban felszívódásuk, keringésbe kerülésük még bizonyításra vár.

Endogén ACE-gátlás

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

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

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

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

Rogerson és mtsi. 1989-ben a P-anyag N-terminális fragmentjeiről mutatták ki, hogy ACE-gátló hatással rendelkeznek.

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

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

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

2. Célkitűzések

Tudományos kutatásaim során az alábbi célokat fogalmaztam meg:

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

3. Anyagok és Módszerek

3.1. Vérminták gyűjtése, szérumminta készítése

A vérmintákat egészséges és magasvérnyomás-betegségben szenvedő önkéntesektől gyűjtöttük aseptikus technikával. A natív vérmintákat 60 percig szobahőmérsékleten tartottuk, majd a szérumot 15 perces, 1 500 g erősségű centrifugálással elválasztottuk a sejtes elemektől. Az így kapott szérum mintákat felhasználásig -20°C-on fagyaszttva tároltuk.

3.2. Szérum ACE-aktivitás meghatározása spektrofotometriás módszerrel

A szérumminták ACE-aktivitását Beneteau és mtsi. módszerének átdolgozott változata szerint határoztuk meg. Ennek alapja a 340 nm-en magas fényelnyelő képességű mesterséges ACE-szubsztrát, a FAPGG (N-[3-(2-furil)akrilil]-L-fenilalanil-glicil-glicin) hasítását követő optikai-denzitáscsökkenés. A méréseket 96 lyukú platekben, 37°C-on végeztük. Az 340 nm-es hullámhosszon bekövetkező optikai-denzitásváltozást NovoStar plate-readerrel 5 perces időközönként rögzítettük legalább 90 percen keresztül. Az optikai-denzitásváltozást az idő függvényében ábráztuk és a pontokra egyenest illesztettünk. Az illesztést akkor fogadtuk el, ha az illeszkedés mértéke (r^2) meghaladta a 0,9-et. A minták ACE-aktivitását az alábbi képlet alapján számoltuk:

$$\text{Aktivitás} = (S/k) \cdot D,$$

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

3.3. Domén-specifikus ACE-aktivitás meghatározása

Az aktív centrum-specifikus ACE-aktivitásmérést Carmona és mtsi. által leírtak szerint végeztük. Quenchelt peptid-szubsztrátokat használtunk, melyek közül az Abz-SDK(Dnp)P-OH szubsztrátot az N-terminális aktív centruma, az Abz-

LFK(Dnp)-OH szubsztrátot a C-terminális aktív centruma képes specifikusan hasítani, míg az Abz-FRK(Dnp)P-OH quenched peptidet mindkét aktív centrum bontja. A mérések kivitelezése 96 lyukú fekete platekben 37°C-on történt. A gerjesztési hullámhossz $\lambda=340\text{nm}$, az emissziós hullámhossz $\lambda=405\text{nm}$ volt. A fluoreszcens jelintenzitásban bekövetkező változást a domén-specifikus szubsztrátok esetében 4 perces időközönként rögzítettük legalább 90 percen keresztül, a nem specifikus szubsztrát esetében 1,5 perces időközönként legalább 30 percen keresztül rögzítettük NovoStar plate-readerrel. A fluoreszcens jelintenzitás változását az idő függvényében ábrázoltuk és a pontokra egyenest illesztettünk. Az illesztést akkor fogadtuk el, ha jósága (r^2) meghaladta a 0,95-öt. A minták ACE-aktivitását az alábbi képlet alapján számoltuk ki:

$$\text{Aktivitás} = (S / k) * D,$$

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

3.4. ACE-mediált angiotenzin I-hasítás közvetlen mérése

A szérummintákat angiotenzin I-gyel HEPES pufferben 37°C-on inkubáltunk. Az elegyekhez 5 mM EDTA-t adtuk, hogy leállítsuk az ACE-katalizált angiotenzin I-hasítást. A keletkezett angiotenzin peptidek mennyiségét HPLC technika segítségével mértük, miután a mintákat átszűrtük egy 10 kDa pórusméretű filteren. Az analízis reverz fázisú C18 oszlopon történt. Az angiotenzin peptideket 22% acetonitrilről (ACN) 55% ACN-re növekvő gradiens elúciós profillal szeparáltuk, és diódasoros detektorral detektáltuk 230 nm-en. A peptidekre jellemző csúcsok görbe alatti területe alapján kalibrációs görbe segítségével számoltuk ki a peptidek mennyiségét. A kapott értékeket az idő függvényében ábrázoltuk, melyre egyenest illesztettünk. Az angiotenzin I-átalakulás sebességét a szérum minta hígítási

fokával korrigáltuk, és az ACE aktivitást az 1 liter szérum által 1 perc alatt hasított angiotenzin I μ mol-ban kifejezett mennyiségével jellemeztük.

3.5. A szérum ACE mennyiségének meghatározása

A szérum ACE mennyiségét a kereskedelmi forgalomban kapható humán „ACE developement kittel” (R&D Systems) határoztuk meg a gyártó utasításai szerint, kisebb módosításokkal. 96-lyukú ELISA-lemezt ACE-ellenes antitesttel fedtünk le (capture antitest), majd a lemez szabad kötőhelyeit reagens hígítóval (10 mg/ml borjú szérum albumin oldat) blokkoltuk. Reagens hígítóban hígított szérumot adtunk a lyukakba, majd az antitest-antigén komplexet biotinilált detekciós antitesttel jelöltük. Ezt követően streptavidinnel konjugált torna-peroxidázt pipettáztunk a lyukakba. Végül az ELISA lemezhez kötött komplex mennyiségét tetrametil-benzidint szubsztrát oldattal határoztuk meg. A reakciót 20 perc elteltével sósavval leállítottuk, majd lemértük a minták optikai denzitását 450 nm-en plate readerrel. Az ACE-koncentrációt rekombináns ACE-standard sor segítségével számoltuk ki.

3.6. A humán szérum fehérjéinek elválasztása

Egy egészséges önkéntestől származó 250-szeresére hígított szérummintákat egyszer használatos ultraszűrőkkel szűrtük mindaddig, amíg a hígított szérumminták el nem érték a kiindulási térfogatukat. A szűrők pórusmérete 50 és 100 kDa-os volt. Egy szérummintánál a kiindulási és a 100 kDa-os pórusméretű szűrővel kivitelezett szűrés után visszanyert frakció ACE-koncentrációját megmértük, így meg tudtuk becsülni a minta hígulását vagy töményedését. Nem találtunk különbséget a kiindulási és a szűrés utáni frakciók ACE-koncentrációi között.

3.7. A humán szérumalbumin koncentrációjának meghatározása

A humán szérumalbumin koncentrációjának mérését brómkrezol-zöld diagnosztikai reagens segítségével határoztuk meg a gyártó utasítása szerint. 1 ml

brómkrezol-zöld reagenshez 10 µl szérummintát adtunk, majd a keveréket abszorbanáciáját spektrofotométerrel mértük 546 nm-en egyszer használatos küvettákban reagens vakkal szemben. A HSA-koncentrációt a következő képlet szerint számítottuk:

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

ahol A az 546 nm-en mért abszorbanancia, C_{standard} pedig a standard oldat HSA koncentrációja.

3.8. A tisztított humán szérumalbumin tulajdonságai

Néhány kísérletben az ACE-aktivitás meghatározását HSA jelenlétében végeztük. A HSA oldat tisztaságát SDS poliakrilamid gélelektroforézissel és MALDI-TOF tömeg-spektrometriai méréssel ellenőriztük. Mindkét kísérlet szerint megfelelő tisztaságú volt a HSA. A kísérletek során használt HSA-t kis molekulásúlyú, albuminhoz abszorbeált ACE-gátlók jelenlétére is megvizsgáltuk. 5 kDa pórusméretű ultraszűrőn 15 alkalommal szűrt albumin ACE-gátló tulajdonsága nem változott a kiindulási mintához képest.

3.9. Humán v. saphena szegmensek izometrikus kontraktilis erejének mérése

Koronária bypass műtéteken felhasználásra nem került 20 vena saphena mintát 35 szegmensre vágunk szét. A szegmenseket kétcsatornás myograph rendszerre helyeztük fel. A véna szegmenseket 15 mN erővel megfeszítettük, majd izometriás körülmények között 60 percig 37°C-on pihentettük. Az érgyűrűk életképességét KCl és norepinefrin hozzáadásával teszteltük. Ezt követően mostuk az érgyűrűket, majd megmértük az 1 µM angiotenzin I vagy angiotenzin II kiváltotta kontrakciók nagyságát 20 mg/ml humán szérumalbumin jelenlétében és hiányában is. A kísérlet végén megismételtük a KCl- és norepinefrin kezeléseket az angiotenzin peptidek folyamatos jelenlétében, ezzel igazoltuk az erek életképességét. Néhány kísérletben az albumint captoprilrel együtt alkalmaztuk.

3.10. A humán rekombináns ACE termelése és tisztítása

A humán rekombináns ACE-t a „Bac-to-Bac TOPO” expressziós rendszerrel termeltük a gyártó utasításai szerint. Egy kémiaiilag kompetens *E. coli* törzset transzformáltunk az ACE-gént tartalmazó cDNS plazmiddal. Az antibiotikum-szelekciót követően plazmidot izoláltunk, majd az ACE-gént tartalmazó pFastBac konstruktot DH10Bac kompetens *E. coli* törzsbe transzformáltuk bacmid készítése céljából. A bacmid DNS-t SF9 rovarsejt kultúrába transzfektáltuk, melyben baculovírus generálódott. További SF9 sejteket fertőztünk meg az így nyert baculovírusokkal. A fertőzést követő 4. napon az rovarsejteket lecentrifugáltuk és a pelletet PBS-sel mostuk, hogy eltávolítsuk a tenyésztő folyadékot. A tiszta pelletet RIPA pufferben szonikátorral homogenizáltuk. Centrifugálást követően a felülúszót leszívtuk, majd anion-cserélő oszlopra injektáltuk. Az ACE-t 168 mM-ról 540 mM-ra lineárisan emelkedő koncentrációjú NaCl-oldattal eluáltuk az oszlopról, az ACE-csúcsot ACE-aktivitásméréssel határoztuk meg. A legalább 50 U/l aktivitással rendelkező frakciókat összegyűjtöttük. A karakterizálás során nem találtunk különbséget a szérums- és a rekombináns ACE-aktivitás captoprillel történő gátolhatóságában.

3.11. Az ACE molekuláris interakcióinak vizsgálata

A szérums fehérjéi között kialakuló kölcsönhatásokat keresztkötő ágensek segítségével stabilizáltuk, majd a fehérjéket immunprecipitáltuk (anti-ACE antitesttel). Western-blot analízis segítségével ugyanezen ACE-ellenes antitest hozzáadásával láthatóvá tettük a létrejövő komplexeket. A kísérletet tisztított ACE-val (>100 kDa szérumsfrakció) és HSA elegyével is megismételtük. A HSA és ACE között kialakuló kapcsolatot tovább vizsgáltuk ELISA technika segítségével. 96-lyukú ELISA-lemezre HSA-t, zselatint, vagy ACE-ellenes antitestet immobilizáltunk, majd esetenként az immobilizált fehérjéket keresztkötő reagenssel kezeltük. Az így kialakult komplexhez rekombináns ACE-t adtunk végezettel kimutattuk a felszínhez kötött ACE jelenlétét.

3.12. ACE-általi bradikinin hasítás közvetlen mérése

A rekombináns ACE-t és bradikinin tartalmazó oldatot 37°C-on inkubáltuk önmagában vagy HSA jelenlétében. EDTA-val állítottuk le az ACE által katalizált bradikinin hasítást. A keletkezett bradikinin peptidek mennyiségét HPLC segítségével mértük meg, miután átszűrtük a mintákat egy 10 kDa pórusméretű szűrőn. Az analízis reverz fázisú C18 oszlopon történt. Az bradikinin peptideket 18% ACN-ről 44,2% ACN-re növekvő grádiens elúciós profillal eluáltuk és diódasoros detektorral detektáltuk. A peptidcsúcsok görbe alatti területe alapján kalibrációs görbe segítségével kiszámoltuk a peptidek mennyiségét, melyet az idő függvényében ábrázoltunk és egyenessel illesztettünk. A bradikinin átalakulás sebességét a háttérre korrigáltuk (rekombináns ACE és 1 μ M captopril) és összevetettük a HSA-t nem tartalmazó kontroll mintákkal.

3.13. Etikai engedély

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

3.14. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism 5.0 szoftverrel végeztük páratlan és páros t-teszt, valamint egytényezős varianciaanalízis felhasználásával. Jelentős különbségnek a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

4. Eredmények

4.1. Az endogén ACE-gátló jelenlétének kimutatása

A szérum ACE aktivitásának értéke jelentősen függ a mérés során alkalmazott hígítás mértékétől, minél nagyobb hígítást alkalmazunk, annál inkább nő az ACE specifikus aktivitása. Ez az összefüggés azonban nem figyelhető meg akkor, amikor a tisztított szöveti ACE aktivitását határozzuk meg különböző hígításokban. Ez azt sugallja, hogy a szérum ACE aktivitását egyéb tényezők is befolyásolják. Feltételezésünk szerint a megfigyelt jelenségért egy reverzibilis endogén gátlószer a felelős, mely a mintahígítás során leválik az ACE molekuláról, így annak növeli a specifikus aktivitását.

4.2. Az ACE-aktivitás mérés validálása

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

Megvizsgáltuk az ACE-mediált FAPGG-hasítás specifikusságát különböző proteáz-inhibitorok segítségével. Az alkalmazott proteáz inhibitoroknak nem volt hatása a szérum ACE aktivitására. Ezzel szemben az ACE-gátló captopril 1 μ M-os koncentrációban jelentősen gátolta a szérum ACE aktivitását.

Különböző reakciókörülmények között tanulmányoztuk a hígítás hatására bekövetkező ACE-aktivitás változást. Az aktivitásnövekedés megfigyelhető fiziológiás pH-n és fiziológiás Cl^- -ion koncentráció mellett, valamint nem függ a reakcióban használt puffer koncentrációjától.

4.3. Az endogén ACE-gátlás jellemzése

Megkíséreltük igazolni az endogén inhibitor jelenlétét. Ennek érdekében különböző pórusméretű ultraszűrőkön szűrtük keresztül a szérummintákat. Az 50

kDa-nál kisebb molekulatömegű fehérjék és ionok eltávolítása nem volt hatással az ACE aktivitására, míg a 100 kDa alatti fehérjék eltávolítása után jelentősen növekedett az aktivitás, és nagymértékben csökkent a hígítás hatására bekövetkező aktivitásnövekedés a kontrollhoz képest.

Az endogén gátlás típusát Lineweaver-Burk szerinti ábrázolásban készített grafikon segítségével határoztuk meg. A captopril esetében kompetitív gátlást mértünk, míg az endogén gátlószer esetében nem-kompetitív gátlást tapasztaltunk.

A captopril nagyobb mértékben képes gátolni a rekombináns ACE-mediált angiotenzin I – II konverziót, mint az endogén inhibitort tartalmazó szérumfrakció, HPLC technikával mérve. Az 50 kDa-nál kisebb méretű fehérjéket tartalmazó szérumfrakciónak viszont nem volt kimutatható ACE-gátló hatása. Ugyanezt az összefüggést figyelhettük meg a FAPGG hasításán alapuló kísérletekben is, sőt a captopril gátló hatását a <50 kDa és az 50-100 kDa méretű fehérjéket tartalmazó frakciók nem befolyásolták.

A captopril ugyanolyan hatékonyan gátolja a szérum ACE mindkét katalitikus centrumát fluoreszcens szubsztráttal mérve. Ezzel szemben az endogén ACE-gátlószer hatékonyabban gátolta a C-terminális aktív centrumot, mint az N-terminális katalitikus centrumot. A nem aktív-centrum-specifikus fluoreszcens szubsztráttal végzett mérés azt mutatta, hogy a rekombináns ACE-aktivitás is gátlható mind az endogén inhibitort tartalmazó szérumfrakcióval, mind pedig captoprillel. Ez összhangban van a FAPGG és az angiotenzin I ACE-mediált hasításakor megfigyelt gátlóhatással, mely azt igazolja, hogy a gátlóhatás nem szubsztrát-, hanem enzimspecifikus tulajdonság. Az 50 kDa-nál kisebb fehérjéket tartalmazó szérumfrakciónak nem volt gátlóhatása a nem aktív-centrum-specifikus fluoreszcens szubsztráttal mért rekombináns ACE-aktivitásra, mint ahogyan az angiotenzin I és FAPGG hasítására sem.

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

tulajdonság. Egér, borjú, kecske és szamár szérummintákat hasonlítottunk össze emberi szérummintával. Habár a szérumok ACE aktivitása jelentősen különbözött az egyes fajoknál, a hígítás hatására bekövetkező aktivitásnövekedés minden fajnál megfigyelhető volt.

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

Az ACE és a feltételezett endogén inhibitor közötti kapcsolatot kereszkötő ágensek segítségével stabilizáltuk. Ezt követően az ACE-t tartalmazó fehérje-komplexet immunprecipitáltuk, majd Western-blottal ACE-ellenes antitesttel láthatóvá tettük. Az ACE-t tartalmazó 180 kDa-os sáv felett egy plusz sáv jelent meg 250 kDa körüli magasságban, ez alapján az ACE-val komplexben lévő fehérje mérete 70 kDa körül lehet. Ebben a molekulatartományban a legnagyobb mennyiségben jelenlévő szérum fehérje a humán szérumalbumin. A HSA és az ACE közötti feltételezett kölcsönhatást ultraszűrési technikával tisztított ACE és HSA felhasználásával közvetlenül is megvizsgáltuk. A 250 kDa körüli sávot ilyen körülmények között is sikerült kimutatni, mely pozitívan festődött mind ACE-, mind HSA- ellenes antitesttel Western-blot analízis során. A HSA és ACE közötti kapcsolatot ELISA technikával is igazoltuk.

A HSA lehetséges ACE-gátló hatását rekombináns és szérumból részlegesen tisztított ACE-n is vizsgáltuk. A szérum ACE elválasztása a humán szérumalbumintól az ACE-aktivitás növekedéséhez vezetett. A humán szérumalbumin mind a rekombináns, mind a részlegesen tisztított szérum ACE-aktivitását képes dózis-függő módon gátolni; a fél-maximális gátlószer koncentrációk rendre 9,5 és 5,7 mg/ml voltak.

Az ACE-gátlók leggyakoribb klinikai mellékhatása a köhögés, melyet a legelfogadottabb elmélet szerint a megemelkedett bradikinin szint okoz. 40 mg/ml HSA hatását vizsgáltuk a rekombináns ACE-mediált bradikinin bontására. A HSA csupán részlegesen gátolta a bradikinin lebontását.

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

4.5. A HSA angiotenzin-mediált vaszkuláris válaszokra gyakorolt hatása

A HSA ACE-gátló hatását vaszkuláris preparátumokon, membrán-kötött ACE esetében is vizsgáltuk (humán vena saphena). Angiotenzin I-et vagy angiotenzin II-t adtunk az erekhez 20 mg/ml HSA jelenlétében vagy hiányában. Nem találtunk jelentős különbséget az angiotenzin I vagy II által kiváltott maximális kontrakciós erő tekintetében a HSA mentes körülmények között. Az angiotenzin I által kiváltott maximális kontrakció mértéke csökkent, míg az angiotenzin II-mediált összehúzóerő erejét nem befolyásolta a HSA jelenléte. A captopril hozzáadása a 20 mg/ml HSA-hoz nem befolyásolta jelentősen az angiotenzin I válasz nagyságát a 20 mg/ml HSA hatásához képest.

Az átmeneti, angiotenzin peptidek által kiváltott válaszokat részleteikben is vizsgáltuk, így a kontrakció kinetikáját, a fél-maximális kontrakció időtartamát, a deszenzitizáció kinetikáját, a deszenzitizáció mértékét is a már említett maximális erő nagysága mellett. Az angiotenzin I-mediált kontrakció kinetikája körülbelül háromszor lassabb volt a HSA jelenlétében, mint hiányában. Ezzel ellentétben a HSA jelenléte nem befolyásolta jelentősen az angiotenzin I által kiváltott kontrakció deszenzitizációjának kinetikáját, a fél-maximális kontrakció időtartamát és a deszenzitizáció mértékét. A HSA nem gyakorolt jelentős hatást az angiotenzin II-mediált válaszok nagyságára és kinetikájára sem

4.6. A szérum hígítása, mint az ACE-gátló terápia megítélésére alkalmas technika

A szérumminta hígításával az endogén ACE-gátló HSA molekulák leválnak az ACE-ről, így az újra aktív lesz. Az ACE-gátló terápiában részesülő

betegek esetében az endogén ACE-gátlás mellett az ACE-gátló gyógyszer hatása is kimutatható. Az ACE-gátló terápiában részesülő beteg szérummintájának nagymértékű hígításával elérhetjük, hogy a HSA molekulák mellett a gyógyszer molekulái is leváljanak az ACE-ről, ezzel az enzim újra aktívvá váljon. A nagymértékben hígított minta specifikus ACE aktivitása a betegnél mérhető, rá jellemző maximális ACE-aktivitás mértékét adja. A tömény mintából mért aktivitásérték pedig a gátolt ACE-aktivitás értékét mutatja. A maximális- és a gátolt ACE-aktivitás értékekből kiszámítható az ACE-gátlás mértéke. A kidolgozott módszert a klinikai gyakorlatban is megvizsgáltuk. Ennek során 502 hipertóniás beteget vontunk be a vizsgálatba, közülük 384 beteg részesült ACE-gátló kezelésben. Populációs szinten a betegek vérnyomása a 140/90 Hgmm-es célérték alatt volt. Minden egyes beteg esetében meghatároztuk az ACE-gátlás mértékét. Az ACE-gátlót szedő betegek között voltak olyan betegek is, akik ACE-gátlása a kontrolléval egyező mértékű (n=66), nekik lényegesen magasabb vérnyomásértékeik voltak.

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

Lényegesen csökkent annak a 17 betegnek a vérnyomása, akiknél a kontroll alkalmával, vagy a dózisznövelés után kielégítő gátlóhatást mértünk.

5. Megbeszélés

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

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

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

A hígítás hatására bekövetkező specifikus ACE-aktivitásnövekedés -így az endogén ACE-gátló jelenléte nemcsak az emberi faj sajátossága-, hanem számos

állatfaj esetében is kimutatható volt (egér, borjú, kecske, szamár). Ez a tény bizonyítja, hogy az evolúció során az endogén ACE-gátlás jól megőrzött tulajdonság.

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

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

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

Az endogén ACE-gátlás különösen érdekes jelenség a terápiásan alkalmazott ACE-gátló gyógyszerek sikerességének tükrében. Az ACE-gátlók hatékonynak bizonyultak a kardiovaszkuláris megbetegedések kezelésében, mint ahogyan azt számos nagy betegcsoporton végzett klinikai vizsgálat alátámasztja, és

terápiás irányelv ajánlja. A bemutatott eredményeink szerint a HSA jelentősen gátolja az ACE aktivitását, ami egy lehetséges protektív mechanizmus a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásával és progressziójában szemben. Ez az interakció puffer rendszerként működve alacsony szinten stabilizálhatja az ACE aktivitását függetlenül az ACE-koncentrációtól.

A szérum ACE-koncentráció genetikai kontroll alatt áll. Az ACE-gén inzerció/supressziós polimorfizmusa a keringésben lévő ACE-koncentráció 20-50%-os egyének közötti variabilitásáért felelős. Ez a különbség azt sugallja, hogy az I/D polimorfizmusnak kiemelt szerepe lehet a kardiovaszkuláris megbetegedések, többek között a miokardiális infarktus, a koszorúérbetegség, a szívelégtelenség és a hipertónia patomechanizmusában. Ennek ellenére a legtöbb tanulmány nem tudta bizonyítani a kardiovaszkuláris betegségek és az ACE polimorfizmus közötti összefüggést. Ennek egyik lehetséges magyarázat az, hogy a HSA puffereli az ACE aktivitását, alacsony szinten tartja azt függetlenül az ACE-koncentrációtól.

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

Számos olyan pontmutációt írtak le az ACE-génben, melyek nagyobb mértékben befolyásolják az ACE koncentrációját a keringésben, mint az I/D polimorfizmus. Kramers és mtsi. olyan esetekről számoltak be, ahol az ACE-gén pontmutációjának következtében a keringésben lévő ACE-mennyiség az ötszörösére emelkedett. Ez a mutáció legalább 8 családot érint, az érintettek azonban nem szenvednek ACE-hoz kapcsolható betegségekben, vagy

hipertóniában. Nesterovich és mtsi. egy másik mutációt írtak le, mely a szérum ACE-koncentrációját 13-szorosára emeli. Azonban ezeknél az egyéneknél sem sikerült az emelkedett ACE mennyiséghez betegséget társítani. Sőt, az ACE 1199. aminosavában bekövetkező prolin leucin cserét aszimptomatikus autoszomális domináns hiper-ACE-emiának nevezik. Az előzőekben leírt megfigyelések is azt támasztják alá, hogy az ACE-koncentráció széles tartományban jól tolerálható, mely valószínűleg a HSA ACE-aktivitás csökkentő hatásával magyarázható.

Az endogén ACE-gátlás lehetőségét nem a mi munkacsoportunk vetette fel és vizsgálta elsőként. Már 1979-ben beszámoltak egy 10 kDa-nál kisebb molekulamérettel rendelkező endogén ACE-gátló jelenlétéről a plazmában, melyet követően még számos alkalommal leírtak kisméretű endogén ACE-inhibitorokat. Érdekes módon mi nem láttunk arra utaló adatot, hogy az általunk vizsgált szérummintákban kisméretű endogén gátlószer lenne jelen. Egyetlen kísérletünkben sem volt kimutatható gátlóhatása az 50 kDa-nál kisebb molekulákat tartalmazó szérumfrakciónak. Ennek egyik lehetséges magyarázata az egyének közötti eltérő diétás faktorokban kereshető. Számos adat fellelhető az irodalomban arról, hogy diétás faktorok, többek között az α -S2-kazein, vagy a méz egyes komponensei ACE-gátló hatással rendelkeznek. Ez arra enged következtetni, hogy a tejben, vagy a mézben gazdag ételek fogyasztása következtében kis molekulású inhibitorok jelenhetnek meg a keringésben. A mi vizsgálati populációnkat alkotó betegek általában éhgyomorral érkeztek vérévételre, melynek következtében a diétás faktorok talán kisebb szerepet játszottak az eredmények befolyásolásában. Másik lehetséges magyarázata a kis molekulású inhibitorok hiányának, hogy korábbi vizsgálatokban megfigyeltek olyan gátló molekulákat, melyek nagy fehérjék degradációjából keletkeztek, a mi mintáinkban azonban ilyen degradáció valószínűleg nem következett be.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a HSA jelentős ACE-gátló hatással rendelkezik. Az albumin számos kisebb fehérje, peptid, ion, stb. szállításában vesz részt. A kérdés tehát az, hogy az albumin ACE-gátló

tulajdonsága saját fehérje természetéből adódik, vagy valamely abszorbeált molekula tehető ezért felelőssé? A tisztított HSA ACE-aktivitásra kifejtett gátlóhatása azt mutatta, hogy a gátlóhatás inkább az albuminhoz köthető. Ezt további két adat is megerősíti. Egyrészt a HSA tömegspektrometriás analízise során igazolást nyert, hogy az nagy tisztaságú, másrészt a HSA-nak a rekombináns ACE-t gátló hatása mit sem változott 15 mosási-szűrési ciklus során.

Néhány tanulmány, melyeket diétás tényezők ACE-gátló hatásának azonosítására terveztek az acein-1-et és az albutenzin A-t jelölték meg ACE-inhibitorként. Mindkét peptid a HSA tripszin-általi hasítási terméke. Az acein-1 egy heptapeptid, mely a HSA 138. és 144. aminosavai közötti szakaszt fedi le, míg az albutenzin A egy nonapeptid, mely a HSA 210. és 218. aminosavai közötti szakasznak felel meg. Ezeknek a peptideknek a létezése azt sugallja, hogy a HSA-nak több ACE-gátló doménje is lehet. Ráadásul az acein-1 és az albutenzin A nagyon hasonló fél-maximális gátlókoncentrációval (IC_{50}) rendelkeznek, mint amit mi a HSA esetében leírtunk (16 μM az acein-1 esetében és 1,2 μM az albutenzin A esetében). Érdekes módon annak a mesterséges peptidnek, mely csupán egyetlen aminosavval hosszabb, mint az acein-1, már lényegesen kisebb az IC_{50} értéke (500 μM). Ez arra enged következtetni, hogy a HSA ACE-gátló doménjának a megfelelő molekulafelszíni pozíciója különösen fontos a hatékony ACE-gátlás mechanizmusában.

A szérumban a fiziológiás HSA koncentráció magasabb (35-52 mg/ml), mint az albumin ACE-ra kifejtett fél-maximális gátlókoncentrációja (az IC_{50} érték 5,7 mg/ml szérum ACE és 9,5 mg/ml rekombináns ACE esetében). Ez arra enged következtetni, hogy *in vivo* körülmények között az ACE teljesen gátolva van. Bizonyos patológiás állapotokban (fehérje alultápláltságban, vagy súlyos májelégtelenségben) a keringő albuminkoncentráció lényegesen kisebb lehet, mint a referencia tartomány alsó értéke. Az ilyen betegségekben alkalmazott albumin infúzió növelheti az endogén ACE-gátlás mértékét. Ezzel összhangban azt

figyelték meg, hogy HSA posztoperatív infúziója során hipotenzió alakult ki azoknál a betegeknél, akik ACE-gátló terápiában részesültek.

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

Úgy gondoljuk, hogy a HSA nem egyformán gátolja az ACE összes formáját. Ennek megfelelően néhány lokalizációban az ACE affinitása kisebb lehet a szérumalbumin iránt, vagy esetleg magasabb a lokális ACE-mennyiség, mint a szérumban. Ebből következik, hogy a HSA-okozta gátlóhatás limitált ezekben a lokalizációkban, ami teret ad az ACE-gátló gyógyszereknek terápiás hatásuk kifejtésében. Ez összhangban van a Dzau és mtsi. által leírtakkal, miszerint a plazma ACE csak egy csekély részét képviseli a szervezet össz-ACE-aktivitásának, ezáltal szerepe is minimális. Valójában ezt az állítást ténnyel támasztottuk alá, mivel igazoltuk a szérumban ACE HSA-mediált gátoltságát.

Egy másik következménye a HSA-mediált szérumban ACE-gátlásának az lehet, hogy az angiotenzin I – II konverzió sebességmeghatározó lépéssé válik a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszerben. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy az angiotenzin I és II összemérhető mennyiségben található meg a

keringésben. Mindez arra utalhat, hogy az angiotenzin I képződés (a renin által) és konverzió (az ACE által) sebessége hasonló. Meg kell jegyezni azonban, hogy az angiotenzin I nem lehet jelen a keringésben a renin előzetes felszabadulása nélkül. Továbbá a HSA általi nagymértékű ACE-gátlás következtében az angiotenzin I és II lebontó útvonalak (például ACE2-aktivitás) kiemelt szerepet játszhatnak a lokális angiotenzin II koncentráció kialakításában.

A HSA lehetséges protektív szerepe mellett az ACE-gátlók már bizonyítottan kedvezően befolyásolják a kardiovaszkuláris betegségek kialakulását és progresszióját. A gyógyszer a kedvező hatásait csupán akkor tudja kifejtetni, ha a beteg beveszi azt, illetve ha megfelelő dózisban szedi azt. A klinikus nagymértékben képes befolyásolni a beteg hozzáállását a kezeléshez, de végső soron mindig a beteg dönt arról, hogy a gyógyszerét beveszi-e vagy sem. A kezelőorvos egy egyszerű vérnyomásmérés segítségével megpróbálhatja megítélni a beteg terápiahűségét, azonban számos esetben nem a vérnyomáscsökkentés a cél, hanem az ACE-gátlók egyéb kedvező tulajdonságait szeretnénk kiaknázni, melyek a vérnyomáscsökkentő hatástól függetlenek lehetnek.

A munkacsoportunk által kidolgozott módszer kitűnően használható a betegek ACE-gátló terápiájának objektív megítélésére. Ehhez csupán egyetlen cső vérré van szükség, melyből megmérhető a betegre jellemző ACE-gátlás mértéke. Az 502 beteg bevonásával végzett vizsgálatunkban arra a következtetésre jutottunk, hogy a betegek közel ötödében elégtelen az ACE-gátló terápia hatékonysága. Ennek hátterében leginkább a nem megfelelő terápiahűség áll. Viszont ha a kezelőorvos tudja, hogy melyik betegnél kell javítani a terápiahűségen, az növelheti a kezelés hatékonyságát, mellyel összességében csökkentheti a kardiovaszkuláris mortalitást és a hospitalizációk számát. Az elégtelen ACE-gátlóhatást mutató betegek kisebb részénél viszont az alkalmazott dózis mértéke volt elégtelen, melyet a dózis emelésével korrigálni lehetett. A pozitív változás a betegek vérnyomás-értékeiben és az *in vitro* ACE-gátló hatékonyság-mérésében is megmutatkozott.

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

6. Összefoglalás

Az angiotenzin-konvertáló enzim-gátlók az egyik leggyakrabban alkalmazott gyógyszerek a kardiovaszkuláris megbetegedések kezelésében. Endogén ACE-inhibitorok létezéséről már 1979-ben is beszámoltak, ezek hatásait azonban kevésbé tanulmányozták.

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

Kísérleteinkben megerősítettük, hogy a keringő ACE-aktivitását a humán szérumalbumin nagymértékben gátolja. Új eredményként kimutattuk, hogy (1) a HSA-mediált ACE-gátló hatás fiziológiás körülmények között (pH, Cl^- koncentráció) is létezik *in vitro*; (2) a HSA nagyobb affinitással gátolja az ACE C-terminális aktív centrumát, mint az N-terminális aktív centrumot; (3) a HSA-mediált gátlóhatás az evolúcióban megőrzött tulajdonság; (4) a HSA nemcsak a keringésben lévő ACE-aktivitását gátolja, hanem az endotél sejtek felszínén horgonyzott ACE-ra is gátlóhatással van; (5) a különböző mértékben hígított szérumminták specifikus aktivitásának mérése alkalmas a betegek ACE-gátló kezelésének objektív megítélésére (hatékony-e a terápia?), ezáltal a személyre szabott kezelés megvalósítására.

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

7. Saját közlemények jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/79/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Fagyas Miklós

Neptun kód: NMHRCK

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

Mtmt azonosító: 10037028

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Fagyas, M.**, Uri, K., Siket, M.I., Daragó, A., Boczán, J., Bányai, E., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A.:
New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) I: Endogenous
angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition.
PLoS One. 9 (4), 29 p., 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087843>
IF:3.73 (2012)
2. **Fagyas, M.**, Uri, K., Siket, M.I., Fülöp, G.Á., Csató, V., Daragó, A., Boczán, J., Bányai, E.,
Szentkirályi, I.E., Maros, T.M., Szerafin, T., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A.: New perspectives in
the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) II: Albumin suppresses angiotensin
converting enzyme (ACE) activity in human.
PLoS One. 9 (4), 28 p., 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087844>
IF:3.73 (2012)

További Közlemények

3. **Fagyas, M.**, Uri, K., Siket, M.I., Daragó, A., Boczán, J., Bányai, E., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A.:
New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) III: Endogenous
inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) provides protection against cardiovascular
diseases.
PLoS One. 9 (4), 29 p., 2014.
IF:3.73 (2012)



4. Uri, K., **Fagyas, M.**, Mányiné Siket, I., Kertész, A., Csanádi, Z., Sándorfi, G., Clemens, M., Fedor, R., Papp, Z., Édes, I., Tóth, A., Lizanecz, E.: New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) IV: Circulating ACE2 as a biomarker of systolic dysfunction in human hypertension and heart failure.
PLoS One. 9 (4), 32 p., 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087845>
IF:3.73 (2012)
5. Daragó, A., **Fagyas, M.**, Siket, M.I., Facskó, A., Megyesi, Z., Kalász, J., Galajda, Z., Szerafin, T., Hársfalvi, J., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A., Szentmiklósi, J.: Differences in Angiotensin Convertase Enzyme (ACE) Activity and Expression May Contribute to Shorter Event Free Period After Coronary Artery Bypass Graft Surgery.
Cardiovasc. Ther. 30 (3), 136-144, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00252.x>
IF:2.852
6. Fedor, R., Asztalos, L., Lőcsey, L., Szabó, L., Mányiné, I.S., **Fagyas, M.**, Lizanecz, E., Tóth, A.: Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme predicts left ventricular hypertrophy after renal transplantation.
Transplant. Proc. 43 (4), 1259-1260, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.03.064>
IF:1.005
7. Fedor, R., Asztalos, L., Lőcsey, L., Szabó, L., Mányiné, I.S., **Fagyas, M.**, Lizanecz, E., Tóth, A.: Insertion/Deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme as a risk factor for chronic allograft nephropathy.
Transplant. Proc. 42 (6), 2304-2308, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.05.020>
IF:0.993

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 19.77

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
7.46

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

Debrecen, 2014.04.15

8. Köszönetnyilvánítás:

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

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

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

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

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

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

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

*Ezt a munkát nagy szeretettel ajánlom feleségemnek, Emesének,
és gyermekeimnek, Lillának és Leventének!*