

**AZ ENDOGÉN OUABAIN SZINTJE ÖSSZEFÜGG A HIPERTÓNIÁS
BETEGEK KARDIOVASZKULÁRIS ÁLLAPOTÁVAL**

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

DR. NAGY GÁBOR

A DOKTORI ISKOLA VEZETŐJE: PROF. DR. KOMOLY SÁMUEL

PROGRAMVEZETŐ: PROF. DR. WITTMANN ISTVÁN

TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. WITTMANN ISTVÁN

PROF. DR. WINKLER GÁBOR

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM, ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
II. SZ. BELGYÓGYÁSZATI KLINIKA ÉS NEPHROLÓGIAI CENTRUM

PÉCS, 2012.

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

ABPM: 24-órás vérnyomás monitorozás
ACE-gátló: angiotenzin-konvertáló-enzim-gátló
ACTH: adrenokortikotrop hormon
Aix: augmentációs index
ARB: angiotenzin-receptor-blokkoló
AT II: angiotenzin II
DM: diabétesz mellitusz
DUAL: kettős RAS gátlásban részesült betegek
EDTA: etilén-diamin-tetra-ecetsav
EO: endogén ouabain
ERK: extracellular signal-regulated kinase
HPLC: nagy teljesítményű folyadék-kromatográfia
HT: hipertónia
MONO: ACE-gátlóval kezelt betegek
Pro-BNP: agyi típusú nátriuretikus fehérje
PWV: pulzushullám terjedési sebesség
RAS: renin-angiotenzin-rendszer
RIA: radio immun esszé (radio-immunoassay)
VE: vesebetegség

1. Bevezetés

A digitális klinikai hatása már több mint két évszázada ismert a szívelégtelenség kezelésében. A digitálisok pontos hatásmechanizmusának felderítésében nagy szerepet játszott a „Na⁺-K⁺-pumpa” (Na⁺/K⁺-ATP-áz) felfedezése és működésének megismerése. Korábban feltételezték, hogy a só-függő hipertónia és a volumen-túlterhelődéses állapotokban feltehetőleg egy, a Na⁺/K⁺-ATP-áz működését befolyásoló endogén faktor játszik szerepet. Az 1990-es években először humán plazmából, majd egyéb szövetekből is kimutattak egy a ouabain-nal (növényi szteroid) nagymértékben egyező anyagot, amelynek Na⁺/K⁺-ATP-áz gátló hatása van, és amelynek kémiai szerkezete nagy hasonlóságot mutat a már régóta használt digitálisszal. A disszertációmban a szervezetben termelődő endogén digitálisszerű anyagokkal, ezen belül is az endogén ouabainnal (EO) és annak szerepével foglalkozom.

1.1 AZ ENDOGÉN OUABAIN HATÁSAI

Az endogén ouabain közel két évtizede ismert fiziológiás gátlója a Na⁺/K⁺-ATP-áznak. A gátlás hatására nő az intracelluláris Na⁺-koncentrációja, ami aktiválja a Na⁺/Ca²⁺ cseretranszporter működését, amely végül a sejteken belüli kalciumszint növekedéséhez vezet. Ezen folyamat végeredményeként a szívizomzatban fokozott összehúzódás, az erekben vazokonstrikció jön létre. Ezen régóta ismert hatás mellett azonban felfedezték, hogy az EO Na⁺/K⁺-ATP-ázhoz való kötődése számos jelátviteli út serkentése révén képes simaizom- és fibroblasztsejteket aktiválni, amely így hozzájárul a szívizomzat és az erek átépüléséhez, a hipertónia kialakulásához.

A mellékvesekéregben képződő EO elválasztási ingerének az adrenokortikotrop hormon (ACTH) és az angiotenzin II (AT II) emelkedését, a szimpatikus idegrendszer aktiválódását valamint a só-függő krónikus volumenterhelést tartják. Emellett ismeretes, hogy fizikai terhelésre mind kutyákban, mind emberben az EO szintje rövid időre, többszörösére emelkedik, amely emelkedés gátlható előzetes β-blokkoló és angiotenzin-konvertáló-enzim-gátló (ACE-gátló) adásával. Ez alapján feltételezik a szimpatikus idegrendszer és a renin-angiotenzin-rendszer (RAS) szerepét az EO-elválasztás fokozódásának létrejöttében. Az EO szintjét humán vizsgálatokban szignifikánsan magasabbnak találták kezeletlen hipertóniás betegekben és olyan normotenzív egyéneknél, akik családi anamnézisében hipertónia volt

ismert. Továbbá emelkedett szintjét észlelték többek között primer hiperaldosztionizmusban, Cushing kórban, krónikus veseelégtelenségben, pangásos szívelégtelenségben is. Kevés humán vizsgálatot találtunk azonban a különböző kezelt hipertóniás betegcsoportokban mért plazma- és vizelet-EO szintjéről és annak komplex, kardiovaszkuláris paraméterekkel mutatott összefüggéseiről. Emellett nem találtunk humán vizsgálatból származó irodalmi adatot az EO-szintek és a korai érrendszeri elváltozások markerei (artériás stiffness markerek) között, annak ellenére, hogy a kettő közötti kapcsolatot kísérletes adatok alátámasztják.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1 AZ ENDOGÉN OUABAIN PLAZMA ÉS VIZELETSZINTJÉNEK VÁLTOZÁSAI KÜLÖNBÖZŐ BETEGCSOPORTOKBAN, EZEK KAPCSOLATÁNAK KIMUTATÁSA A KARDIOVASZKULÁRIS PARAMÉTEREKSEL

Az endogén digitálisszerű anyagok szintje ismert, de kezeletlen hipertóniás betegekben emelkedett, azonban kezelt betegekben mért szintje, valamint a kardiovaszkuláris paraméterekkel fennálló kapcsolata ezidáig nem volt ismert.

Az EO által serkentett jelátviteli utak közül az ERK1/2 út oxidatív stressz-el való kapcsolata jól ismert, amely a vaszkuláris rendszert károsítva ateroszklerózist, magas vérnyomást eredményezhet. Mivel a hipertónia, a diabétesz és a vesebetegségek szövődésének progressziójában a fokozott szabadgyök-képződés szerepe jelentős, így ennek mérése különösen fontos a szövődés kialakulása szempontjából. Az oxidatív folyamatok, különösen a hidroxil szabad gyök hatására képződő specifikus markerek (orto- és meta-tirozin) elfogadott jelzői ennek a folyamatnak.

Az EO által elindított oxidatív jelátviteli utak ugyan ismertek, azonban nem található adat arra vonatkozólag, hogy az EO-termelés és az oxidatív stressz markerek (o-tyr) között összefüggés lenne.

- Célul tűztük ki, hogy hipertónia, illetve hipertónia és egyéb társbetegségek egyidejű fennállásakor meghatározzuk az endogén ouabain szintjét mind a plazmában, mind a vizeletben, illetve megvizsgáljuk, hogy a mért EO-szintek a fent említett betegségekben gyakran észlelhető kardiovaszkuláris károsodást jelző paraméterekkel milyen kapcsolatot mutatnak.
- Mélni kívántuk a vizelet és plazma orto-tirozin koncentrációját, valamint a kapcsolatát az EO-val a fent említett állapotokban.

2.2 AZ EGYSZERES ÉS A KETTŐS RAS BLOKÁD HATÁSA A KARDIOVASZKULÁRIS PARAMÉTEREKRE, KÜLÖNÖS TEKINTETTEL AZ EO- ÉS VIZELETALBUMIN-SZINTEKRE

A korábbi vizsgálatok szerint a terhelésre jelentkező EO plazmaszintjének emelkedése ACE-gátló, és β -blokkoló adásával gátolható. Az ACE-gátló kezelés hatása, valamint az AT II-receptor blokkolásának additív hatása az EO-termelés csökkentésére eddig humán vizsgálatokból nem ismert. Az egyszeres és kettős RAS-blokád hatása az albuminürítésre már ismert, azonban a vizelet nem immunreaktív albuminszintjének változása és ennek összefüggései más kardiovaszkuláris paraméterekkel ezidáig nem ismertek.

- Másik vizsgálatunkban vizsgálni kívántuk, hogy az EO-termelés csak az ACE-gátlót szedő, illetve a kettős RAS blokkolóval kezeltékben (ACE-gátló + angiotenzin receptor blokkoló (ARB)) mennyiben különbözik
- Célunk volt felmérni, hogy az EO és a nem immunreaktív vizeletalbumin szintje a két csoportban milyen kardiovaszkuláris paraméterekkel mutatnak összefüggést.

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1. BETEGEK

Első vizsgálatunk lebonyolításához 2007. október és 2008. március között 41 kezelt, hipertóniában szenvedő, felnőtt beteget vontunk be, akik közül 10 csak hipertóniában (HT), 11 hipertóniában és 2-es típusú diabétesz mellituszban (HT+DM), 10 hipertóniában, 2-es típusú diabétesz mellituszban és vesebetegségben (HT+DM+VE), valamint 10 hipertóniában és vesebetegségben (HT+VE) szenved.

Második vizsgálatunkban 35 ismert és gondozott (medián 2,6 év) hipertóniás, vesebeteg vett részt, akiket két csoportra osztottunk aszerint, hogy csak ACE-gátló (MONO-csoport, n=20), illetve ACE-gátló és ARB kezelésben (DUAL-csoport, n=15) is részesültek.

3.2. MÓDSZEREK

Az elvégzett laboratóriumi és kardiovaszkuláris állapotot felmérő eszközös vizsgálatok a két vizsgálatban megegyeztek, így ezek az alábbiakban egységesen kerülnek részletezésre.

3.2.1 PLAZMA ÉS VIZELET ENDOGÉN OUABAIN MEGHATÁROZÁSA

Minden betegnél reggeli 7 és 8 óra között legalább 30 perc szigorú ágynyugalom után fekvő testhelyzetben 6 ml vért vettünk EDTA-s csőbe. A csöveket ezután 4°C-on 10 percig 3000g-n centrifugáltuk, a felülúszót leszívtuk és a mintákat a végső feldolgozásáig -20°C-on tároltuk. 24 órás gyűjtött vizeletből ugyanazon reggelen 10ml-t kivettünk és ugyancsak a feldolgozásig -20°C fagyasztva tároltuk.

A minták meghatározása radio-immunoassay (RIA) segítségével (Ouabain ¹²⁵I RIA kit; Biotop OY, Medipolis Center, Oulu, Finland) történt. Minden mintát kétszer mértünk és azok átlagaival számoltunk.

3.2.2 VIZELET-KATEKOLAMIN- ÉS SZÉRUM-PRO-BNP-SZINT MEGHATÁROZÁS

A reggeli friss vizelet-katekolamin (adrenalin, noradrenalin, dopamin) meghatározása BIO-RAD Clinical HPLC System (BIO-RAD Laboratories, Inc., France) segítségével történt. A savanyított vizeletet Analytical Micro-GuardTM Cartridges segítségével előkészítettük, majd ebből az oldatból 20µl-t kimértünk és HPLC-s elektrokémiai detektorral (Model 1340C) 0,55mV-on határoztuk meg a hormonok mennyiségét. A kapott értéket a reggeli vizelet kreatinin szintjével korigáltuk.

A szérum N-terminális pro-brain type natriuretic peptide (BNP), röviden pro-BNP szintjét teljesen automatizált ElecsysTM rendszerrel (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) mértük.

3.2.3 ORTO-TIROZIN MEGHATÁROZÁSA

Gyűjtött vizeletből és friss heparinizált plazmából 250 µl kimértünk, majd a kimért mintákat jégben tartottuk. A mintákhoz 125 µl 60%-os triklórecetsavat adtunk, majd a mintákat összeráztuk és 30 percig jégen tartottuk, hogy a fehérjetartalma kicsapódjon. Ahhoz, hogy a kicsapódott fehérjetartalmat el tudjuk távolítani, a mintákat 10 percig 15.000-es fordulatszámom, Eppendorf csőben centrifugáltuk. A felülúszót átnyomtuk egy 0,2 µm-es szűrővel ellátott fecskendőn (Millipore, Billerica, MA, USA), majd a szűrt mintából manuálisan úton 20 µl-t injektáltunk a HPLC készülékben.

A minták analízálásához Shimadzu Class LC-10 ADVP HPLC rendszert (Shimadzu USA Manufacturing, Inc., Canby, OR, USA) használtunk, melyhez egy Shimadzu RF-10 AXL típusú fluoreszcens detektor (Shimadzu USA Manufacturing, Inc.) csatlakozott. Az aminosavakat (p-, m-, o-tyr, fenilalanin-Phe) saját fluoreszcens tulajdonságuk alapján tudtuk mérni, a tyr izoformákat 275 nm hullámhosszú fényel gerjesztettük, és 305 nm-nél mértük az emissziót, míg a Phe esetén 258 nm hullámhosszon gerjesztettük és a 288 nm-nél mértük az emissziót. Az analízishez egy Licrospher C-18 ODS típusú oszlopot használtunk, amelyhez mobil fázisként 1%-os ecetsav vizes oldatát és 1%-os nátrium acetátot alkalmaztunk. Standardizálás és kalibrálás után, a görbe alatti területek nagyságából számítottuk ki a vizsgált aminosavak pontos koncentrációját.

3.2.4 VIZELETALBUMIN MEGHATÁROZÁSA

A huszonnégy-órás gyűjtött vizeletmintákat 10 percig 2500g centrifugáltuk, majd a felülúszót 2 részre osztottuk. Az egyik részből a vizeletalbumin koncentrációját rutin immun-turbidimetriás módszerrel, Roche/Hitachi 812 Modular P analyser segítségével (szenzitivitás: 3 mg/l, intra-assay pontosság 1,3% és 1,7%, inter-assay pontosság 4,3% és 2,6%, linearitás: 3-3000 mg/l, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) határoztuk meg.

A vizelet felülúszó másik részéből az albumin meghatározásához nagy teljesítményű folyadék kromatográfiát (high performance liquid chromatography - /HPLC/) végeztünk a minta vételét követően néhány napon belül (a feldolgozásig a mintákat -20°C-on tároltuk). A HPLC mérésekhez AccuminTM kitet használtunk (Accumin Diagnostics Inc., New York, NY, USA). A nem immunreaktív albumin mértékét a HPLC-s módszerrel és az immun-turbidimetriás módszerrel meghatározott szintek közötti különbségből számítottuk.

3.2.5 ECHOKARDIOGRÁFIA, KAROTISZ RUGALMASSÁG (STIFFNESS) MEGHATÁROZÁSA, 24 ÓRÁS VÉRNYOMÁS MONITOROZÁS

A szív transztorakális ultrahang vizsgálata, valamint a karotis rugalmasság (stiffness) mérése Aloka SSD 5500 (Aloka, Aloka Co. Ltd, Tokyo) típusú készülékkel 3.5 MHz-es (szív), valamint 10MHz-es (karotis stiffness) transzducerrel történt. Minden vizsgálatot ugyanabban az időben (reggel 7.30 és 8.30 között), a vér- és vizeletminták, valamint az ABPM készülék levétele után végeztünk. Minden vizsgálatot ugyanaz a kardiológus végzett, aki előzetesen

nem ismerte a betegek állapotát. A vizsgálatokat az American Society of Echocardiography által kiadott protokoll alapján végeztük.

A karotiszok állapotát az un. echo-tracking módszerrel vizsgáltuk a jobb oldali karotisz kommuniszokon. Ennek kivitelezése során EKG görbéhez igazított pulzushullám-detektálás és -értékelés történt, amelyből a készülék számolta ki a további paramétereket. A pulzushullámok terjedési tulajdonságai alapján β -stiffness indexet (β), pulzushullám terjedési sebességet (PWV), és augmentációs indexet (Aix) mértünk.

A 24-órás vérnyomás-monitorizálás végzésére ABPM-04 típusú (Meditech, Meditech Ltd., Budapest, Hungary) oszcillometriás elven működő készüléket használtunk, ami napközben 15 percenként, éjszaka 30 percenként regisztrálta a vérnyomás értékeket.

A számított paraméterek (artériás középnyomás, hipertenzív időindex) az ABPM-04 mérőműszerhez készített szoftver segítségével határoztuk meg.

3.2.6 STATISZTIKAI ANALÍZIS

Az adatokat átlag és szórás, illetve medián és interkvartilis tartomány segítségével tüntettük fel, függően a változók normális vagy nem normális eloszlásától. A folytonos változók normális eloszlását először Kolmogorov-Smirnov teszttel elemeztük, amely után a normális eloszlást mutató adatokat 2 mintás T próbával, ANOVA analízissel, a nem normális eloszlást mutató adatokat Mann Whitney U teszttel hasonlítottuk össze. A nem folytonos változók vizsgálatára Khi- négyzet próbát alkalmaztunk. Az összefüggéseket - eloszlástól függően- Pearson vagy Spearman típusú korrelációval határoztuk meg. Többváltozós elemzésre stepwise típusú lineáris regressziót használtunk. *Második vizsgálatunkban* egyes paraméterek esetén a csoportok között különbségeket HbA_{1c}-re, bal kamrai végszisztolés átmérőre és térfogatra, valamint a bal kamrai ejekciós frakcióra korrigáltuk „univariate general linear model” segítségével. Az analízist SPSS 13.0-as (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) szoftverrel végeztük, szignifikánsnak $p < 0,05$ esetén tekintettük az eredményeket.

4. EREDMÉNYEK

Első vizsgálatunkban a legmagasabb plazma-EO-szintet ($19,7 \pm 9,5$ pmol/l) a HT+DM+VE csoportban találtuk, amely szignifikánsan ($p=0,046$) nagyobb volt - a korral való korrekció után is-, mint a HT+VE csoportban.

A napi vizelet-EO-ürítésben, valamint az EO-klírenszenben a csoportok között különbség nem mutatkozott. A HT+VE csoportban az EO frakcionált exkréciója (31,2%) szignifikánsan magasabb volt, mint a HT (14,3%) és a HT+DM (11,5%) csoportban.

A csoportok között a nappali, valamint az éjszakai szisztolés, diasztolés és az artériás középnyomás, valamint ezen paraméterek hipertóniás időindexének és diurnális indexének tekintetében nem volt különbség. A csoportok átlagos vérnyomás értékei alapján a betegek célértékre kezeltek voltak. Az echokardiográfia, valamint az érfali merevség paramétereinek vonatkozásában sem találtunk a csoportok között különbséget.

Az összes beteget együtt vizsgálva a plazma-EO szignifikáns korrelációt mutatott számos éjszakai vérnyomás paraméterrel, így az éjszakai szisztolés ($p=0,014$), diasztolés ($p=0,029$), középnyomással ($p=0,009$), valamint ezen paraméterek hipertenzív idő indexeivel is. A EO-termelés és az éjszakai vérnyomásértékek közötti kapcsolat feltehetően az emelkedett éjszakai/hajnali szimpatikus tónusból adódhat, mivel a reggeli vizelet-katekolamin (noradrenalin) és EO-szintek korreláltak ($R=0,396$, $P=0,011$).

Az összes beteg adatait elemezve szignifikáns kapcsolatot találtunk a vizelet-EO szintje és karotiszon mért pulzushullám terjedési sebesség (PWV) valamint a β -stiffness között ($P=0,023$ és $P=0,009$).

Az éjszakai artériás középnyomás független prediktorának a plazma-EO ($p=0,004$), a karotisz artéria β -stiffness prediktorának pedig a vizelet-EO ($p=0,011$) bizonyult. Az endogén ouabain frakcionált exkréciója a vesebeteg csoportokban magasabb volt és értéke korrelációt mutatott az éjszakai artériás középnyomással ($R=-0,361$; $P=0,028$), valamint a szív végszisztolés ($R=0,345$; $P=0,029$) és végdiasztolés ($R=0,356$; $P=0,024$) átmérőjével.

Az EO frakcionált exkréciója is szoros összefüggést mutatott a karotisz PWV valamint a β -stiffness értékével a HT+DM csoportban.

A HT+DM+VE csoportban összefüggést találtunk a plazma-EO és a szív diasztolés diszfunkciója ($R=-0,665$, $p=0,036$) és valamint több éjszakai vérnyomás paraméter között.

A vizelet o-tyr szintje a vizsgált csoportokban nem különbözött szignifikánsan egymástól, azonban a plazma o-tyr szint szignifikánsan magasabb volt a HT+DM+VE és a HT+VE csoportban, mint a HT csoportban ($P=0,028$ és $P=0,04$). A plazma o-tyr szintje a – vesefunkciós értékekkel mutatott negatív összefüggésének kivételével – nem mutatott jelentős összefüggést az EO-plazmaszintekkel sem az összpapulációban, sem a csoportokban. Az o-tyr plazma- és vizeletszintje a vizsgált kardiovaszkuláris paraméterrel nem mutatott összefüggést.

Második vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a plazma- és vizelet EO szintjei a MONO- és a DUAL csoportban nem különböznek szignifikánsan egymástól. A betegek kardiovaszkuláris paraméterei néhány echokardiográfiai paraméter kivételével - ejekciós frakció, végszisztolés átmérő és térfogat - nem különböztek a két csoportban. A laboratóriumi értékekben - a pro-BNP kivételével - szintén nem találtunk különbséget a két csoport között.

A plazma-EO szintje korrelált számos éjszakai vérnyomás paraméterrel, így a szisztolés vérnyomással ($R=0,512$, $P=0,049$), vagy az artériás középnyomással ($R=0,541$ $P=0,038$) a MONO-csoportban. Szintén csak a MONO-csoportban a vizelet-EO a karotison mért pulzushullám terjedési sebességgel ($R=0,621$ $P=0,005$) és a β -stiffness ($R=0,681$ $P=0,001$) értékével mutatott szignifikáns összefüggést. A DUAL-csoportban ezeket a korrelációkat nem találtuk meg.

A különböző módszerekkel történő vizelet albumin meghatározások során azt találtuk, hogy a nem immunreaktív albumin szoros összefüggést mutatott a szív diasztolés diszfunkciójával ($R=-0,492$ $P=0,028$), a diasztolés vérnyomás diurnális index-el ($R=-0,540$ $P=0,014$) a MONO-csoportban, ellenben a kettős RAS-gátlóval kezelt betegek között a nem immunreaktív vizeletalbumin csak a plazma-EO-val ($p=0,014$) korrelált.

5. MEGBESZÉLÉS ÉS KONKLÚZIÓK

Az EO és a vérnyomásértékek összefüggése már régóta ismert kezeletlen hipertóniás betegeken végzett vizsgálatokból, kezelt hipertóniás betegeken azonban nem ismertek adatok az EO-szintek és a kardiovaszkuláris állapot mutatóinak kapcsolatáról. A vizsgálat lefolytatásakor törekedtünk arra, hogy az EO-mintavételek és a vizsgálatok (echokardiográfia, ABPM, artériás stiffness meghatározása) azonos időpontban, rövid időn belül (reggel 7.30-8.30 között), azonos körülmények között megtörténjenek. Így egyrészt kiküszöböltük az

eddig nem ismert cirkadián ritmusból adódó eltéréseket, másrészt képet kaptunk a reggeli kardiovaszkuláris állapotról, amely különösen jelentős időszak az akut szív- és érrendszeri történések szempontjából. **Első vizsgálatunkban** a legmagasabb plazma-EO-szintet a HT+DM+VE csoportban mértük, amely nem meglepő, hiszen a korábbi irodalmi adatok is azt sugallták, hogy a társbetegségek számának növekedésével az EO szintje is potenciálisan együtt emelkedik. Irodalmi adatok szerint az ugyanezen metodikával mért plazma-EO szintje egészséges embereken 9-12 pmol/l között mozgott. Vizsgálatunkban ennek átlagos szintje $14,7 \pm 5,7$ pmol/l volt, annak ellenére, hogy a betegek RAS-ra ható és β -blokkoló gyógyszert szedtek, amelyek csökkentik az EO-termelést. Az EO plazmaszintje vizsgálatunkban alacsonyabb volt, mint más vizsgálatokban, azonban a kapott eredmények nehezen hasonlíthatók össze az eltérő típusú ellenanyagok és metodika miatt.

Eredményeink alapján a plazma-EO szintje szoros összefüggést mutat az éjszakai vérnyomás-paraméterekkel, így felmerül a szerepe a magasabb éjszakai vérnyomás kialakulásában/fenntartásában.

Az EO frakcionált exkréciója a veseelégtelen csoportokban magasabb volt, mint a nem vesebeteg csoportokban; az EO frakcionált exkréciója azonban minden csoportban lényegesen nagyobb volt, mint amennyit egy korábbi vizsgálatban, egészséges férfiakban találtak (11,5-31,2 versus 2%). Ez felveti a lehetőségét annak, hogy a vese nagy szerepet játszik az EO szintjének szabályozásában.

Az EO szerepet játszik a magasvérnyomás kialakításában azáltal, hogy növeli a szimpatikus tónust, direkt pro-hipertrofikus hatást fejt ki a szívizomzaton és az erek simaizomzatán, valamint kardiomiopátiát okoz kísérletes körülmények között.

Vizsgálatunkban a reggeli noradrenalin szintje pozitív összefüggést mutatott a vizelet-EO-szintjével, amely megerősíti a feltevést, amely szerint az EO hatása a szimpatikus tónus befolyásolása által is érvényesül. Egy végstádiumú vesebetegek körében végzett korábbi vizsgálatban a plazma-EO-szint és számos bal kamrai paraméter összefüggést mutatott. Jelen vizsgálatunkban a HT+DM+VE csoport plazma-EO-szintje és a bal kamra diasztolés diszfunkciója között találtunk szignifikáns kapcsolatot, amely megerősíti azon feltételezést, hogy az EO hozzájárul a kardiális hipertrófia kialakulásához vesebetegekben.

Az endogén digitálisanyagok hatása hosszabb távon érfali merevséget okoz, amely magyarázhatja a vizsgálatunkban talált összefüggést az EO szintek és a karotiszokon mért érfali merevség között. Az EO megváltozott kiválasztása az érfali merevség kialakulásában szerepet játszik, ugyanis a többváltozós elemzésben a karotisz β -stiffness független prediktora lett. Ez egy újabb komponens lehet a csökkent vesefunkció és az artériás stiffness kialakulása

között. Eredményeink alapján az EO szintje jól használható markere hipertóniában szenvedő betegeknél a célszervkárosodás mértékének megállapítására.

Az irodalomban számos tanulmány számol be szignifikáns összefüggésekről az oxidatív stressz markerek szintjei, valamint a különböző kardiovaszkuláris paraméterek között. Mindezek mellett az is ismert, hogy bizonyos gyógyszerek, mint az ARB-k, az alfa- és béta-receptor-blokkolók csökkentik az oxidatív markerek szintjét hipertóniás egyénekben.

Mivel az endogén digitálisok hatással vannak a sejten belüli szabad gyökök képződésére, ezek alapján azt feltételeztük, hogy az EO és a hidroxil szabadgyök-marker (o-tyr) szintje is összefüggést mutat. Eredményeink szerint nem találtunk kapcsolatot a plazma és vizelet o-tyr szintje és az EO-szintek között sem az összpopulációban, sem a többi csoportban. Egy korábbi vizsgálatunkban szignifikánsan magasabb vizelet o-tyr-szintet mértünk diabetészes és vesebetegek körében, mint egészséges kontrollokban, azonban az o-tyr szintjeinek összefüggéseit a különböző kardiovaszkuláris paraméterekkel nem vizsgálták. Jelen vizsgálatunkban nem találtunk direkt összefüggést az o-tyr és a vérnyomás-paraméterek, valamint a kardiovaszkuláris károsodások egyéb paraméterei között sem az összpopulációban, sem a csoportokban. A plazma-o-tyr szintje vizsgálatunkban kizárólag a vesefunkcióval mutatott összefüggést, ami alátámasztja korábbi feltételezésünket, amely szerint az o-tyr szint egyik fő regulátora lehet a vese. Az EO és az oxidatív stressz marker, o-tyr közötti direkt összefüggés hiányának oka, hogy az o-tyr plazmaszintjét nagy valószínűséggel a vesefunkció, a betegek kezelése és bizonyos csoportokban a diabétesz mellitusz megléte is befolyásolhatta.

A RAS blokkolókat évtizedek óta használják mind anti-hipertenzív hatásuk, mind a célszervkárosodást csökkentő hatásuk miatt. Több multicentrikus, randomizált vizsgálat elemezte, a kettős RAS-gátlás esetleges kedvezőbb hatásait a kardiovaszkuláris mortalitásra, morbiditásra és a célszervkárosodások csökkentésére az egyszeres RAS-gátlással szemben. Hasonló felmérést végeztünk **második vizsgálatunkban**, ahol a kombinációs (DUAL) és nem kombinációs (MONO) RAS-gátlás hatását vizsgálatuk több éve kezelt hipertóniás betegeken, olyan paraméterekre (EO, nem-immunreaktív vizeletalbumin) is fókuszálva, amelyekről ezidáig kevés információval rendelkezünk.

Az EO szintje, amely egy új marker a kardiovaszkuláris állapot meghatározásában, a két csoportban nem különbözött. Az EO szintje összefüggést az éjszakai vérnyomás értékekkel és az érfali merevséggel csak a MONO-csoportban mutatott.

A bal kamrai paraméterek és az ejakciós frakció azonban szignifikánsan jobbnak bizonyult a

DUAL-csoportban, mint a MONO-ban, valamint a pro-BNP-szint a DUAL-gátlás hatására szignifikánsan alacsonyabb volt, amely jobb kardiális kimenetelre utalhat. Az echokardiográfiás eltérések feltételezésünk szerint nem magyarázhatóak az eltérő szimpatikus aktivitással, valamint ennek a gátlásával, mivel a vizelet-katekolamin szintje, valamint a β -blokkoló használat gyakorisága a két csoportban hasonló volt. Jelen megfigyelésünk - a csak MONO-csoportban talált korrelációkra alapozva - azt sejteti, hogy habár az EO szintje nem csökken jobban DUAL-gátlás hatására, azonban valószínűleg csökkenti azon intracelluláris utak aktivitását, amelyek szívizomzat hipertrófiát okoznak. Bár a kettős RAS-gátlást az érfali rugalmasság megőrzése szempontjából hatékonyabbnak gondolhatnánk, mint az egyszeres gátlást, az irodalmi adatok alapján azonban a kardiovaszkuláris mortalitásban nem látható előny.

A vizeletalbumin-ürítés pontos meghatározása fontos számos betegség kezelésében. A vizelet-albuminnak két formája ismert, amelyeket immunológia módszerekkel való kimutathatóságuk alapján immunreaktív és nem immunreaktív albumincsoportra oszthatunk. Az ún. összes (immun-reaktív és nem immunreaktív együtt) albumin legpontosabban HPLC-vel határozható meg. Számos, a klinikumban használt metodikával (RIA, IN, IT) csak az immunreaktív forma határozható meg. Vizsgálatunkban mindkét albumin mennyiségét és azok korrelációit elemeztük MONO és DUAL RAS-gátló kezelésben részesülő betegek körében. Mivel a kettős blokádnak hatását az immunreaktív albuminszintre már ismerjük, így az eddig kevésbé vizsgált nem immunreaktív albuminra összpontosítottunk.

Eredményeink azt mutatták, hogy a vizeletalbumin szintje magasabb volt a HPLC-s módszerrel mérve, mint immun-turbidimetriával és a HPLC-vel meghatározott szintje korrelált számos kardiovaszkuláris paraméterrel (vérnyomás és diasztolés diszfunkció) a MONO-csoportban; míg a DUAL-csoportban csak a plazma-EO szintje korrelált a totál és a nem immunreaktív albuminnal. Az immunreaktív vizelet-albuminnal egyik paraméter sem mutatott összefüggést. Vizsgálatunkban a vizeletalbumin szintje a normális tartományban volt, ami azt mutatja, hogy a betegek kezelése megfelelő volt, azonban az ürülő összes albumin nagyobb része nem immunreaktív formában távozott. A nem immunreaktív albumin természete és képződése azonban napjainkban sem ismert pontosan.

TÉZISEK

1. Az EO-szint jól használható markere a kardiovaszkuláris károsodásnak kezelt hipertóniás, illetve társbetegséggel rendelkező hipertóniás betegekben.
2. Az EO plazmaszintje a társbetegségekkel (diabétesz mellitus és vesebetegség) rendelkező hipertóniásokban magasabb.
3. Az EO szintje korrelál az érfali merevség mértékével.
4. Az EO jól korrelál az éjszakai magas vérnyomással, feltehetőleg a szimpatikus idegrendszer aktivitásának fokozásán keresztül.
5. A hidroxil szabadgyök-marker o-tyr nem mutat összefüggést az EO-szintekkel kezelt hipertóniásokban.
6. Az o-tyr plazmaszintjének egyik fő regulátora a vese.
7. Az EO plazma- és vizeletszintje nem csökkenthető jobban az ACE-gátló mellé adagolt ARB-vel.

A SZERZŐ PUBLIKÁCIÓI

Kumulatív impakt faktor: közlemények és tudományos levél: 19,003, absztraktok: 80,611

A téziszhez felhasznált kumulatív impakt faktor: közlemények: 3,676, tudományos levél: 6,614

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények és előadások

I. Teljes közlemények

1. Selective association of endogenous ouabain with subclinical organ damage in treated hypertensive patients.

Nagy G., Gaszner B, Lányi E, Markó L, Fehér E, Cseh J, Kőszegi T, Betlehem J, Sulyok E, Cziráki A, Wittmann I. *J Hum Hypertens.* 2011;25(2): 122-129. **IF 2010: 2,176**

2. Effect of mono and dual blockade of the renin-angiotensin system on the markers of cardiovascular status in hypertensive patients with mild and moderate renal failure

Gábor Nagy, István A. Szijártó, Balázs Gaszner, Éva Lányi, Lajos Markó, Ákos Mérei, Gergő A. Molnár, Kinga Németh, József Betlehem, István Wittmann
Kidney and Blood Pressure Research 2011;34(3): 150-157. **IF 2010: 1,500**

3. Az endogén ouabain összefügg a hipertóniás betegek kardiovaszkuláris állapotával

Nagy G., Gaszner B, Lányi E, Markó L, Fehér E, Cseh J, Kőszegi T, Betlehem J, Sulyok E, Cziráki A, Wittmann I.
Magyar Belorvosi Archívum 2010;63(6):435-442.

II. Tudományos levél

1. Nighttime activity influences the evaluation of ambulatory blood pressure monitoring. In response to Agarwal R, Light RP, Bills JE, Hummel LA. *Hypertension.* 2009;54:646-651.

Nagy G., Nagy CB *Hypertension* 2009;54 (6) e139. **IF 2009: 6,614**

III. Idézhető absztrakt

1. Endogén ouabain és a szubklinikai szervkárosodások kapcsolata hipertóniás vesebetegekben

Nagy Gábor, Gaszner Balázs, Mérei Ákos, Lányi Éva, Markó Lajos, Cseh Judit, Sulyok Endre, Betlehem József, Cziráki Attila, Wittmann István
Magyar Nephrologiai Társaság Nagygyűlése 2009. szeptember 17-19. Siófok
Hypertonia és Nephrologia, 2009.13 (S1) 39-39.

2. Hidroxil szabadgyök-termelés hipertóniás veseelégtelen betegekben

Nagy Gábor, Gaszner Balázs, Lányi Éva, Markó Lajos, Molnár A. Gergő, Betlehem József, Wittmann István
Magyar Nephrologiai Társaság Nagygyűlése 2010. október 21-23. Szeged
Hypertonia és Nephrologia, 2010.14 (S1) 27-27.

**SELECTIVE ASSOCIATION OF ENDOGENOUS OUABAIN WITH
SUBCLINICAL ORGAN DAMAGE IN HYPERTENSIVE PATIENTS**

PHD THESES

GÁBOR NAGY MD

HEAD OF THE DOCTORAL SCHOOL: PROF. DR. SÁMUEL KOMOLY MD, DSC

HEAD OF THE PROGRAM: PROF. DR. ISTVÁN WITTMANN MD, PHD

SUPERVISOR: PROF. DR. ISTVÁN WITTMANN MD, PHD

PROF. DR. GÁBOR WINKLER MD, DSC

UNIVERSITY OF PÉCS, FACULTY OF MEDICINE

2ND DEPARTMENT OF MEDICINE AND NEPHROLOGICAL CENTER

PÉCS, HUNGARY

2012

Abbreviations

ABPM: ambulatory blood pressure monitoring
ACE-inhibitor: angiotensin-converting enzyme inhibitor
ACTH: adrenocorticotrop hormone
Aix: augmentation index
ARB: angiotensin receptor blocker
AT II: angiotensin II
CKD: chronic kidney disease
DM: diabetes mellitus
DUAL: patients treated with dual RAAS blockers
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
EO: endogenous ouabain
ERK: extracellular signal-regulated kinase
HPLC: high performance liquid chromatography
HT: hypertension
MONO: patients treated with ACE inhibitors
Pro-BNP: pro-brain type natriuretic peptide
PWV: pulse wave velocity
RAS: renin-angiotensin-system
RIA: radio-immunoassay

Introduction

The clinical effects of digitalis have been known for more than two centuries in the treatment of congestive heart failure. The investigation and function of the sodium- potassium pump (Na/K ATP-ase) had a great role in appraisal of the pathomechanism of digitalis. It was suspected earlier that an endogen factor modifies the activity of Na/K ATP-ase in the salt-dependent hypertension and fluid-expansion conditions. In 1990s, many investigators have reported extraction of a material from blood and other tissue sources similar to ouabain, and its chemical structure is similar to digitalis. This introduction and thesis aimed to give a short overview about endogenous digitalis like factors, especially endogenous ouabain, and its role in human diseases.

1.1. Effect of endogenous ouabain

For twenty years endogenous ouabain (EO) is known as a physiologic regulator of the activity of sodium/potassium pump (Na^+/K^+ ATPase) which blocking increases intracellular calcium level by the activation of the sodium-calcium exchanger. The increased concentration of intracellular calcium causes an enhanced contraction in the heart muscle and vasoconstriction in the vascular system. Beyond the classical effects of EO, the digitalis-like factors have genomic effects inducing hypertrophy in myocardial and vascular smooth muscle cells due to the activation of numerous known intracellular signaling pathways. This activation results in hypertension and rigidity of arterial wall. The background of cardiovascular damage in diabetes mellitus and chronic kidney disease are not entirely known, the role of EO in pathogenesis of this process is also suggested. Previous studies have shown that EO is mostly produced in the adrenal cortex due to the increased level of adrenocorticotrop hormone (ACTH) and angiotensin II (AT II), and in addition to sympathetic activation and salt-dependent fluid expansion. During physical exercise, the level of EO was increased for a short time in both human and dogs; this increase could be reduced by previously receiving beta-blockers and angiotensin converting enzyme inhibitor (ACE-I). Based on this observation, the roles of sympathetic nervous system activation and renin-angiotensin-system (RAS) are suggested in the development of enhanced EO secretion. Level of EO was significantly increased in untreated patients with hypertension and normotensive offspring of hypertensive patients. The level of EO was also raised in patients with primary hyperaldosteronism,

Cushing disease, chronic renal failure, congestive heart failure compared to the controls. There is little information about correlation between the levels of plasma, urinary EO and the parameters of a complex cardiovascular examination in treated human hypertensives with comorbidities (diabetes mellitus, chronic kidney disease). Besides this, we have not found literature data about relations between levels of EO and markers of early vascular damage (arterial stiffness) nevertheless these relations are underlined by experimental data.

The level of EO is elevated in patients with untreated hypertension, but the levels of EO in treated hypertensives, and their associations with different cardiovascular parameters is not known. Endogenous ouabain enhances some intracellular signaling pathways, especially ERK 1/2 pathway, which closely associates with oxidative stress. This process may damage the vasculature, which produces atherosclerosis and high blood pressure. In the progression of worsen outcome of hypertension, diabetes mellitus and renal disease have a major role of the enhanced production of free radical, so that the measurement of this marker is important in the detection of complications of these diseases. Oxidative marker, especially the production of hydroxyl free radical modified amino acid (ortho-tyrosine) is high-quality marker of this process. The EO stimulated oxidative intracellular pathways are known, however there are no information about the correlation between the EO secretion and oxidative markers in human.

According to earlier studies the elevated EO level due to the physical movement were blocked with administration of ACE inhibitor and β -blockers. Effect of ACE inhibitors is known, but additive effect of further AT receptor blockers on EO secretion is not identified yet in human. The additive effect of AT II inhibitor added to the ACE inhibitor therapy (dual RAS blockade) in context to the reduction of EO secretion is not known in human. Results of mono and dual RAS blockade on urinary albumin excretion is well known in human, but the immuno-unreactive urinary albumin and its correlations with cardiovascular status were not studied earlier.

2. Aims

2.1. Levels of plasma and urinary endogenous ouabain in different study groups, and its relations with cardiovascular markers

- Aims of the study were to measure the concentration of plasma and urinary EO in only hypertensive patients and hypertensives with other diseases (type 2 diabetes mellitus, chronic renal disease). As well as we studied correlation of the measured EO levels

and diastolic dysfunction of the patients' heart, and arterial rigidity, which often correlates with these conditions.

- We also studied the relations between the concentrations of plasma, urinary ortho-tyrosine -which are relevant markers of production of hydroxyl free radicals- and EO levels.

2.2 Effects of Mono and dual RAS blockade on cardiovascular parameters, especially on levels of EO and urinary albumins

- In another study we hypothesized that EO production is reduced if the patients are treated with dual (ACE-I and AT II inhibitor) RAS blockers compared with mono RAS blockers (only ACE inhibitor, which has proved reducing effect on the EO production), and we examined their relating effect on the patients' cardiovascular parameters.
- Our aims were to look for correlations between the levels of EO, urinary albumin and cardiovascular parameters in the two groups.

3. Patients and methods

3.1 Patients

In our first cross-sectional clinical study 41 treated, adult patients were investigated, who were divided into 4 groups: (1) group of primary hypertensive, non-diabetic patients without chronic kidney disease (HT, N=10); (2) group of hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus (HT+DM, N=11); (3) group of hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus and chronic kidney disease (HT+DM+CKD, N=10); (4) group of hypertensive patients with chronic kidney disease (HT+CKD, N=10).

In another cross-sectional clinical study 35 adult, hypertensive patients with mild and moderate renal failure were investigated. Retrospectively, these patients received either mono- or dual blockade of the RAS. In the MONO-group patients were treated with ACE inhibitor, (N=20); in the DUAL-group patients were treated with ACE inhibitor plus ARB, (N=15) for more than 2 years (median 2.6 years).

3.2 Methods

Most of the laboratory and other cardiovascular methods were similar in the two clinical studies, thus the description of methods are summarized below in an integrated form.

3.2.1. Plasma and urinary endogenous ouabain determination

From all patients 6 ml blood was collected from cubital vein into EDTA tubes between 7-8 a.m. after at least 40 minutes strict supine position. Then tubes were centrifuged with 3000xg within 10 minutes, and plasma was separated and transferred into plastic tubes and stored at -20°C until assayed. Ten milliliters of urinary samples were taken out of 24-h collected urine and were stored at -20°C. Plasma and urinary EO levels were determined by radioimmunoassay (RIA) with Ouabain ¹²⁵I RIA kit (Biotop OY, Medipolis Center, Oulu, Finland). All samples were measured in duplicates.

Urinary catecholamine and serum pro-BNP measurements

The morning urinary catecholamines (epinephrine, norepinephrine and dopamine) were measured by BIO-RAD Clinical HPLC System (BIO-RAD Laboratories, Inc., France). Briefly, the acidified urinary samples were prepared by Analytical Micro-Guard™ Cartridges and 20µl prepared samples were analyzed by HPLC with Model 1340C Electrochemical Detector (at 0.55mV). Urinary catecholamine/ creatinine (assessed by Jaffe methods) ratios were calculated. The results were corrected with urinary creatinine.

Serum pro-BNP levels were measured on fully automatized (Elecsys™ 2010) system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), which is an electrochemiluminescent sandwich immunoassay using two polyclonal antibodies directed at the NTpBNP molecule.

O-tyrosine measurement

Briefly, from the 24-hour collected urine or freshly obtained fasting heparinized plasma samples, aliquots of 250 µL were taken and handled on ice. One hundred and twenty-five microliters of 60% trichloroacetic acid was added to the samples, vortexed, and incubated 30 minutes on ice to precipitate protein content. To remove the precipitate, samples were then centrifuged at 15,000 rpm for 10 minutes in Eppendorf tubes. The supernatant was filtered through a 0.2 µm syringe filter (Millipore, Billerica, MA, USA), and 20 µL was injected into the manual injector of the high-performance liquid chromatography (HPLC) device.

The analysis was performed using a Shimadzu Class LC-10 ADVP HPLC system (Shimadzu USA Manufacturing, Inc., Canby, OR, USA) equipped with a Shimadzu RF-10

AXL fluorescent detector (Shimadzu USA Manufacturing, Inc.). The amino acids (p-, m-, o-Tyr, Phe) were measured upon their autofluorescence, the Tyr isoforms at 275 nm excitation and 305 nm emission wavelengths, while Phe at 258 nm excitation and 288 nm emission wavelengths. The analysis was performed using a Licrospher C-18 ODS column, in an isocratic run using an aqueous solution of 1% acetic acid and 1% sodium-acetate as the mobile phase. External standard calibration and measurement of areas under the curve were used to calculate the exact concentrations of the investigated amino acids.

Urinary microalbumin measurements

Twenty-four hours collected urine samples were vortexed and centrifuged (10 min, 2500xg). Supernatants were divided into two portions. One portion was used to detect urinary albumin concentration by immunoturbidimetry using a Roche/Hitachi 812 Modular P analyser (sensitivity: 3 mg/l, intra-assay precision 1.3% and 1.7%, inter-assay precision 4.3% and 2.6% respectively, linearity: 3-3000 mg/l, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The other portion was used for high performance liquid chromatography (HPLC) analysis straightaway or in a few days (after storage at -20°C). For HPLC measurements the FDA approved AccuminTM kit (Accumin Diagnostics Inc., New York, NY, USA) was used.

Amount of immuno-unreactive albumin was calculated as the difference of HPLC and immunoturbidimetry measured urinary albumin.

Echocardiography, echo-tracking examination of arterial stiffness and ABPM

Echocardiograms were recorded with an Aloka SSD 5500 (Aloka, Aloka Co. Ltd, Tokyo) ultrasound imaging system equipped with a 3.5 MHz transducer. All patients were assessed by the same cardiologist and examined within one hour (between 7.30-8.30 a.m.) after EO samples collecting and ABPM taking off. Before echocardiography and echo-tracking all patients were supine position at least for 5 minutes. Operators were blinded to the status of the patients. The measurements of echocardiography were assessed according to the American Society of Echocardiography guidelines. Arterial stiffness parameters as the β stiffness index (β), pulse wave velocity (PWV), and augmentation index (Aix) were assessed by the characteristics of pulse wave intensity using echo-tracking system (Aloka SSD-5500, Aloka Co. Ltd, Tokyo) with a 10 MHz linear array probe. We used the right common carotid arterial diameter change waveforms to obtain pressure waveforms noninvasively. The peak and bottom values of a diameter change waveform were calibrated using systolic and diastolic

pressure measured with a cuff-type manometer applied to the upper arm, and the diameter change waveform was used as a blood pressure waveform.

The ambulatory blood pressure monitoring was done with ABPM-04 (Meditech, Meditech Ltd., Budapest, Hungary) based on validated oscillometric technique. During a 24-h monitoring period the blood pressure was registered in 15 minute intervals in daytime (8 a.m. to 10 p.m.) and 30 minute intervals during nighttime (10 p.m. to 8 a.m.). The results (mean arterial blood pressure, hypertensive time index) of blood pressure monitoring were analyzed by the proprietary software of ABPM-04.

Statistical analyses

The data are expressed as mean values \pm standard deviation, or as median values and interquartile range depending on the distribution. Distribution of the variables was analyzed using Kolmogorov-Smirnov test. Normally distributed variables were compared using two samples T-test, while non-normal distributed variables were compared with Mann Whitney U test. Pro-BNP levels were normalized by a logarithmic transformation in order to depict correlations with pro-BNP. Difference of parameters groups was analyzed with univariate general linear model, adjusted for age or age, HbA_{1c}, LVESD, LVESV, and ejection fraction of heart. The non-continuous parameters were analyzed by χ^2 -test. The correlations between variables were analyzed using Pearson's (in cases of normally distributed variables) and Spearman's (non-normally distributed variables) correlations. The statistical analyses were made by SPSS 13.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and two tailed P value of <0.05 was considered statistically significant.

1.1.1. Results

In our first study the highest level of plasma endogenous ouabain (19.7 ± 9.5 pmol/l) was measured in hypertensive patients with diabetes mellitus and chronic kidney disease, which was significantly higher than in HT+CKD group (after adjusting for age). The level of urinary EO and EO clearance did not show significant difference between the groups.

The EO clearance in HT group (31.2%) was significantly higher in the HT (14.3%) and HT+DM (11.5%) groups. There were no differences between groups in daytime, nighttime systolic, diastolic, mean arterial blood pressure and their hypertensive time index as well as diurnal index. According to the mean blood pressures of the groups, the patients were well-

treated in this study. The mean parameters of echocardiography and echo-tracking arterial stiffness were not shown differences between groups.

Plasma level of EO showed several significant correlations mainly with parameters of the nighttime blood pressure as nighttime systolic ($p=0.014$), diastolic ($p=0.029$), mean arterial blood pressure ($p=0.009$) and their hypertensive time indicis in the whole population. Relationship between these parameters may due to the increased nighttime/morning sympathetic tone because the levels of urinary catecholamines (norepinephrine) correlated with EO level ($R=0.396$, $p=0.011$). In the analysis of data of whole population we found some significant association between the level of urinary EO and carotid artery PWV ($p=0.023$) and β -stiffness ($p=0.009$).

The nighttime mean arterial blood pressure independently correlated with the level of plasma endogenous ouabain ($p=0.004$), while independent predictor of the β -stiffness of carotid artery was the urinary endogenous ouabain ($p=0.011$).

Fractional excretion of EO was higher in HT+DM+CKD and HT+CKD groups than other groups, and grade of fractional excretion showed significant correlation with nighttime mean arterial blood pressure ($R=-0.361$, $p=0.029$) as well as the end-systolic ($R=0.345$, $p=0.029$) and diastolic ($R=0.356$, $p=0.024$) diameters of the heart.

The fractional excretion of EO also showed close relations with pulse wave velocity and β -stiffness of carotid artery in the HT+DM group.

In the HT+DM+CKD group the plasma EO and diastolic dysfunction of the heart ($R=-0.665$, $p=0.036$), as well as some nighttime blood pressure parameters were associated.

The urinary level of o-tyr is not differed in groups, but the level of plasma o-tyr was significantly higher the in the HT+DM+CKD and HT+CKD groups than HT group ($p=0.028$ and $p=0.04$, respectively). We have not found correlations between plasma o-tyr and markers of cardiovascular disease in the whole population or in the groups. Levels of o-tyr did not show any correlations with levels of EO. Level of o-tyr correlated with the markers of renal function only.

In our second study we have found that the long-term dual RAS blockade did not reduce more the levels of urinary and plasma EO, compared to the mono RAS blockade. In the cardiovascular parameters the groups were not different, except of some echocardiographic parameters (ejection fraction of heart, end-systolic diameter and volume).

We have found difference between the pro-BNP levels of the groups only.

The plasma level of EO correlated with some nighttime blood pressure values, as systolic ($R=0.512$, $p=0.049$) or mean arterial blood pressure ($R=0.541$, $p=0.038$) in the MONO-group. Also, the urinary EO level associated with pulse wave velocity ($R=0.621$, $p=0.005$) and β -stiffness ($R=0.681$, $p=0.001$) of carotid artery in the MONO-group. In the DUAL-group, these correlations were not found.

Regarding the urinary albumins we have explored that the immuno-unreactive urinary albumin correlated with diastolic dysfunction marker of the heart ($R=-0.492$, $p=0.028$), diurnal index of diastolic blood pressure ($R=-0.540$, $p=0.014$) in the MONO-group; however the immuno-unreactive albumin correlated with only the level of plasma EO ($p=0.014$) in the DUAL-group.

1.1.2. Discussion

Association of EO levels and blood pressure parameters have known for a long time in untreated hypertensives, but the relationships of EO levels with the parameters of a complex cardiovascular measurement in treated patients with hypertension are not studied.

In our study the samples collection, echocardiography, and echo-tracking measurements were completed in a short time (between 7.30 - 8.30 a.m.). Thus, we tried to eliminate the inaccuracy from the circadian variation of EO (which is not known), and so the levels of plasma EO strongly mirror the patient's current (night and early morning) cardiovascular status. The pathophysiological abnormalities of this period especially nighttime and morning hypertension are major risk factors for acute cardiovascular diseases.

In our first study the level of EO was highest in HT+DM+CKD group. This result is in agreement with results of earlier investigations which suggest that more comorbidities potentially associate with higher level of EO.

The level of plasma EO in healthy individuals was 9-12 pmol/L, assessed previously by the same method as we used in hypertensives. In our study the average level of plasma EO was 14.7 ± 5.7 pmol/L, nevertheless our patients were treated with RAAS blockers and/or β -blockers. In our study the levels of EO was lower than in some studies in literature using other immunoassay methods which are not comparable with our results because of using different antibody and methods.

According to our results the level of endogenous ouabain associated with nighttime blood pressures suggesting possible role of endogenous ouabain in the pathogenesis of impaired diurnal rhythm of blood pressure and nighttime blood pressure.

Fractional excretion of EO was significantly higher in groups including patients with chronic kidney diseases than others. The EO fractional excretion is less than 2% in healthy men and in our patients with hypertension its levels were 11.5 – 31.2 %. This observation may underline the role of kidney in regulation of EO level.

Endogenous ouabain may therefore take part in the development of hypertension through increased sympathetic tone, direct prohypertrophic effects on myocytes of heart and arteries. These processes can lead to cardiac hypertrophy in vivo. This thesis is emphasized with our results in which the level of EO associates with urinary catecholamine level.

In our study we have found association between left ventricular diastolic dysfunction (E/A) and level of plasma EO in HT+DM+CKD group. Similar correlation was proved within patients with end stage kidney disease suggesting that the prolonged elevated level of plasma EO may have a role in the development of ventricular hypertrophy.

Long-time effects of endogenous digitalis like factors contribute to the arterial rigidity, which explains the correlation of EO levels and arterial stiffness markers in our study.

Changed excretion of EO play role in the formation of arterial stiffness, because of the independent predictor of carotid artery β -stiffness was urinary EO in the whole population. This could be a new component between the decreased renal function and arterial stiffness.

According to our results, the level of EO is a useful marker for the prediction of the severity of subclinical organ damage in patients with hypertension.

In the literature some studies found significant correlations between oxidative stress markers and cardiovascular parameters. However, it also known that several medications (e.g. AT II receptor blocker, alpha and beta-blocker) decrease the levels of oxidative markers in hypertensive patients. The endogenous digitalis like factors regulate the intracellular free radical production so we supposed that EO levels and hydroxyl free radical material (o-tyr) also correlates with together. In our investigation we have not found any correlation between the levels plasma and urinary o-tyr and EO neither in the whole population, nor in the groups. In a previous study the level of urinary o-tyr was higher in the patients with diabetes mellitus and kidney disease than in healthy controls. In this study the relations between o-tyr level and cardiovascular markers were not assessed. In our analysis of data we did not find direct relationship between the levels plasma and urinary o-tyr and blood pressure as well as echocardiographic, stiffness markers of patients neither in the whole population, nor in the

groups. Plasma o-tyr showed correlation with renal function only, which underlines our earlier hypothesis that the main regulator of o-tyr may be the kidney. We could not detect a direct correlation between level of EO and marker of oxidative stress. The explanation of this missing association may be due to renal excretion of o-tyr and to the treatment of the patients and the presence of diabetes (in some groups).

The therapy with RAS blocking drugs have been used for some decades to reduce the blood pressure, grade of albuminuria and other clinical and subclinical organ damage. Several multicenter, randomized studies proved that beneficial effects of dual RAS blockade on cardiovascular morbidity, mortality and severity of the subclinical organ damage opposite to the mono RAS blockade. *In our second study* we also compare the results of long-term mono and dual RAS blockade on cardiovascular markers, especially focus on immuno-unreactive urinary albumin and levels of EO. Level of plasma and urinary EO (as a new marker in the assessment of cardiovascular status) were similar in the two groups. Level of EO correlated with nighttime blood pressure as well arterial stiffness parameters in the MONO-group only. We have found no difference between the two groups in regarding blood pressure and arterial stiffness parameters. Left ventricular status and ejection fraction significantly better in the DUAL-group than in the MONO-group, the level of pro-BNP was significantly lower in the dual-group, which can refer a enhanced cardiac outcome. The differences between echocardiographic parameters could be not explained by different sympathetic activity and its suppressions because the excreted levels of catecholamine and β -blocker therapy were similar. Our observation may suggest that although the dual blockade did not lead to lower levels of EO, but may decrease the intracellular pathway activity which leads to ventricular remodelling. One may suppose, that dual RAS blockade is more effective, than mono blockade to preserve lower stiffness of arteries, but according to the literature dual RAS blockade compared to the mono blockade does not decrease the risk of cardiovascular mortality.

Exact detection of urinary albumin is important for the appropriate treatment in several diseases. Based on the different measurement methods, urinary albumin exists in immunoreactive and immuno-unreactive form. The recently developed high performance liquid chromatography (HPLC) assay measures the total (immunoreactive plus immuno-unreactive) urinary albumin, whereas the conventional immuno-based methods (radioimmunoassay, immunoturbidimetry, immunonephelometry) measure immunoreactive

albumin only. In our other study we measured the level of both type urinary albumin and their correlations in patients with use of mono and dual RAS blockers. Some previously published studies show significant associations between the level of urinary immunoreactive albumin and markers of cardiovascular diseases, but there is little information about the level of urinary immuno-unreactive albumin.

Our main findings of assessment were that the level of urinary albumin was higher assessing by HPLC than immunoturbidimetry and the cardiovascular parameters (blood pressure parameters, diastolic dysfunction of heart) correlated with the grade of albuminuria determined by HPLC in the MONO-group, but in the DUAL-group EO was the only one, which correlated with the urinary total and immune-unreactive albumins. None of these parameters correlated with the immunoreactive urinary albumin.

In our study the urinary level of albumin was in the near normalalbuminuric range which shows that the therapy of patients was appropriate and the greater part of total excreted urinary albumin remained immuno-unreactive. The exact nature and formation of immuno-unreactive albumin is not known.

LIST OF PHD THESIS

1. Measurement of EO levels is useful markers of the damage of cardiovascular status in treated hypertensives, and in hypertensives with comorbidity.
2. Level of plasma EO is higher in hypertensives with comorbidity (diabetes mellitus and renal failure)
3. Level of EO is correlated with arterial stiffness parameters.
4. Level of EO correlates with nighttime blood pressure, possibly across by increased sympathetic activity.
5. The hydroxyl free radical marker, o-tyr is not associated with levels of EO in patients with treated hypertension.
6. Kidney is the main regulator of the plasma level of o-tyr.
7. ARBs with ACE-inhibitors (DUAL RAS blockade) do not decrease more the levels of plasma and urinary of EO than ACE-inhibitors alone.

LIST OF PUBLICATIONS

Cumulative impact factor: full papers and letters: 19.003, abstracts: 80.611

Cumulative impact factor of publications used in this thesis: full papers: 3.676, letter: 6.614

This thesis is based on the following publications:

I. Full papers

1. Selective association of endogenous ouabain with subclinical organ damage in treated hypertensive patients.

Nagy G, Gaszner B, Lányi E, Markó L, Fehér E, Cseh J, Kőszegi T, Betlehem J, Sulyok E, Cziráki A, Wittmann I. *J Hum Hypertens*. 2011;25(2): 122-129. **IF 2010: 2,176**

2. Effect of mono and dual blockade of the renin-angiotensin system on the markers of cardiovascular status in hypertensive patients with mild and moderate renal failure

Gábor Nagy, István A. Szijártó, Balázs Gaszner, Éva Lányi, Lajos Markó, Ákos Mérei, Gergő A. Molnár, Kinga Németh, József Betlehem, István Wittmann
Kidney and Blood Pressure Research 2011;34(3): 150-157. **IF 2010: 1,500**

3. Az endogén ouabain összefügg a hipertóniás betegek kardiovaszkuláris állapotával

Nagy G, Gaszner B, Lányi E, Markó L, Fehér E, Cseh J, Kőszegi T, Betlehem J, Sulyok E, Cziráki A, Wittmann I.
Magyar Belorvosi Archívum 2010;63(6):435-442.

II. Letter

1. **Nighttime activity influences the evaluation of ambulatory blood pressure monitoring.** In response to Agarwal R, Light RP, Bills JE, Hummel LA. *Hypertension*. 2009;54:646-651.

Nagy G, Nagy CB *Hypertension* 2009;54 (6) e139. **IF 2009: 6,614**

III. Abstracts

1. Endogén ouabain és a szubklinikai szervkárosodások kapcsolata hipertóniás vesebetegekben

Nagy Gábor, Gaszner Balázs, Mérei Ákos, Lányi Éva, Markó Lajos, Cseh Judit, Sulyok Endre, Betlehem József, Cziráki Attila, Wittmann István

Place of presentation: Magyar Nephrologiai Társaság Nagygyűlése 2009. szeptember 17-19. Siófok
Hypertonia és Nephrologia, 2009.13 (S1) 39-39.

2. Hidroxil szabadgyök-termelés hipertóniás veseelégtelen betegekben

Nagy Gábor, Gaszner Balázs, Lányi Éva, Markó Lajos, Molnár A. Gergő, Betlehem József, Wittmann István

Place of presentation: Magyar Nephrologiai Társaság Nagygyűlése 2010. október 21-23. Szeged
Hypertonia és Nephrologia, 2010.14 (S1) 27-27.