

Ph.D. ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**AN ENDOTHELIUM-BOUND ANGIOTENSIN CONVERTING
ENZYME-BASED ASSAY AND NOVEL COMPUTERIZED
NONINVASIVE METHODS TO STUDY THE EFFECTS OF
ANTIHYPERTENSIVE DRUGS**

Írta : Dr. Cziráki Attila

Pécsi Orvostudományi Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinika

&

Vascular Biology Center, Medical College of Georgia, Augusta GA, USA

1995

I. Bevezetés, az értekezés célkitűzései

A magas vérnyomás népbetegség, a felnőtt populáció 10-20 %-át érinti. A multicentrikus hazai vizsgálatok (HIRAP) adatai szerint hypertónia a szűrt lakosság 6-25%-ában volt kimutatható és ez a gyakoriság a kor előrehaladtával növekszik. A magas vérnyomás jelentőségére az általa okozott célszervkárosodások (szív, vese, szem, perifériás erek) mutatnak rá. A kezeletlen hypertóniás betegek halálocai között első helyen a pangásos szívelégtelenség áll, ezt követi a myocardium infarctus, majd a veseelégtelenség és a stroke.

Az esszenciális hypertóniás betegeknek életük végéig kell szedni a vérnyomáscsökkentő gyógyszert, vállalva a kisebb-nagyobb mellékhatásokat. A gyógyszeres terápia fő célja: a) a normális vérnyomás elérése; b) a hypertónia okozta késői szervkárosodások megelőzése; c) a megfelelő életminőség biztosítása. Az angiotensin konvertáló enzim (ACE ; kinináz II) úgy is mint az erek endotheljéhez kötött ektoenzim megtalálható a legtöbb szövetben és fontos szerepet játszik a vérnyomás szabályozásában. Az ACE-inhibitorok mint elsővonalbeli vérnyomáscsökkentő gyógyszerek a renin-angiotensin rendszer (RAS) endokrin (keringő RAS ; rövid távú hatások) és szöveti (helyi RAS ; hosszú távú hatások) szabályozásában is hatékonyak bizonyultak. Az ACE-inhibitorok szöveti hatásainak vizsgálata és új, szövetspecifikus ACE-gátlók kifejlesztése a magas vérnyomás okozta célszervkárosodások megelőzése miatt fontos.

A vérnyomáscsökkentő gyógyszerek klinikai és humán klinikai farmakológiai (I-IV fázis) vizsgálata során csak a megfelelő vizsgálóeszközökkel, standard körülmények biztosításával, jól tervezett vizsgálati protokoll, valamint megfelelően dokumentált és értékelt

zárójelentés készítése esetén kaphatunk hiteles, reprodukálható eredményeket, különös tekintettel a Good Clinical Practice (GCP) elvására. Az utóbbi évtizedben a klinikai gyakorlatban egyre inkább elterjedtek olyan vizsgálóeljárások (ambuláns vérnyomás-monitorozás [ABPM], impedancia kardiográfia [IKG], 2D echokardiográfia) amelyek alkalmazása és összekapcsolása révén a kardiovaszkuláris rendszer működéséről noninvazív módszerekkel számos értékes információ nyerhető.

A disszertáció célkitűzései az alábbiakban foglalhatók össze:

1. A tüdőkapilláris endothelhez kötött és a különböző szöveti ACE aktivitások egyidejű regisztrálása és összehasonlítása állatkísérletes modellben.
2. Különböző ACE-inhibitorok (a hosszú hatástartamú lipidoldékony trandolapril és az enalapril) ACE-gatló hatásának összehasonlítása; a pulmonális kapilláris endothelhez kötött, a szérum és a szöveti ACE-aktivitás változásainak egyidejű regisztrálása.
3. Indikátor dilúciós módszer kidolgozása a pulmonális kapilláris endothelhez kötött ACE aktivitás meghatározása céljából humán klinikofarmakológiai vizsgálatokban.
4. A pulmonális kapilláris endothelhez kötött és a szérum ACE aktivitás összehasonlítása
 - a) esszenciális hypertóniás betegekben tartós ACE-inhibitor kezelést követően.
 - b) normotenzív önkéntesekben ACE-inhibitor egyszeri, iv. adását követően.
5. A koronária endothelhez kötött ACE-aktivitás mérése in situ állatkísérletes modellben.
6. A koronária és pulmonális kapilláris endothelhez kötött ACE-aktivitások összehasonlítása.

7. A rövidtávú ischaemiás változások hatása a koronária endothelhez kötött ACE-aktivitásra állatkísérletes modellben.

8. A koronaria ACE-aktivitás változásának regisztrálása bypass műtét után ischaemiás szívbetegekben.

9. Noninvazív vizsgálóeljárások összekapcsolása és alkalmazása humán klinikai farmakológiai vizsgálatokban. A teljes mértékben automatizált és programozható IKG mérőmódszer kidolgozása és alkalmazása a humán klinikai farmakológiai (I-IV fázis) vizsgálatokban.

10. Esszenciális hypertóniás betegek ABPM vizsgálata során nyert vérnyomás paramétereinek analízise.

11. Tíz különböző vérnyomás paraméter klinikai jelentőségének és osztályozó erejének vizsgálata a hypertóniás betegek klasszifikációja során.

II. Módszerek

1. Vizsgálati körülmények és betegek

A disszertációban szereplő állatkísérletekre és humán klinikai, klinikai farmakológiai vizsgálatokra a Pécsi Orvostudományi Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinikáján és Vascular Biology Center, Medical College of Georgia, Augusta GA, USA intézetekben került sor

A trandolapril és az enalapril vérnyomáscsökkentő, valamint szöveti ACE-gátló hatásának vizsgálatához az ún. "total heart-bypass" állatkísérletes modellt alkalmaztuk összesen 47 esetben Új-Zélandi nyúlón.

Az iv. adott enalapril pulmonális kapilláris endotelhez kötött ill. a szérum ACE-re kifejtett hatását vizsgáltuk 18 (7 esszenciális hypertóniás és 11 normotenzív) betegben akik diagnosztikus mellkasebészeti beavatkozáson estek át.

A rövidtávú okklúzió koronária endotelhez kötött ACE-aktivitásra kifejtett hatását 11 esetben vizsgáltuk, in situ kutya kísérletben.

12 koronária bypass műtétre kerülő ischaemiás szívbetegben vizsgáltuk a koronária endotelhez kötött ACE aktivitás és a dinamikus perfundált terület műtét utáni változását.

Automatikus, programozható IKG mérési módszerrel vizsgáltuk a) human I/A fázisú klinikai farmakológiai vizsgálat során 8 egészséges önkéntesben egy új alfa-adrenoreceptor antagonistá vegyület hemodinamikai hatásait

b) a sublingualisan alkalmazott kalcium antagonistá nifedipin akut vérnyomáscsökkentő hatását tíz esszenciális hipertóniás betegben.

c) az ACE-gátló cilazapril vérnyomáscsökkentő és hemodinamikai hatásait 24 enyhe és közép súlyos stádiumba tartozó esszenciális hipertóniás betegben.

128 Esszenciális hipertóniás beteg ABPM vizsgálata során nyert tízféle vérnyomás paramétert vizsgáltunk PRIMA többváltozós alakfelismerő és osztályozó rendszerrel, abból a célból, hogy meghatározzuk ezek klinikai jelentőségét, valamint azt, hogy az egyes paraméterek milyen jelentőséggel bírnak a hipertóniás betegek osztályba sorolásakor.

2. Mérőeszközök és statisztikai módszerek

A pulmonális kapilláris endothelhez, a coronaria endothelhez kötött, valamint a különböző szöveti és szérumban ACE-aktivitások meghatározása minden esetben egy szintetikus ACE-szubsztrát a ³H-Benzoyl-Phenylalanin-Alanin-Prolin (³H-BPAP) segítségével történt.

A radioaktív minták értékelése liquid scintillációs spektrométer (Model LS 7500, Beckman Instruments) segítségével történt.

A 24-órás ambuláns vérnyomásmonitorozás oscillometriás elven működő vérnyomásmonitorral történt (MEDITECH ABPM, Meditech Ltd, Budapest).

Az IKG mérésekhez ICG-M401 típusú impedancia kardiográfot használtunk (ASK Ltd, Budapest).

Az echokardiográfiás paraméterek vizsgálata Picker SE 151-B típusú 2D Doppler echokardiográfal történt.

Az adatok feldolgozása IBM PS/2 személyi számítógéppel történt (486 mikroprocesszor, IBM) nemzetközileg ismert és validált szoftverek segítségével : WordPerfect 6.1, Statpack 4.0, Slide Write Plus 3.0. Az adatok feldolgozásában paraméteres és nem- paraméteres statisztikai módszereket és kétféle speciális adatfeldolgozó módszert használtunk.

a. A minták ACE aktivitásának meghatározása a $^3\text{H-BPAP}$ metabolizmusa alapján elsődrendű enzimkinetikai reakciót feltételezve a módosított Henri-Michaelis-Menten egyenlet szerint speciális programcsomag segítségével történt.

b. A "PRIMA" a többváltozós alakfelismerő és osztályozó rendszer. A "PRIMA" különböző betegcsoportok "megtanított" adatai alapján információt szolgáltat arról, hogy mely paraméterek differenciáló ereje a legnagyobb a csoportok megkülönböztetésében. A "PRIMA" több paraméter együttes figyelembevételével, a csoportok eredő osztálytávolsága alapján képes előjelezni, hogy az egyes csoportokba tartozó betegek milyen megbízhatóan lesznek helyesen visszaosztályozhatók.

III. Eredmények és következtetések

1. A "total heart-bypass" állatkísérletes modellt alkalmazva párhuzamosan mértem a pulmonális kapilláris endothelhez kötött, a szöveti, valamint a szérum ACE-aktivitást.

2. Ezt a modellt alkalmazva igazoltam, hogy a hosszú hatástartamú, lipidoldékony ACE-gátló trandolapril nagyobb affinitással gátolja a szöveti- és pulmonális kapilláris

endothelhez kötött ACE-t, mint az enalapril.

3. Kidolgoztam és humán klinikai, klinikai farmakológiai vizsgálatokban alkalmaztam egy szintetikus ACE-szubsztrát, a ³H-BPAP metabolizmusának mérésén alapuló indikátor dilúciós módszert, a pulmonális kapilláris és koronária ACE-aktivitás meghatározása céljából.

4. Ezzel a módszerrel igazoltam, hogy esszenciális hypertóniásokban a tartósan adott enalapril nagyobb mértékben gátolja a tüdőkapillárisokban levő ACE-aktivitást, mint a szérumban levő ACE-t.

5. Ugyanezt állapítottam meg normotenzív egyéneknél az enalapril egyszeri adagban iv. történő alkalmazása után is.

6. Kutya kísérletben kidolgoztam egy módszert a koronária endothelhez kötött ACE-aktivitás mérésére, amely segítségével a rövidtávú koronária okklúzió által kiváltott perfúziós változások leírhatók.

7. Ischaemiás szívbetegekben a pulmonális kapilláris és a koronária endothelhez kötött ACE-aktivitását paralell meghatározását végeztem a bypass műtét előtt és után.

8. Demonstráltam, hogy a graftok csatlakozása után emelkedik a koronária endothelhez kötött ACE-aktivitás, s ezzel párhuzamosan a perfundált terület növekszik.

9. Kidolgoztam és az antihypertenzív gyógyszerek klinikai, humán klinikai farmakológiai vizsgálatában eredményesen alkalmaztam az automatizált, programozható impedancia kardiográfiás mérőmódszert.

10. E módszer segítségével vizsgáltam humán I/A fázisú klinikai farmakológiai vizsgálatban egy új alfa-adrenoceptor antagonisták hemodinamikai hatásait.

11. Hasonló módszerrel vizsgálva igazoltam a sublingualisan adott nifedipin

antihypertenzív hatását a hypertenzív krízisállapot sürgősségi ellátásában, valamint az ACE-gátló cilazapril kedvező hemodinamikai hatásait.

12. 46 egészséges önkéntes és 128 esszenciális hypertóniás beteg 24 órás ABPM vizsgálata után "PRIMA" számítógépes alakfelismerő és osztályozó rendszerrel vizsgáltam tízféle különböző vérnyomás paraméter klinikai jelentőségét.

13. Vizsgálataim szerint a 24 órás diasztolés átlag, a hypertóniás időindex és a hyperbáriás impact paraméterek fokozott jelentőséggel bírnak a hypertóniás betegek korrekt osztályba sorolását illetően és valószínűleg a célszervkárosodások kialakulásának előrejelzésében is.

PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. KÖNYVFEJEZET

1. **Cziráki, A.,** Catravas J.D. (1995) Early detection of endothelial dysfunction in man. **In: Vascular endothelium: Responses to injury.** Catravas, Callow, Ryan (eds.) Plenum Press, New York. pp. 3-10. (in press)
2. **Cziráki, A.,** Rubin, J.W., Finney, N.R., and Catravas, J.D. (1995) Quantification of pulmonary capillary surface area in patients undergoing video-assisted thoracic surgery **In: Vascular endothelium: Responses to injury.** Catravas, Callow, Ryan (eds.), Plenum Press, New York. pp. 78-80. (in press)
3. **Cziráki, A.,** Rubin, J.W., Finney, N.R., and Catravas, J.D. (1995) Estimation of perfused coronary surface area in patients undergoing coronary arterial bypass grafting. **In: Vascular endothelium: Responses to injury.** Catravas, Callow, Ryan (eds.), Plenum Press, New York. pp. 89-91. (in press)

2. KÖZLEMÉNYEK

4. **Cziráki, A.,** Parkerson, J., Fisher, E., and Catravas, J.D. (1995) Inhibition of pulmonary endothelial angiotensin converting enzyme activity in vivo. **Br. J. Pharmacol.** (in press)
5. **Cziráki, A.,** Rubin, J.W., and Catravas, J.D. (1995) Importance of estimating perfused pulmonary capillary endothelium-bound angiotensin-converting enzyme activity in patients with lung disease. **Endothelium** (in press; accepted as invited paper).
6. **Cziráki, A.,** Rinfel, J., Hunyady, B., and Jávör T. (1992) Application of the chronopharmacological methods in clinicopharmacological studies. **Pharmacol. Res.** 25 (suppl.2): 188-191.
7. **Cziráki, A.,** Hunyady, B., és Jávör, T. (1991) Baypress 20 monoterápia hatása esszenciális hipertóniás betegek vérnyomásának diurnális ingadozására és hemodinamikai változásaira. **Orvostudomány** 2: 1-4.

8. **Cziráki, A.**, Horváth, I., Juricskay, I., Hunyady, B., és Jávör, T. (1994) A Cordaflex tableta (EGIS) akut vérnyomáscsökkentő hatásának vizsgálata ütemezett impedancia kardiográfiás mérési módszerrel esszenciális hipertóniások sürgősségi ellátásában. **Med. Univ.** 27: 105-107.
9. **Cziráki, A.**, Horváth, I., Hunyady, B., Juricskay I., Mezei B., és Jávör T. (1994) Sandonorm monoterápia hatása esszenciális hipertóniás betegek vérnyomásának diurnális változására és hemodinamikai paramétereire. **Med. Univ.** 27: 301-304.
10. **Cziraki, A.**, Rinfel, J., Hunyady B., Schmidt E., Nemessányi Z. és Mózsik Gy. (1995) Az ACE-inhibitor Tensiomin kedvező hatása a nefropathias szövödmények megelőzésében inzulin dependens diabetes mellitusban. **Orv. Hetilap (közlésre elfogadva)**
11. **Cziraki, A.**, Rubin, J.W., Horváth I., and Catravas J.D. (1995) Quantification of pulmonary capillary endothelium-bound ACE inhibition in man. **J.Cardiovasc. Pharm. (submitted paper)**
12. **Cziraki, A.**, Juricskay I., Horváth, I., and Mozsik Gy. Importance of the blood pressure parameters obtained by 24-hour ambulatory blood pressure monitoring in the classification of hypertensive patients. **Hypertension (submitted paper)**
13. **Cziraki, A.**, Horváth, I., and Mózsik, Gy. (1994) Efficacy of orally administered cilazapril on blood pressure and hemodynamic parameters in patients with essential hypertension. **Eur. J. Clin. Pharm. (submitted paper)**
14. Jávör, T., **Cziráki, A.**, és Hunyady, B. (1993) A Tenormin (100 mg atenololum) monoterápia hatékonyságának megítélése enyhe és közép súlyos esszenciális hipertóniában. **Med. Univ.** 26: 233-236.
15. Hunyady, B., **Cziráki, A.**, Vincze, Á., Nagy, L., és Jávör, T. (1994) A Tisacid szuszpenzió és tableta savkötő képességének vizsgálata intragasztrikus pH-méréssel hiperacid betegekben. **Orv. Hetilap** 135:1353-1356.
16. Fisher, E., **Cziráki, A.**, Steinhart, C.M., and Catravas, J.D. (1994) Pulmonary arterial and arteriolar resistances may be altered without altering dynamically perfused capillary surface area. **Am. J. Physiol. (submitted paper)**
17. Papapetropoulos, A., **Cziráki, A.**, Rubin, J.W., Stone, C.D., and Catravas, J.D. (1995) Comparison of enzymatic activity and gene expression of soluble guanylate cyclase in human vascular tissue. **FEBS Lett. (submitted paper)**
18. Hunyady, B., Vincze, Á., **Cziráki, A.**, and Jávör, T. (1992) Effect of intravenously administered 20 mg Famotidine on 24-hour intragastric pH. **Pharmacol. Res.** 25 (suppl.2): 202-205.

19. Hunyady, B., Vincze, A., Garamszegi, M., **Cziráki, A.**, and Mózsik, Gy. Effect of ranitidine, famotidine and vitamin A on gastric acidity studied by a new computerised intragastric pH-metry system. (1992) **Exp. Clin. Gastroenterol.** 1: 365-368.
20. Hunyady, B., Vincze, A., Nagy, L., **Cziráki, A.**, Garamszegi, M., Jávor, T., and Mózsik, Gy. (1994) Prospective, controlled clinical study of a hungarian Al-Mg-containing antacid using intragastric pH-metry. **Exp. Clin. Gastroenterol.** 4:21-27.

3. ELŐADÁSKIVONATOK

21. **Cziráki, A.**, Rubin, J.W., Finney, N.R., and Catravas, J.D. (1994) Comparison between pulmonary capillary endothelium-bound and serum angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition. **Circulation** 90: A379.
22. **Cziráki, A.**, Rubin, J.W., Shapiro, M.B., and Catravas, J.D. (1994) Importance of estimating perfused pulmonary capillary endothelium bound angiotensin converting enzyme (ACE) activity in patients with lung disease. **Circulation** 90: A801.
23. **Cziráki, A.**, Parkerson, J., Fisher, E., and Catravas, J.D. (1994) Inhibition of pulmonary capillary endothelium-bound ACE activity by trandolaprilat and enalaprilat, in vivo. **FASEB J.** 8: A1908.
24. **Cziráki, A.**, Ryan, J.W., Horváth, I., Fisher, L.E., Parkerson, J., and Catravas, J.D. (1995) Comparison of the hydrolysis of two synthetic ACE substrates by rabbit lung, in vivo. **FASEB J.** 9: A719.
25. **Cziráki, A.**, Rubin, J.W., and Catravas, J.D. (1995) Importance of estimating perfused pulmonary capillary endothelium bound (PCEB) angiotensin converting enzyme activity in man. **3rd International Congress on Heart Failure, Geneva.** A127.
26. Horváth, I., **Cziráki, A.**, Parkerson, J., and Catravas, J.D. (1995) The effect of left anterior descending (LAD) coronary occlusion on dynamically perfused coronary capillary surface area in dog. **FASEB J.** 9: A847.
27. Catravas, J.D., **Cziráki, A.**, and Shapiro, M. (1995) Reduction in the transpulmonary hydrolysis of ³H-benzoyl-Phe-Ala-Pro by capillary endothelium-bound angiotensin converting enzyme in patients diagnosed with the adult respiratory distress syndrome. **Am. Rev. Resp. Dis.** 151: A73.

28. Catravas, J.D., Rubin, J.W., Sone, C.D., **Cziráki, A.**, and Papapetropoulos, A. (1995) Enzymatic activity and gene expression of soluble guanylate cyclase (sGC) in human vascular tissue. **FASEB J.** 9: A229.
29. **Cziráki, A.**, Hunyady, B., Rinfel, J. és Jávor T. (1990) Baypress 20 monoterápia hatása a vérnyomás diurnális ritmusára és a centrális hemodinamikára. **Magyar Belorv. Arch.** 43: A76.
30. **Cziráki, A.**, Horváth, I., Hunyady, B., és Jávor T. (1992) A Sandonorm tablettá akut vérnyomáscsökkentő hatásának vizsgálata impedancia kardiográfia módszerével. **Magyar Kardiol. Társ. Naggyűlése.** A183.
31. **Cziráki, A.**, Horváth, I., Rinfel, J., és Jávor., T. (1992) Noninvazív vizsgálóeljárások összekapcsolása az antihipertenzív gyógyszerek klinikai farmakológiai vizsgálatában. A Sandonorm (EGIS) IV. fázisú klinikai farmakológiai vizsgálata. **Magyar Kardiol. Társ. Naggyűlése.** A203.
32. **Cziráki, A.**, Hunyady, B., Mezey, B., és Jávor T. (1990) A Tenormin tablettá vérnyomáscsökkentő hatásának vizsgálata kronofarmakológiai módszerek alkalmazásával. **Magy. Kardiol. Társ. Naggyűlése.** A87.
33. **Cziráki, A.**, Rinfel, J., Hunyady, B., és Jávor T. (1990) Az ACE inhibitor Tensiomin kedvező hatása a korai mikroangiopátiás érszövődmények megelőzésében inzulin dependens diabetes mellitusban. **Magyar Belgy. Társ. Dunántúli Sect. XXXVII. Vándorgy.**, Esztergom, A112.
34. Hunyady, B., **Cziráki, A.**, Garamszegi, M., Nagy, L., és Jávor, T. (1990) Számítógépes intragasztrikus pH-monitorozó rendszer: Klinikai és klinikofarmakológiai tapasztalatok. **Magy. Belgy. Társ. Dunántúli Sect. XXXVII. Vándorgy.**, Esztergom, A83.
35. Hunyady, B., Pintér, T., **Cziráki, A.**, Nagy, L., és Jávor, T. (1990) Egyszeri dózisú omeprazol és ranitidin hatása a bazális és stimulált gyomornedv H⁺-ion koncentrációjára hyperacid betegekben. **Quart. Bull. Hung. Gastroent. Soc.** 8: A80.
36. Nagy, L., Hunyady, B., **Cziráki, A.**, Rinfel, J., és Jávor, T. (1989) Tisacid suspensio és Maalox suspensio összehasonlító vizsgálata intragasztricus pH méréssel hyperacid betegekben. **Quart. Bull. Hung. Gastroent. Soc.** 7: A63.