

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

**AZ ANGIOTENZIN II INDUKÁLTA ARTÉRIÁS VAZOKONTRAKCIÓ,
ÉS A VASZKULÁRIS AT₁-RECEPTOR EXPRESSZIÓ VÁLTOZÁSA
AZ ÉLETKOR FÜGGVÉNYÉBEN**

VÁMOS ZOLTÁN

Egyetemi doktori (Ph. D.) értekezése

Témavezető

Prof. Dr. Koller Ákos, egyetemi tanár

Programvezető

Prof. Dr. Koller Ákos, egyetemi tanár

Doktori Iskola vezetője

Prof. Dr. Kovács L. Gábor, egyetemi tanár, akadémikus

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR,
KÓRÉLETTANI ÉS GERONTOLÓGIAI INTÉZET,
SZENTÁGOTHAJ JÁNOS KUTATÓKÖZPONT

Pécs, 2015

1	BEVEZETÉS	6
1.1	Általános bevezetés	6
1.2	Az artériás vérnyomás korfüggő változása	8
1.3	A vérkeringési rendszer korfüggő szabályozása	10
1.3.1	A szisztémás renin–angiotenzin rendszer szerepe a vérnyomás szabályozásában	11
1.4	A vaszkuláris renin-angiotenzin rendszer	13
1.5	Az angiotenzin II receptorai	14
1.5.1	Az AT ₁ -Receptor.....	14
1.5.2	Életkor hatása az AT ₁ -Receptorra	15
1.5.3	Az AT ₂ -Receptor.....	17
2	A KUTATÁS ELŐZMÉNYEINEK ÁTTEKINTÉSE.....	19
2.1	Életkor hatása a vérkeringésre és annak szabályozására	19
2.2	Életkor hatása az Angiotenzin II működésére	20
2.3	Életkor hatása az AT ₁ R expressziójára	21
3	HIPOTÉZISEK	22
4	CÉLOK.....	22
5	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	23
5.1	Kísérleti állatok, altatás és eutanázia	23
5.2	Műtétek.....	23

5.2.1	Invazív artériás vérnyomásmérés	23
5.2.2	A carotis communis artériák izolálása	24
5.3	Funkcionális mérések	24
5.3.1	Az Ang II-indukálta kontrakció vizsgálata izolált patkány carotis artérián	24
5.3.2	Az ismételt Ang II-indukálta kontrakció mérése izolált patkány carotis artérián	25
5.3.3	Patkány carotis artériák Ang II-indukálta kontrakciós görbéinek karakterizálása	26
5.3.4	Az AT ₁ R, az AT ₂ R és az endotélium szerepe az Ang II-indukálta kontrakcióban, izolált patkány carotis artérián	27
5.4	Vazomotor vizsgálatok során használt anyagok	27
5.5	A vaszkuláris AT₁R immunohisztokémiai kimutatása	28
5.6	Molekuláris biológiai mérések	29
5.6.1	A vaszkuláris AT ₁ R-fehérje expressziójának vizsgálata Western blottal	29
5.6.2	A vaszkuláris AT ₁ R-mRNS és AT ₂ R-mRNS expresszió vizsgálata qRT-PCR-rel	30
6	STATISZTIKAI MÓDSZEREK	31
7	EREDMÉNYEK	32
7.1	Patkány artériás középnyomásértékek életkorfüggő alakulása	32
7.2	Az izolált carotis artériák kontrakciós erejének vizsgálata	33
7.2.1	Az Ang II-indukálta kontrakciós görbe karakterisztikájának alakulása az életkor függvényében	33
7.2.2	Az Ang II-indukálta kontrakciós erő alakulása az életkor függvényében	34
7.2.3	Az ismételt Ang II-indukálta kontrakciós erő alakulása az életkor függvényében	35
7.2.4	Az ismételt Ang II-indukálta kontrakciók során kialakult tachyphylaxia alakulása az életkor függvényében	36
7.2.5	Az Ang II-indukálta kontrakciós erő alakulása: vaszkuláris endotélium jelenlétében és hiányában	37
7.3	AT₁R jelenléte patkány carotis artériák falában (simaizomban)	38

7.4	Az Ang II-indukálta kontrakció erejének változása AT ₁ R blokkoló jelenlétében és hiányában	39
7.5	Az Ang II-indukálta artériás kontrakció erejének változása AT ₂ R blokkoló jelenlétében és hiányában.....	40
7.6	A vaszkuláris AT ₁ R–mRNS expresszió változása az életkor függvényében	41
7.7	A vaszkuláris AT ₂ R–mRNS expresszió változása az életkor függvényében	41
7.8	A vaszkuláris AT ₁ R-fehérje expresszió változása az életkor függvényében	42
8	MEGBESZÉLÉS	44
8.1	A vérnyomás változása az életkor függvényében	44
8.2	Az Ang II-indukálta kontrakciók erejének alakulása az életkor függvényében	45
8.2.1	Az Ang II-indukálta kontrakciós görbék karakterisztikájának alakulása az életkor függvényében ...	47
8.3	Az ismételt Ang II-indukálta kontrakció alakulása az életkor függvényében. Tachyphylaxia jelenség és annak korfüggő alakulása	47
8.4	Az endotélium szerepe az Ang II-indukálta kontrakcióban	49
8.5	A vaszkuláris AT ₁ R-mRNS és fehérje expressziójának alakulása az életkor függvényében	50
8.6	A vaszkuláris AT ₁ R mediálta kontrakció intracelluláris jelátvitelének alakulása az életkor függvényében.	50
8.7	A vaszkuláris AT ₂ -Receptor szerepe az Ang II-indukálta konstriktor válaszokban	51
9	AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	54
10	KONKLÚZIÓK.....	56

11	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	57
12	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	58
13	IRODALOMJEGYZÉK.....	59
14	PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	74

1 BEVEZETÉS

1.1 Általános bevezetés

A méhen belüli élet egyik első látható jele a magzati vérkeringés beindulása. Az onto-, és organogenezis során a keringés és annak szabályozása folyamatos változásokon megy keresztül, elősegítve a magzatot a posztnatális élethez való alkalmazkodásra (Langman, 2013). A vérkeringési rendszer és ezen belül az erek vazomotor működése - élettani körülmények között - a csecsemő és gyermekkorhoz hasonlóan, felnőtt illetve aggyastyánkorban is jelentős változásokon megy keresztül (Min, 2009). A születést követően az élet során a keringési rendszer fokozatosan alkalmazkodik és adaptálódik a váltakozó fizikai terheléshez. Ez az adaptáció lehetőséget biztosít az esetleges fokozott terhelés során fellépő igény (pl. fokozott oxigén-fogyasztás) biztosítására is (Assayag, 1997; Fonyó, 2013). Az időskorúak száma a népességben belül világszerte jelentősen növekszik, ezért az öregedés a társadalomtudománnyal foglalkozó kutatók mellett, a biológusokat és orvosokat is foglalkoztatni kezdte (Beregi, 1984). Az elmúlt három évtizedben az öregedés során létrejövő élettani változásokkal kapcsolatos ismereteink fokozatosan bővültek. A világszerte folyó gerontológiai kutatások egyik fő célja az, hogy idősödő az egyének minél tovább képesek legyenek egészséges, produktív életet élni (Lindsay, 2014).

Míg az 1970-80-as években az öregedést a reprodukciós érettség után fellépő fokozatos funkcionális kapacitás-csökkenésként határozták meg (Comfort, 1970; Klinger, 1971; Beregi, 1984), addig az 1990-es években már az öregedést a normális fejlődés utolsó szakaszának-, a sejtosztódás és a differenciálódás utolsó lépésének tartották (Warner, 1997). Frolkisz és munkatársai az öregedést az élettani fejlődéstől és a differenciálódástól teljes mértékben különbözőnek ítélte meg (Frolkisz, 1980). Szerinte az időskori öregedés, egy

progresszív erőnléti csökkenéssel járó folyamat, ahol a halál valószínűsége fokozatosan növekszik (Frolkisz, 1980). Legújabb megközelítésben az öregedés nem betegség, hanem egy biológiai folyamat, ami az anatómiai és élettani változásokból mérhető le (Marin J, 1999; Lindsay, 2014). Azonban, időskorban sokszor nehézségbe ütközik a fiziológiai elváltozások elkülönítése a betegségek következtében létrejövő változásoktól.

Az egészséges időskor elérése fontos társadalmi és egészség-politikai érdek. A klasszikus gerontológiai kutatások alap gondolata, az úgynevezett progresszivitás azaz, hogy a funkcionális különbségeknek fokozatosan kifejlődő változásokként kell megtörténniük (Lansing, 1951; Mosher, 2012). A modern gerontológiai kutatások fontosnak tartják az egyéni szabályozási folyamatok korfüggő változásainak vizsgálatát is. Egyik fő feladata az öregedés "felgyorsulásának" és a betegségek kialakulásának a megakadályozása: a hosszú aktív élet valamint az egészség megőrzését öregkorban (Mosher, 2012).

Az időskori halandóság hátterében a kardiovaszkuláris betegségek előfordulása igen magas (WHO, 2013), így fontos a keringés-szabályozás változásainak korfüggő vizsgálata és megértése. A korszerű kardiovaszkuláris kutatások funkcionális, biokémiai és molekuláris biológiai módszereket együttesen használnak (Solti 1987; Berdasco, 2012). Míg a funkcionális és biokémiai vizsgálatok alap-élettani kérdéseket tisztáznak, addig a molekuláris orvostudományok fejlődése lehetővé tette a sejten belüli genetikai program és az öregedés viszonyának vizsgálatát is. Ebből következik, hogy egyre több kutatás konklúziója, hogy az öregedés során létrejövő változások hátterében egy jól szabályozott genetikai program is érvényesül (Saliques, 2010; Berdasco, 2012).

Míthogy a perifériás keringés biztosítja a "csatornát" az egyes anyagcsere folyamatok zavartalan működéséhez, ebből kifolyólag rendkívül fontosnak tartjuk azt szabályozó mechanizmusok körfüggő változásának megértését.

Az egyetemi doktori értekezésem a perifériás keringés lokális szabályozásában fontos szerepet játszó angiotenzin II molekula (Ang II) vazomotor hatásával foglalkozik (Vámos, 2014). Korábbi kutatások kimutatták, hogy renin–angiotenzin rendszer effektora, az Ang II az angiotenzin II - 1-es típusú receptorán (AT₁R) keresztül hatva az egyik leghatásosabb vazokonstriktor hatású molekula, ami számos egyéb funkciója mellett, a perifériás keringési ellenállás szabályozásában fontos szerepet játszik (Guo, 2001). Az artériás rendszerrel kapcsolatos funkcionális és morfológiai kutatásaimat az Ang II-indukálta AT₁R által közvetített vazomotor válaszokra és az azokat meghatározó tényezőkre fókuszáltam, különös tekintettel azoknak az életkortól való függésére. Természetesen jól ismert tény, hogy ezen kívül a Renin Angiotenzin Rendszer (RAS)-nak fontos élettani szerepe van számos egyéb élettani folyamat szabályozásában is, melyről a későbbiekben bővebben értekezek.

Kísérleteimet *in vitro*, különböző korú patkányokból izolált artériákon végeztem. A humán életkornak megfelelően méréseimet újszülött (8 napos), serdülő (1 hónapos), fiatal felnőtt (6 hónapos), középkorú (9 és 12 hónapos), öreg (24 hónapos) és aggastyán (30 hónapos) korú hím Wistar patkányokon végeztem. Bár a patkány-életkor, humán-életkor közötti megfeleltetés nem egységes, mégis az irodalom többsége ezen patkány korcsoportokat a fent említett emberi életkornak felelteti meg (Baker, 1979; Quinn, 2005) (3. ábra). Az életkor függvényében történő artériás konstriktor válaszok karakterizálása és azok hátterében lévő mechanizmusok felderítése hozzájárulhat egy specifikusabb és pontosabb életkor szerinti vérnyomás-szabályozás szemlélet kidolgozásához.

1.2 Az artériás vérnyomás korfüggő változása

Epidemiológiai felmérések kimutatták, hogy az ember artériás vérnyomása az életkor előrehaladtával fokozatosan változik (Franklin, 1997; McEniery 2007). A szisztolés,

diasztolés és artériás közénnyomás értékei az újszülött kortól, az aggastyánkorig folyamatosan változnak. Az újszülöttek vérnyomása a gesztációs kortól, a születési súlytól, és a poszt-konceptuális kortól függ ($RR_{\text{sys}} \sim 60 - 75$ Hgmm), majd éréssel fokozatosan emelkedik (lásd lejjebb). A felnőtt korban a vérnyomás elsődlegesen a szociáldemográfiai, nemi, tápláltsági, genetikai tényezők befolyásolják (Norman, 2010).

Érett újszülöttekben születéskor a szisztolés vérnyomás 70 Hgmm, ami az első héten naponta általában 1 Hgmm-rel növekszik, majd 2 hónapos kortól viszonylag gyorsabban egészen 1 éves korig. 1 éves kortól lassúbb ütemben folyamatosan tovább emelkedik (Oláh, 2008). A szisztolés vérnyomás 1 éves és 5 éves kor között a $100 + (3 \times \text{életkor [év]})$, 6 éves és 12 éves kor között pedig a $100 + (2 \times \text{életkor [év]})$ képlet szerint módosul (Krishna, 2006; Li, 2011). A 14–18 éves fiatalok átlagos vérnyomásértéke jelentős földrajzi és etnikai különbségeket is mutat (Li, 2011). A serdülőkorban normális vérnyomásról akkor beszélünk, ha a szisztolés és diasztolés vérnyomás alacsonyabb, mint az adott életkorú, nemű és testtömegű fiatal vérnyomásának 90 percentilise (Farsang, 2014). A nemek közti különbségek az eltérő ütemű szomatikus növekedéssel magyarázható. Az egészséges felnőtt korban a szisztolés vérnyomásérték aggastyán korig fokozatosan nő (ff: $\sim 105-110$ Hgmm vs. ök: $\sim 115-120$ Hgmm). A diasztolés vérnyomásérték fiatal-felnőtt kortól (30-34 év) idős-felnőttkorig (45-49 év) nő (ff: $\sim 70-73$ Hgmm vs. if: $\sim 75-78$ Hgmm), majd öregkorra (80-84 év) csökken (ök: $\sim 65-70$ Hgmm). A artériás közénnyomás (MABP) fiatal-felnőtt kortól (30-34 év) idős felnőtt korig (60-64 év) nő (ff: $\sim 84-85$ Hgmm vs. if: $84-88 \sim$ Hgmm), majd öregkorra (80-84 év) csökken (ök: $\sim 79-85$ Hgmm) (Franklin, 1997).

Az öregedés hatását a szisztémás vérnyomás változására különböző patkánytörzsekben (Wistar, Wistar Kyoto, Sprague-Dawley) is vizsgálták. A patkányok szisztémás artériás vérnyomásértékei a humán szisztémás vérnyomás értékeihez hasonlóan az életkorral fokozatosan változik (Charles Rivers, Hiroyoshi, 2002). Wistar Kyoto patkányokban

invazívan mért vérnyomásértékek az emberhez hasonló tendenciával alakulnak, azaz 1 hetes kortól ([MABP]:~90-95 Hgmm) 3 hetes korra nő (MABP:~105-115 Hgmm), majd 6 hetes korig (MABP:~108-112 Hgmm) továbbiakban nem változik (Kristek, 2011). Más munkacsoport hasonlóan invazívan mért vérnyomásértékei szerint a MABP idős korig (24 hónap) továbbiakban nem változik (Hiroyoshi, 2002). A kifejezetten idős, aggastyán korú (27 hónaposnál idősebb) hasonló patkánytörzsekben, az irodalom a fiatalabb korcsoportéhoz képest alacsonyabb (MABP: ~100-104 Hgmm) vérnyomás-értékeket idéz (Saito, 1998). Annak megítélése – hogy vajon élettani vagy kórélettani jelenségről van-e szó – még mindig folyamatos vita tárgya.

1.3 A vérkeringési rendszer korfüggő szabályozása

A folyamatos szisztémás vérnyomás fenntartása elengedhetetlenül fontos a nyugalmi vérkeringés, és ezen keresztül a szöveti perfúzió fenntartásához. Ez csak úgy lehetséges, ha a megfelelő vaszkuláris ellenállást és folyadék háztartást a szervezet az aktuális igényeinek megfelelően szabályozza. (Fonyó, 2011; Ferrao, 2014). Korábban leírták, hogy a vérkeringés hemodinamikai paraméterei, például: a szisztémás vérnyomás, pulzusszám, pulzusnyomás vagy a perifériás perfúzió különböző életkorokban nem azonosak (Krishna, 2006).

A vérnyomás-szabályozása komplex élettani interakcióinak (kardiális, idegrendszeri, hormonális, renális, lokális mechanizmusok) ismertetése nem célja és ebből kifolyólag nem részei a jelen disszertációnak. Ugyanakkor az érátmérőváltozásokban-, és ezen keresztül a szöveti perfúzió szabályozásában fontos szerepet játszó renin–angiotenzin rendszer főbb mechanizmusainak ismertetése nélkülözhetetlen az életkor-függő perifériás keringésszabályozás megértéséhez.

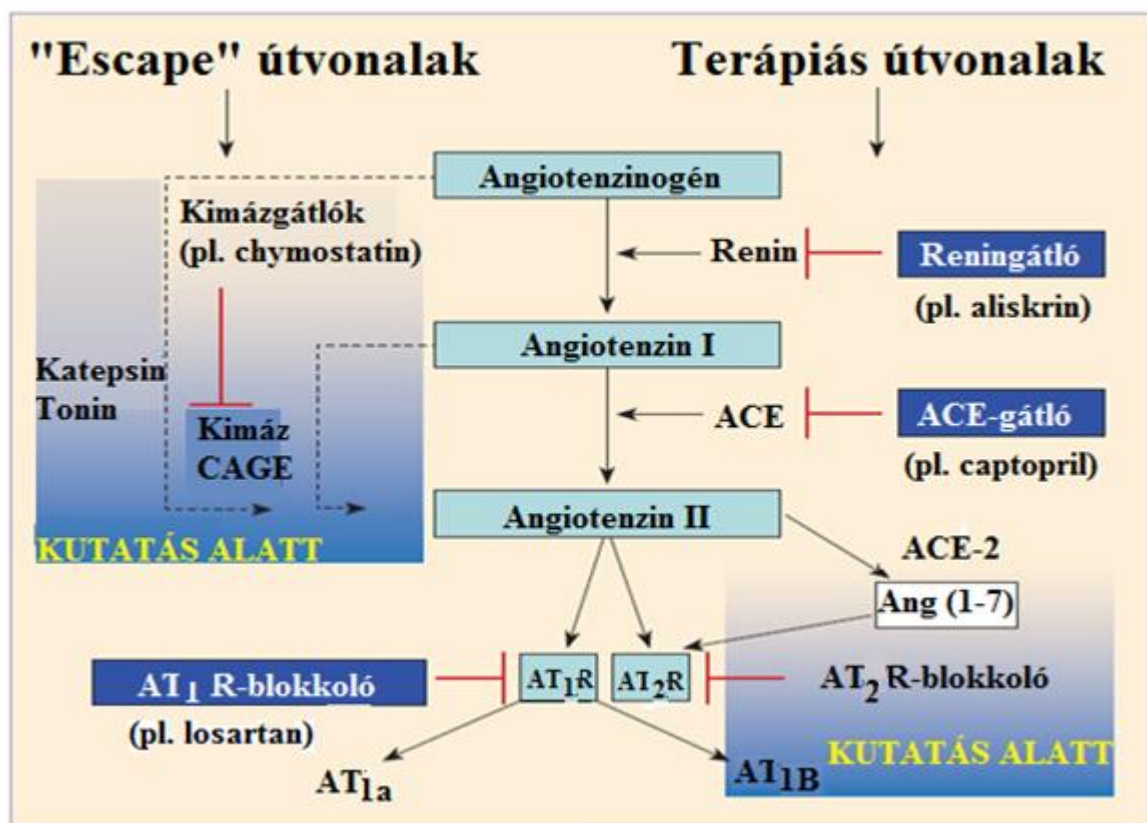
1.3.1 A szisztémás renin–angiotenzin rendszer szerepe a vérnyomás szabályozásában

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) a perifériás érellenállás változtatásával közvetlenül, az aldoszteron elválasztással közvetetten (az extracelluláris folyadékterek tehát az elektrolit/só-víz forgalommal) járul hozzá a vérnyomás szabályozásához (Fonyó, 2013; Ferrao, 2014). Ezen mechanizmusok akkor aktiválódnak, amikor az artériás vérnyomás csökkenésével a veseszövet perfúziója csökken. Ekkor elsődlegesen a vese glomerulus afferens arterioláiban a nyomást és feszülést érzékelő mechanoszenzorok aktiválódnak (pl. nyomásesés a vas afferens területén). Másodlagosan (az antidiuretikus hormon járulékos aktiválódása következtében) a macula densa által a disztális tubulusokban érzékelt folyadék NaCl-koncentráció csökkenése illetve a juxtaglomeruláris aparátushoz futó szimpatikus idegek aktivitásának fokozódása beindítja a vese juxtaglomeruláris sejtjeiben a renin bioszintézisét és szekrécióját (Inagami, 1994; Lizanecz E, 2009; Fonyó, 2011).

A renin felszabadulása a juxtaglomeruláris sejtekből exocitózissal történik. Szekréciójában szerepet játszik továbbá a szimpatikus posztganglionáris rostok, aminek az aktivációja a β_1 -receptorokon keresztül vese juxtaglomeruláris sejtjeiben renin szekréciót vált ki (De Gasparo, 2000). A plazmában keringő renin egy főleg a májban, de a vesében, tüdőben, valamint a zsírban is konstitutívan expresszáladó fehérje (Nguyen, 2002). Feladata az, hogy a májban és a vesében termelődő angiotenzinogén (AGT) C-terminális láncának 10. és 11. aminosavja közötti kötést hasítsa szét, amiből egy decapeptid pro-szegmentum, az ún. angiotenzin I (Ang I) hasad le (Lizanecz E, 2009; Rafiq, 2010). A keringő Ang I mennyiségét és mértékét a keringő plazma renin aktivitása határozza meg (Alistar, 2010). Az Ang I-ből egy dipeptidil-karboxil-cink-metalloproteináz aktivitású enzim, az ún. angiotenzin-konvertáz enzim (ACE) hatására egy Ang II nevű oktapeptid képződik (Bernstein, 1993) (1. ábra). Az

ACE legmagasabb koncentrációban, a vese, a tüdő és az erek endotélium rétegében fordul elő (Leite, 1997; Singh, 2010; Izzo, 2011). Az Ang I-ből az ACE aktivitástól független útvonalakon keresztül is, különböző szöveti endopeptidázok (ACE-2, kimáz, chymostatin-sensitive angiotensin II-generating enzyme (CAGE), katepsin) hatására Ang II és más biológiailag aktív peptid (Ang 1-7) is keletkezhet (Chappel, 2014) (1. ábra). Ezen útvonalak pontos élettani szerepe még ma sem teljesen ismert, és ezért kutatások középpontjában áll (Ramírez-Sánchez, 2013; Izzo, 2011). A RAS szabályozásában több kevésbé ismert fehérje, mint például az ACE-2 enzim is részt vesz, habár az Ang I / Ang II átalakulására nincs jelentős befolyása. ACE - gátlókkal az aktivitása nem gátolható (Guo, 2001). Míg a renin és az AGT plazma- koncentrációjának felezési ideje hosszú, addig az angiotenzinázok aktivitásának köszönhetően az Ang II másodpercek alatt inaktív peptidekre bomlik le. Továbbiakban a receptoraihoz való kötődés után a lokális koncentrációja drasztikusan csökken (Hollenberg, 1971; De Gasparo, 2000; Lizanecz, 2009) (1. ábra).

Az Ang II a vesében a vas afferensek szűkítésével, csökkenti a nátrium filtrációját, ugyanakkor reabszorpcióját fokozza. Abban az esetben, ha a plazma nátrium koncentrációja csökken, akkor az Ang II nő, és a mellékvesekéreg zona glomerulosa sejtjeiben aldoszteron szintáz (CYP11B2)-aktiválásán keresztül beindítja az aldoszteron szintézisét és szekrécióját (Hattangady, 2012). Az aldoszteron a vesék gyűjtőcsatornáin lévő mineralokortikoid receptorokon keresztül a nátrium reabszorpciót fokozza és így vizet tart vissza. Ezzel az extracelluláris térfogatot, és ennek következtében a szisztémás vérnyomást is szabályozza (Mandolini, 2005; Hattangady, 2012).



1 ábra: A renin-angiotenzin rendszer egyszerűsített folyamatábrája (Új eredmények a renin-angiotenzin rendszer és a hipertónia kutatásában. Koller, 2011). CAGE: chymostatin-sensitive angiotensin II-generating enzyme; ACE: Angiotensin-konvertáló enzim; AT₁R: angiotenzin-1-Receptor; AT₂R: angiotenzin-2-Receptor.

1.4 A vaszkuláris renin-angiotenzin rendszer

A RAS felfedezését követően felismerték, hogy a RAS enzimrendszere és az Ang II különböző hatásait közvetítő receptorai (AT₁R, AT₂R) megtalálhatóak a kis artériák és arteriolák falában (De Gasparo, 2000; Sayeski, 2001; Cernucan, 2007; Koller 2011). Kimutatták, hogy a vaszkuláris simaizom- és endotélsejtekben jelen lévő ACE, és kimáz, részt vesz az Ang I - Ang II átalakításában (Soltis, 1987; Hecker, 1994). Az Ang I vazomotor működésre és ezen keresztül a vérnyomás-szabályozásra kifejtett direkt hatása jelenleg nem ismert.

Az Ang I - Ang II átalakulását az ACE további két aminosav lehasításával végzi, ami a lokalizáció tekintetében két helyen: az extracelluláris térben és – ami gyakoribb – membránhoz kötötten (pl.: a vaszkuláris endotélium és simaizom (Orfanos, 1999), illetve a neuroepiteliális sejtmembránokon történhet (Balyasnikova, 1998; Orfanos, 1999; Lizanecz, 2009). Az ACE az Ang I hasítása mellett képes a kallikrein hatására kininogénből képződő bradikinin (BK) és kallidin inaktiválására is (Vivian, 2009; Fonyó 2014). A BK egy erős vazodilatátor hatású nonapeptid, hatását a BK-B₁ és BK-B₂ receptoron keresztül fejti ki G-proteinhez kapcsoltan (GPCR) (Beril, 2002). Az ACE gátlásával a BK degradációja csökken, ebből következően, ha a plazma koncentrációja növekszik (Bas, 2007), értágító hatása révén csökkenti a perifériás vaszkuláris ellenállást. Az Ang II vazokonstriktor hatása az AT₁R keresztül érvényesül, amit dolgozat későbbi fejezeteiben ismertetünk. (1. ábra).

1.5 Az angiotenzin II receptorai

1.5.1 Az AT₁-Receptor

Az Ang II valamennyi celluláris hatását beleértve a sejtnövekedést és sejtproliferációt, az adrenális szteroidszintézist és aldoszteron szekréciót az AT₁R közvetítésével éri el (De Gasparo, 2000). Emberben az AT₁R a 3q21–3q25 kromoszómahelyeken kódolódik, míg a patkányban az AT_{1a}R-on mind a négy exonja a 17. az AT_{1b}-Receptor (AT_{1b}R) mind a három exonja a 2. kromoszómán található. Rágcsálókban az AT_{1a}R és AT_{1b}R receptorok expressziója szövetenként eltérő (De Gasparo, 2000; Szidonya, 2007; Inagami, 2008). Az AT_{1a}R előfordulása inkább a kardiovaszkuláris rendszerre, míg az AT_{1b}R expressziója az endokrin (hipofízis és mellékvesekéreg) szövetekre jellemző (Szidonya, 2007). A szisztémás hatásai mellett, a lokális keringés-szabályozásban az Ang II-AT₁R kapcsolatnak van a legnagyobb jelentősége. Az Ang II az AT₁R kapcsolódásával vazokonstriktort vált ki. Az

Ang II tovább serkenti az endotelin-1 szintézisét is, amivel hasonlóan G_q -fehérje közvetített vazokontrakciót vált ki (Paul, 1995; Guo, 2001). Vazomotor hatása mellett, Takeda-Matsubara és munkatársai igazolták, hogy az AT_1R -aktiválásával ERK/MAPK útvonal révén számos növekedési faktor (pl.: epiteliális növekedési faktor) receptora transzaktiválódik és már intrauterin korban bekapcsolódik a folyamatos növekedés fenntartásában (Allen, 2000; Takeda-Matsubara, 2003).

1.5.1.1 Az AT_1 -Receptorhoz kapcsolódó szubcelluláris jelátvitel

Az Ang II az AT_1R -hoz kötődve G -fehérjéhez kapcsolt receptor kinázok (GRK) foszforilálják, majd a receptor β -arresztinnel való kötődést követően deszenzitizálódik. A receptor/arresztin komplex transzlokálódik, ahol a β -arresztin klatrinnal és foszfoinozitiddel képez komplexet, ami beindítja az internalizációt (Gáborik, 2001). Az internalizálódott receptorok a sejten belül vagy a lebomlás (korai – késői endoszómák) vagy a recirkuláció útjára kerülnek (Szidonya, 2007). Az AT_1R aktiváció során számos gén expresszió, aktív citoszkeleton válasz, vezikuláris transzportfolyamat, mikrotubuláris strukturális átalakulás következik be (Hunyadi, 2006). Az angiotensin II receptor - associated protein (ATRAP) közvetítette jelátviteli utakon keresztül számos fehérje, köztük a JAK-2 kináz, Rho-kináz, CPI-17 illetve p-MYPT aktiválódik és közvetítik a kontrakció kialakításában, amit izolált ereken gyors relaxáció követ (Gáborik, 2001; Hunyadi, 2006) (16. ábra).

1.5.2 Életkor hatása az AT_1 -Receptorra

Az AT_1R -expressziója az agy-, és májszövetben főtális kortól öregkorig csökken, ugyanakkor a veseszövetben az expresszió tekintetében nem találtak korfüggő eltérést (Mao, 2009). A főtális életben az AT_1R vaszkuláris expressziója a posztnatális AT_1R expresszióval

összehasonlítva magasabb; tehát újszülött-kortól felnőtt korig fokozatosan csökken (Yu, 2010). Mao és munkatársai szerint az AT₁R csecsemő és gyermekkorban - a kardiovaszkuláris és folyadékháztartás szabályozása mellett – sokkal inkább a sejtregenerációt, illetve az apoptózist szabályozza. Ebből is következik, hogy csecsemő és gyermekkorban az AT₁R elsősorban nem a vaszkuláris ellenállás szabályozásában, hanem sokkal inkább a szövetek növekedésében és differenciálódásában játszik fontos szerepet (Mao, 1999). Tehát az AT₁R vérnyomás szabályozása mellett növekedési hormon is egyben (Wang, 2010).

1.5.2.1 Életkor hatása a vaszkuláris AT₁-Receptorra

Az egészséges öregedéssel a lokális vaszkuláris szabályozási mechanizmusok számos változáson mennek keresztül (Marin, 1999; Min, 2009). Számos, egymásnak ellentmondó tanulmány foglalkozik az endotélium és a simaizom által mediált konstriktor és dilatátor mechanizmusok korfüggő változásaival (Marin, 1999; Min, 2009; De Gasparo 2010). Hall és munkatársai kimutatták, hogy az életkor előrehaladtával a coronaria-erek endotél-függő dilatációja, illetve endotéliumtól független kontrakciós képessége fokozódik (Hall, 1995, Bagi, 2011). Ugyanakkor Marin és munkatársai a kolinerg–muszkarinerg-cGMP közvetített vazodilatáció, valamint az endoteliális NO-szintézis korral való csökkenését írta le (Marin J, 1999). Egy korábbi vizsgálatból (Basso, 2007) szeretnénk kiemelni egy olyan eredményt, ahol fiatal felnőtt (6 hónapos) és idős felnőtt (18 hónapos) Wistar patkányokat tartós (6 hónap) ACEI (enalapril) - és AT₁R-blokkoló (AT₁R-B) (losartan) – kezelésben részesítettek. Ezt követően vizsgálták a szív és az aorta tömegét, amit hasonló korú, nem kezelt patkányok szívével és aortájával hasonlítottak össze. ACEI és AT₁R-B kezelés hatására mind a szív, mind pedig az aorta tömege csökkent. Az erek falában mért kollagén és szívizomban mért miocita mennyisége is csökkent a RAS gátlókkal nem kezelt állatok szerveihez képest

valamennyi korosztályban (Basso, 2007). Ezen eredmények arra is utalnak, hogy az Ang II fontos szerepet játszik a vaszkuláris öregedés kialakulásában és annak progressziójában.

1.5.3 Az AT₂-Receptor

Az Ang II az AT₂R aktiválásával feltehetően vazodilatátor hatást eredményez (Widdop, 2008). Ezen hatást Widdop és munkatársai coronáriákban és mesenterialis artériákban BK és NO felszabadulásával járó mechanizmusokhoz kötik (Widdop, 2008). Ugyanakkor Brouwers és munkatársai izolált vese artériákban végzett kísérletei, NO és dilatátor prosztaglandinok szerepét igazolták a jelenség hátterében. (Brouwers, 2013). Érdekes azonban, hogy míg a BK dilatátor hatását a vérnyomás-szabályozás depresszor rendszeréhez kötik, addig kísérletes körülmények között az AT₂R-blokkoló (PD123319) érdemben nem befolyásolta az Ang II stimuláció hatására jelentkező inozitol-foszfát felhalmozódást, valamint az AT₁R által közvetített vazokontrakciót (Dudley, 1990). Az AT₂R jelenlétét az érfalban autoradiográfiával több munkacsoport igazolta (Dong, 2005; Li, 2012), ugyanakkor a vazomotor működésben betöltött hatása kellőképpen nem tisztázott. A vazomotor hatása mellett felvetik, hogy az AT₂R antiproliferatív és apoptotikus hatásokat közvetít a vaszkuláris szövetekben (Nguyen, 2011).

1.5.3.1 Életkor hatása a vaszkuláris AT₂-Receptorra

Bonnet és munkatársai szerint, az AT₂R az intrauterin növekedés és organogenezis szempontjából kulcsfontosságú receptor, habár a születést követő expressziója gyorsan csökken (Bonnet, 2001; Carey, 2005). Más kutatások ennek ellentmondóan a főtális életkortól az öregkorig, az AT₂R expresszió fokozatosan növekedését írták le patkányok agy-, máj- és vese szöveteiben (Widdop, 2008; Yu, 2010). Bonnet szerint felnőttekben az AT₂R

expressziója kórfolyamatokban, mint pl. a vaszkuláris remodellingben, illetve hipertóniában válik kifejezetté (Bonnet, 2001). Az eddigi ellentmondásos eredmények alapján ma még nem tudhatjuk biztosan, hogy pontosan mi az AT₂R vaszkuláris és egyéb funkcionális szerepe, és hogy valójában milyen terápiás célpontot képezhet (Danser, 2003).

2 A KUTATÁS ELŐZMÉNYEINEK ÁTTEKINTÉSE

2.1 Életkor hatása a vérkeringésre és annak szabályozására

A kardiovaszkuláris rendszer koraal bekövetkező funkcionális és morfológiai (celluláris és molekuláris) változásai régóta a keringéskutatók érdeklődésének középpontjában állnak. A születést követően a magzati korban jelenlevő söntök (pl. ductus Botalli, ductus venosus Arantii és a foramen ovale) záródnak, ezért a vérkeringésben lévő nyomásviszonyok megváltoznak (Langmann, 2013). Megindul az elkülönült kisvérköri és nagyvérköri keringés, amivel az újszülött felkészült a megváltozott életfeltételekre (pl.: a placentától független gázcsere) (Langman, 2013). A keringés szabályozása elsődlegesen a perctérfogat és a folyadékhiánytartás szabályozásával történik. A fejlődéssel folyamatosan érvényesülnek a perifériás keringés-szabályozásában fontos szerepet játszó vazokonstriktorok és vazodilatátor faktorok is (Falkner, 1979).

Az öregedéssel a szív-érrendszer funkcionálisan és strukturálisan is jelentősen átalakul. A szívben a legáltalánosabb öregkori változás a szívüregek dilatációja (különösen a bal pitvaré), a perctérfogat-, valamint a szívfrekvencia csökkenése (Assayag, 1997; Székely, 2013). Az érrendszer, beleértve a perifériás erek vazomotor működése is változásokon megy keresztül (Marin, 1999). Tankönyvi megállapítás, hogy a nagyerek, különösen az aorta fala koraal egyre merevebbé válik és kitégüli. Így az aorta elasztikus tulajdonságai súlyosan károsodnak, ami hozzájárulhat az erek szélkazanfunkciójának csökkenéséhez és a szisztolés vérnyomás emelkedéséhez (Székely, 2013). A vaszkuláris simaizomsejtek aktív nyomása és feszülése a plazmában jelenlevő illetve a szövetekből felszabaduló humorális vazoaktív anyagok együttesen szabályozzák. A keringő katekolaminok mellett a perifériás vazomotor

szabályozásban kiemelkedően fontos szerepe van a renin angiotenzin rendszernek is, aminek plazma koncentrációja és effektivitás az életkor előrehaladtával változik.

2.2 Életkor hatása az Angiotenzin II működésére

Az Ang II, mint a RAS fő effektor molekulája az AT₁R aktiválásán keresztül számos endokrin / parakrin hatása mellett a perifériás vaszkuláris ellenállás szabályozásában is részt vesz (De Gasparo, 2000; Escobales, 2009). Továbbá szerepet játszik a vaszkuláris gyulladásos folyamatok beindításában (Csiszár, 2012), valamint a remodellingben (Touyz, 2003). Az öregedés az erek dilatátor képességét csökkenti, így hozzájárul a perifériás vaszkuláris ellenállás szabályozásának beszűküléséhez (Chamiot-Clerc, 2001; Fonyó, 2014). Ugyanakkor, sokkal kevesebbet tudunk arra vonatkozóan, hogy az életkor miként módosítja az erek – ezen belül az Ang II-indukálta konstriktós válaszkésztséget, mely elsősorban a simaizom kontraktilis működésétől függ. Korábban izolált ereken végzett vizsgálatok öregedéssel az Ang II - indukálta kontrakció csökkenését írták le patkány mellkasi aorta preparátumokon (Wakabayashi, 1990), míg mások nem találtak különbséget 1-18 hónapos normotenziós Wistar-Kyoto hím patkányok, basilaris és mesenterialis artériák Ang II- indukálta konstriktor válaszai között (Moreau, 1998). Ugyanakkor, Konishi és munkatársai a konstriktor válasz erősségének csökkenését találta (mesenterialis ereken) 1-8 hónapos normotenziós patkány korcsoportok között (Konishi, 1997). Saito és munkatársai spontán hipertóniás patkányokban korral az Ang II-indukálta kontraktilitás fokozódását mutatták ki izolált coronaria ereken (Saito, 1998). Az irodalomban található ellentmondásos eredményekre számos lehetséges magyarázat tételezhető fel, pl.: a különböző életkorú illetve patkánytörzsű kísérleti patkányok, a különböző ereken illetve különböző módszerrel (izotóniás vs. izometriás rendszerek, in vivo mérések vs. in vitro) végzett kísérletek. További lehetséges magyarázat, hogy patológiás

körülmények jelenléte, mint például a magas intralumináris nyomás, aminek következtében az AT₁R expressziója illetve funkcionális aktiválhatósága nőhet (Dudley, 1990; Bagi, 2008; Escobales, 2009).

Az ismételt Ang II hozzáadása során jelentkező válaszok kontrakciós erejének csökkenés (tachyphylaxia) illetve annak hátterében lévő mechanizmusok folyamatos kutatások témája (Hollenberg, 1971; Bagi, 2007). Ugyanakkor, hogy ez jelenség hogyan és miként változik az életkor függvényében ez idáig nem pontosan ismert. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai (Bagi, 2008) igazolták, hogy az ismételt hozzáadások következtében létrejövő kontrakciós erő csökkenés hátterében az AT₁R internalizációja és deszenzitizációja áll (Lefkowitz, 1998, Hunyady, 2000).

2.3 Életkor hatása az AT₁R expressziójára

Korábbi kutatások kimutatták, hogy az AT₁R expressziója és eloszlása ugyanakkor nem homogén az egyes korcsoportokban és szöveteken belül (Yu, 2010). Az újszülött (7 napos) patkány agyszövetében Western blottal mért AT₁R expresszió fiatal kortól (2 hónapos) öregkorra (28 hónapos) csökken, míg a teljes veseszövetben hasonló módszerrel vizsgált AT₁R mennyisége szignifikánsan nem különbözik újszülött (7 napos), fiatal (2 hónapos) és az öreg (28 hónapos) Sprague–Dawley patkányokban (Yu, 2010). Számos vizsgálat igazolta, hogy az életkor, illetve az öregedés meghatározó tényező az artériás rendszer vazomotor működésének beszűkülésén keresztül a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásában (Docherty 1990; Escobales, 2009). Jelenleg mégis nagyon keveset tudunk arról, hogy az öregedés hogyan és miként módosítja az erek Ang II-indukálta vazomotor válaszait, a tachyphylaxia, valamint az érfalban mérhető AT₁R-mRNS és fehérje expresszióját.

Ezen kérdések fontosságát az is hangsúlyozza, hogy az Ang II kulcsfontosságú, számos érbetegség kialakulásában, mint például a hipertóniában és a diabetes mellitusban (McEniery, 2007; Diz, 2008; Mao, 2009; Bagi, 2011). Ezért a korfüggő vaszkuláris változások megismerése hozzájárul többek között a coronaria- és cerebrovaszkuláris keringéshez társuló öregkori állapotváltozások megértéséhez (Docherty, 1990).

3 HIPOTÉZISEK

A jelen értékezés alapját képező kutatásban feltételeztük, hogy patkányban újszülött-kortól - aggastyán-korig:

- 1) az invazívan mért artériás középnyomás (MABP) változik;

Az izolált artéria carotis communisokban:

- 2) az Ang II hozzáadás során kapott kontrakciók maximális ereje és a válasz karakterisztikája az életkorral változik;
- 3) az ismételt Ang II hozzáadás során kapott kontrakciós erő csökken; tachyphylaxia alakul ki, ami az életkorral változik;
- 4) az Ang II-indukálta kontrakció AT_1R -tól, az endotéliumtól és AT_2R -tól függetlenül közvetítődik;
- 5) az AT_1R -ok döntően az erek simaizom rétegében helyezkednek el;
- 6) az AT_1R -mRNS és AT_1R -fehérje expressziója, valamint az AT_2R expressziója változik.

4 CÉLOK

A hipotéziseink bizonyításához, különböző korú patkányból izolált carotis communis artériák vazomotor válaszait vizsgáltuk, majd ezen erekben az AT_1R expresszióját qRT-PCR és Western blot technikával, lokalizációját immunohisztokémiai módszerrel vizsgáltuk. Az izolált ér technika lehetővé teszi, az artériák un. intrinsic funkcióinak és mechanizmusainak

vizsgálatá, anélkül, hogy az idegi, metabolikus és humorális hatások befolyásolnák. Kísérleteinkhez carotis artériákat használtunk, mivel Rothwell és munkatársai korábban igazolták, hogy a carotis artériákban talált morfológiai és funkcionális válaszok tükrözik a coronaria és az agyi erek szerkezetében és működésében lejátszódó folyamatokat (Rothwell, 2001).

5 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1 Kísérleti állatok, altatás és eutanázia

A kísérleteinkhez különböző korú Wistar hím patkányokat használtunk (n=58). A kísérleteink során az alábbi korcsoportokat vizsgáltuk: 8 napos (n=8), 1 (n=8), 2 (n=8), 6 (n=8), 9 (n=8), 12 (n=8), 24 (n=5) és 30 (n=5) hónapos. Az patkányokat egyenként, kb. 3-5 cm magasan forgáccsal bélelt műanyag aljú ketrecekben tartottuk, ahol a rágcsálótáp és csapvíz *ad libitum* rendelkezésre állt. Az állatok tartása és a különböző beavatkozások elvégzése az alapvető állatkísérletes etikai normák szerint, a Pécsi Tudományegyetem Állatkísérleti Etikai Bizottságának engedélyével (BA 02/2000-13/2008) történt. A műtéti előkészítés, valamint az altatás alatt az állatokat fűtött (37°C) műtőpadra helyeztük. A patkányokat intraperitoneálisan adott ketamin és xylazinnal (78 mg/kg Calypsol [Richter] és 13 mg/kg [Eurovet]) altattuk és érzéstelenítettük el. A műtétek végén az állatok eutanáziáját intrakardiálisan adott 20 % -os KCl oldattal végeztük (Parasuraman, 2010; Veresh, 2012).

5.2 Műtétek

5.2.1 Invazív artériás vérnyomásmérés

Az altatott patkányok bal oldali carotis communis artériáiba egy fiziológiás sóoldattal feltöltött polietilén katétert vezetünk, majd a kanült egy nyomás-transducerhez (Experimetria,

Budapest, Magyarország) csatlakoztattuk. A szisztolés és diasztolés vérnyomás értékeket folyamatosan, digitálisan az ISOSYS program segítségével rögzítettük (ISOSYS, Experimetria, Budapest, Magyarország), majd a kapott értékekből az artériás középnyomást (MABP) számítottuk ki (Ordodi, 2005; Subramani Parasuraman, 2012).

5.2.2 A carotis communis artériák izolálása

Az altatást követően az ellenoldali artéria carotis communisokat egy Olympus operációs mikroszkóp alatt mikrosebészeti módszerekkel izoláltuk, a kötőszövettől és nervus vagustól megtisztítottuk. A kivett artériákat egy 4°C hőmérsékletű 95%-O₂, 5%-CO₂ gázkeverékkel átbuborékolatott Krebs-oldatban 5 mm-es érgyűrűkre vágtuk fel (Fesus, 2007; Patel, 2014).

5.3 Funkcionális mérések

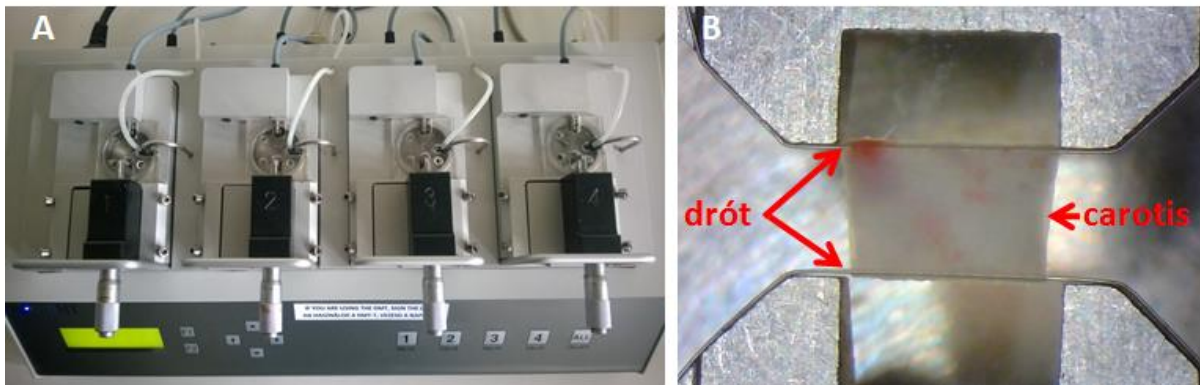
5.3.1 Az Ang II-indukálta kontrakció vizsgálata izolált patkány carotis artérián

Az izometriás falfeszülés mérésére egy négy szervfördőt tartalmazó – DMT 610M (Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Dánia) izometriás miográfot használtunk (2/a ábra). Az érgyűrűbe két-két rozsdamentes acélból készült drótot vezettünk (átmérő 0.04 mm) majd azokat egy 5 ml térfogatú, 36.8°C-ra előmelegített, O₂ (95%) és CO₂ (5%) gázkeverékkel oxigenizált Krebs oldatot tartalmazó szervfördőkben helyeztük el (2/a ábra). Ezt követően az ereket előfeszítettük a saját hosszukra vonatkoztatott izometriás feszülés értékre (13.34 mN). Ez megfelel az adott ér in vivo mérhető artériás középnyomás értékének. A 7.4 pH-jú Krebs-oldat 110 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.0 mM MgSO₄, 1.0 mM KH₂PO₄, 5.5 mM glükóz és 24.0 mM NaHCO₃ tartalmaz. Az ereket az előfeszítést követően 60 percig inkubáltuk. Az inkubációt követően, a kísérlet kezdetén (és végén) meghatároztuk a 60 mM

KCl hozzáadásra kapott maximális izometriás kontrakciós erőt. A kapott kontrakciókat mN-ban mértük. A kísérlet sematikus folyamatábráját a 2/b ábrán mutatjuk be.

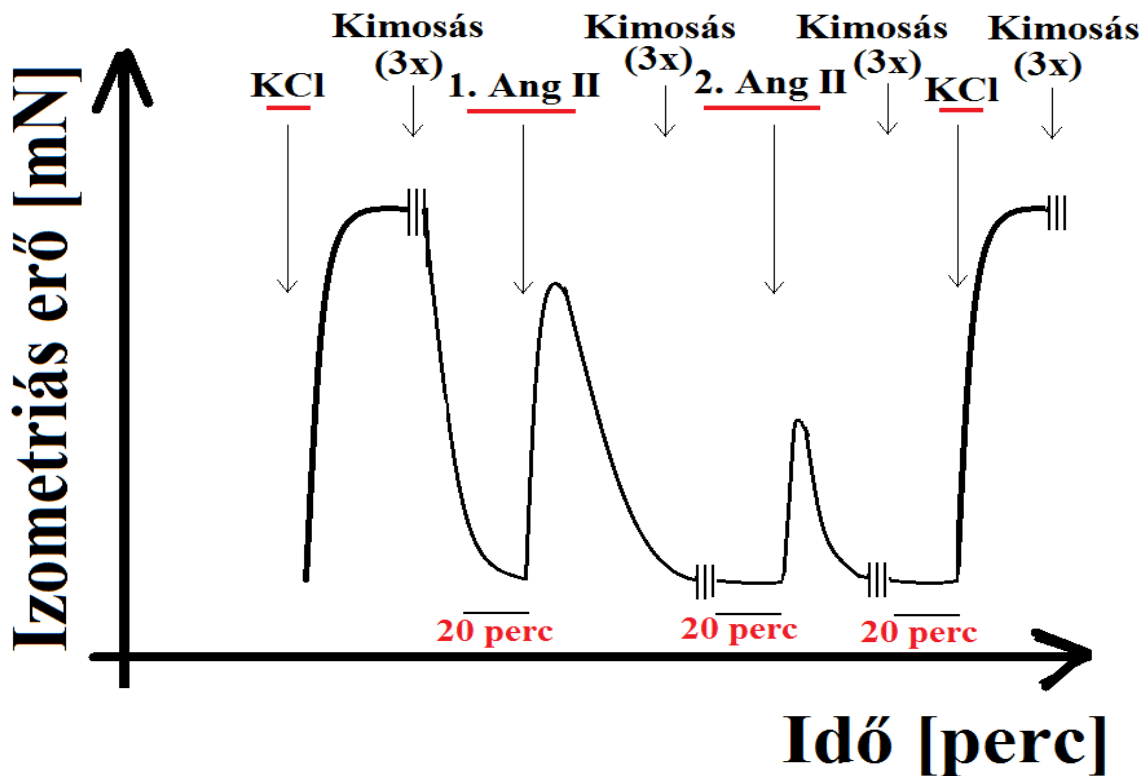
5.3.2 Az ismételt Ang II-indukálta kontrakció mérése izolált patkány carotis artérián

Az artériák kontrakcióját ismételt Ang II hozzáadására (1.-hozzáadás és 2.-hozzáadás) valamennyi korcsoportban vizsgáltuk. Az első Ang II-indukálta kontrakció lezajlását követően a szervfürdőt háromszor Krebs oldattal átmostuk, majd a következő Ang II hozzáadásáig 20 percet vártunk. Ez az időt előzetesen kísérletek során határoztuk meg, ami elégségesnek bizonyult az ismételt Ang II hozzáadás során tapasztalat tachyphylaxia jelenség kialakulásához (Chiba, 1986). Előzetes méréseink szerint a hosszabb (60-70 perces) időközönként végzett Ang II hozzáadás ismétlés során tachyphylaxia nem fejlődik ki. A tachyphylaxia mértékét a második és az első hozzáadások során kapott maximális kontrakciós erők "csúcs" különbségéből határoztuk meg.



2/a. ábra: A. DMT610M (Danish Myo Technology, A/S, Aarhus, Dánia) négy csatornás izometriás miográf készülék; B. A DMT610M egyik szervfürdőjében két 0.04 mm-es dróttal előfeszített patkány artéria carotis communis látható. Az alsó drót egy fixen rögzített

mérőfejhez, míg a felső drót egy mérő-transzducerfejhez van rögzítve. Az értéket a számítógéphez csatolt Power Lab-rendszeren keresztül is rögzítettük.



2/b ábra: Patkány (2 hónapos) carotis artéria KCl (60mM) és ismételt [20 perc] Ang II hozzáadására adott izometriás kontrakciója az idő függvényében. A vazomotor válaszok lezajlását követően az érfürdőt háromszor Krebs-oldattal mostuk át.

5.3.3 Patkány carotis artériák Ang II-indukálta kontrakciós görbéinek karakterizálása

A jelen dolgozatban az Ang II-indukálta kontrakciós (hozzáadást követően a maximális kontrakciós erő elérésig: "csúcs"), és relaxációs időt ("csúcs"-tól a relaxáció 90%-ig) számítottuk ki, amit másodpercben fejeztük ki (n=5). Későbbi munkánkban tervezzük a kontrakciós görbék részletesebb matematikai elemzését.

5.3.4 Az AT₁R, az AT₂R és az endotélium szerepe az Ang II-indukálta kontrakcióban, izolált patkány carotis artérián

A vaszkuláris endotélium réteget az ereken áthúzott lenszőke hajszállal (50 µm) távolítottuk el. A endotélium funkcionális jelenlétét illetve hiányát endotélium-függő vazodilatátorral: acetilkolinnal teszteltük (Furchgott, 1987; Fesus, 2007; Bagi, 2008; Veresh, 2011). Egy másik kísérlet sorozatban, az Ang II-indukálta kontrakciót AT₁R blokkoló (Losartan) jelenlétében és hiányában is vizsgáltuk. Korábbi kutatásokban leírtakkal megegyezően, Losartannal 20 percig inkubáltuk az ereket, az ismételt Ang II hozzáadások előtt (Fesus, 2007). Egy szintén másik kísérlet sorozatban, az Ang II-indukálta kontrakciót AT₂R blokkoló (PD-123319) jelenlétében és hiányában is vizsgáltuk. Korábbi kutatásokban leírtak szerint, PD-123319-el 20 percig inkubáltuk az ereket az ismételt Ang II hozzáadása előtt (Bagi, 2008).

5.4 Vazomotor vizsgálatok során használt anyagok

A hatóanyagokat minden alkalommal a kísérlet reggelén, fiziológias sóoldatban, frissen oldottuk fel. A használatig -20°C illetve +4°C-on tároltuk őket, az adott anyag hivatalos gyártó által forgalmazott felhasználási útmutatója szerint. A funkcionális vizsgálatok során használt anyagok dózisa és koncentrációja a kísérletsorozatok elején végzett dózis-hatásválasz alapján titráltuk ki. Ez minden esetben megegyezett, az irodalomban közölt hasonlóan kivitelezett kutatások során használt koncentrációkkal (Chiba, 1986 Bagi, 2008)

Hatóanyag	Receptor	Végkoncentráció	Támadási helye	Gyártó
Angiotenzin II	AT ₁ R (és AT ₂ R)	10 ⁻⁷ Mol	endotélium független	Sigma- Aldrich
Losartan	AT ₁ R	10 ⁻⁶ Mol	endotélium független	Sigma- Aldrich
PD-123319	AT ₂ R	10 ⁻⁵ Mol	endotélium független	Sigma- Aldrich
Acetilkolin	muszkarin- receptor	10 ⁻⁷ Mol	endotélium függő	Sigma- Aldrich

1. táblázat: A táblázat a kísérletek során használt hatóanyagok illetve azok feltételezett támadási helyét sorolja fel. Losartannal az AT₁R-t, míg a PD-123319 anyaggal az AT₂R-t blokkoltuk. Acetilkolinnal a vaszkuláris endotélium funkcionális jelenlétét illetve hiányát igazoltuk. Végkoncentráció alatt az adott hatóanyag érfürdőben mérhető koncentrációját értjük. A gyártó és a forgalmazó valamennyi hatóanyagnál a Sigma-Aldrich Kft volt (Budapest, Magyarország).

5.5 A vaszkuláris AT₁R immunohisztokémiai kimutatása

Az altatást követően, a carotis communis artériákat mikrosebészeti módszerekkel izoláltuk, majd azokat 6%-os pufferelt formaldehidben fixáltuk. A szövetrészeket csapvízben átmostuk, majd felszálló alkohol soron víztelenítettük. Intermedierként xilolt használtuk és paraffinos átitatás után végül paraffinba ágyasztuk őket. Valamennyi érmintából 6-8 db, 3-4 µm vékony metszetet készítettünk. A metszeteket xilollal deparaffináltuk és leszálló alkohol soron rehidráltuk. Desztillált vízben öblítés után az antigént citrát pufferben (pH: 6.0), 3 x 5 percig 700-750 W-on tártuk fel, majd szobahőmérsékleten (SZH) Tris(hydroxymethyl)aminometán (TRIS)-el (pH 7.4-7.6; 0.5M puffer) öblítettük. Az endogén peroxidáz gátlásra 10 percig 3%-os vizes hidrogénperoxid oldatot alkalmaztunk (Diniz, 2007; Greig, 2014). TRIS mosás után – háttérgátlásra - 20 percig 1%-os lószérumot használtuk. Ezután a metszeteket nyúl poliklonális AT₁-antitesttel (Santa Cruz Biotechnology, SantaCruz

CA) TRIS-ben 1:100 hígításban egy éjszaka keresztül 4°C fokon inkubáltuk. A metszeteket 3-szor öblítettük TRIS-ben, az AT₁R detektálásra (30 perc SZH) EnVision (DAKO)-t alkalmaztunk. Ezt követően a metszeteket 3-szor TRIS-ben átöblítettük, majd 3,3-diaminobenzidin tetrahidrokloriddal (DAB: hidrogén peroxiddal aktiválva) mikroszkóp alatt megfestettük. 10 perces desztillált vízben való öblítés után, a metszeteket haematoxilinnal felülfestettük, kékítettük, felszálló alkohol soron víztelenítettük, majd xilol öblítés után Pertexxel lefedtük. Negatív kontrollnak ugyanezt az eljárást alkalmaztuk, a primer specifikus antitest elhagyásával. A felvételeket Leitz Laborlux D mikroszkópra rögzítetett Olympus E 450 típusú kamerával készítettük. Az immunohisztológiai eljárás Diniz és munkatársai leírása alapján végeztük (Diniz, 2007).

5.6 Molekuláris biológiai mérések

5.6.1 A vaszkuláris AT₁R-fehérje expressziójának vizsgálata Western blottal

Korábbi közleményekhez hasonlóan (Bartha, 2009) a carotis artériákat 4°C fokos 8.0 pH-, 50 mM-os Tris pufferben homogenizáltuk, amely 1:1000 proteáz inhibitor koktélt és 50 mM nátrium metavanadátot tartalmazott (Sigma–Aldrich Co., Budapest, Magyarország), majd 2x-es töménységű nátrium dodecyl sulfát–poliakrilamid elektroforézis gél (SDS poliakrilamid gél) elektroforézis-minta pufferben folytattuk. A fehérjéket 10%-os SDS-poliakrilamid gélen választottuk szét, majd Protran nitrocellulóz membránra transzferáltuk őket. Két órás, 3% - os zsírmentes tej tartalmú Tris pufferált sóoldatban történő blokkolás után a membránokat egész éjszakán át 40°C-on az elsődleges antitesttel inkubáltuk (1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc.). Ezt követően a membránokat 6-szor 5 percen keresztül átmostuk egy 0.2 %-os Tween-t tartalmazó, 7.5 pH-jú Tris pufferben, azelőtt hogy a kecske anti-nyúl torna peroxidáz-konjugáltmásodlagos antitestet hozzáadtuk volna (1:3000, Bio-Rad, Budapest,

Magyarország). A kialakult komplexeket a "fokozott" kemilumineszcencia módszerével tettük láthatóvá. Szkennelést követően az eredményeket a NIH ImageJ program segítségével értékeltük (Bartha, 2009). A glicerín-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) használtuk pozitív kontrollként, hiszen az konstans mennyiségben volt jelen valamennyi korcsoport carotis artériáiban. A GAPDH detektálása GAPDH (D16H11) XP Rabbit mAB-antitesttel történt (Cell Signaling, Technology, Budapest), és minthogy a GAPDH housekeeping fehérje, töltési kontrollként is használható.

5.6.2 A vaszkuláris AT₁R-mRNS és AT₂R-mRNS expresszió vizsgálata qRT-PCR-rel

Az izolált carotis artériákban az AT₁R és AT₂R expresszió meghatározásához mRNS extrakciót és kvantitatív reverz-transzkriptáz polymerase chain reakciót (qRT-PCR) használtunk. A különböző korú patkányok mindkét oldali carotis ereiből a teljes RNS extraktumot izoláltuk, majd 0.5 µg RNS-t oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer segítségével reverz transzkripcióval írtuk át komplement DNS (cDNS) molekulává amit real-time PCR-el amplifikáltuk. A komplement DNS-ből 1µl-t használtunk. Az amplifikáció 10 perces 95°C-on történő inkubációt követően 45 x 95°C 15 másodpercig, 60°C 30 másodpercig és 72°C 30 másodpercig tartó reakcióban zajlott (Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix, Fermentas, Burlington, Ontario, Canada). A mérés egy Chromo 4 System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) készülékkel történt. A 18S RNS housekeeping génre normalizált target gén relatív expressziójának statisztikai analízise $\Delta\Delta C_t$ -módszer alapján egy Opticon Monitor 3.1-es verzió (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) segítségével végeztük korábban leírtak szerint (Sechi, 1996; Zhang, 2002). Az eredményeket a nemzetközi irodalomban használt ún. "fold changes"-ben fejeztük ki és ábrázoltuk. Ennek az a lényege, hogy a 8 napos minta expressziójának mértékét vettük "1"-nek, a többi korcsoportban mérhető expressziót ennek többszöröseként adtuk meg.

Receptor / Kontroll	Primer
AT₁	Fwd 5'-GGTTCAAAGCCTGCAAGTGAA-3'
	Rev 5'-GAGTGAGCTGCTTAGCCCAA-3'
AT₂	Fwd 5'-CAATCTGGCTGTGGCTGACTT-3'
	Rev 5'-TGCACATCACAGGTCCAAAGA-3'
18S rRNS	Fwd 5'-TTAAGTCCCTGCCCTTTGTACAC-3'
	Rev 5'-GATCCGAGGGCCTCACTAAAC-3'

2. táblázat: Az AT₁R-mRNS és az AT₂R-mRNS qRT-PCR mérések során a táblázatban felsorolt primereket használtuk.

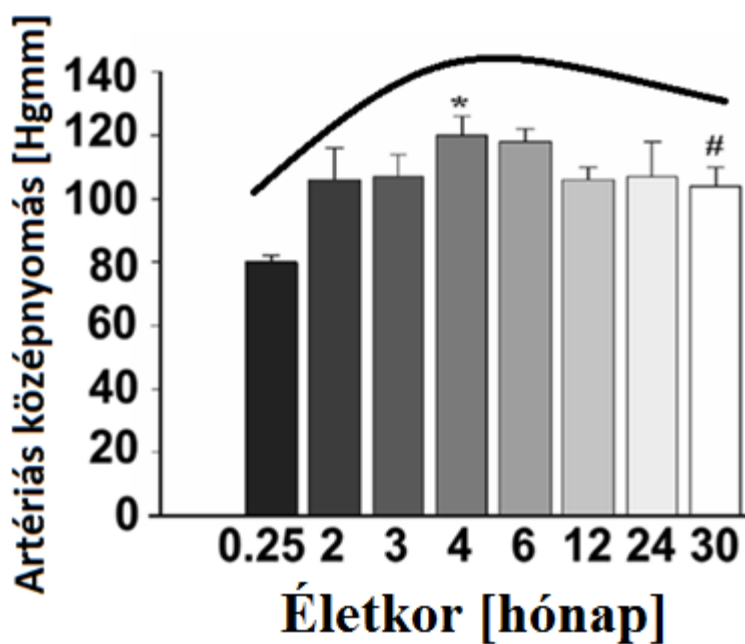
6 STATISZTIKAI MÓDSZEREK

Az eredményeket bemutató ábrákon, valamint a szövegben az adatok átlagát és az átlag standard hibáját (\pm SEM) tüntettük fel, mind a funkcionális, mind pedig a molekuláris biológiai (PCR és Western blot) kísérleteink során. A dolgozatban bemutatott kísérletek eredményeit, valamint az azok között lévő statisztikai különbségeket egyutas-ANOVA és Sheffe-féle post-hoc teszttel igazoltuk. A görbék karakterizálása során kapott adatok közötti statisztikai különbségeket kétmintás t-próbával igazoltuk. Az eredmények közötti különbségeket $p < 0.05$ esetén fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak, amit az ábrákon feltüntetett szimbólumokkal jelöltünk.

7 EREDMÉNYEK

7.1 Patkány artériás középnyomásértékek életkorfüggő alakulása

A 3. ábrán a különböző korú patkányok in vivo mért MABP értékeit tüntettük fel. Eredményeink azt mutatják, hogy az altatott patkányok MABP értékei korfüggő eloszlást mutatnak: azaz újszülött kortól (0.25 hónap: 80 ± 2 Hgmm) felnőtt korig (4 hónap: 120 ± 6 Hgmm) nőtt, majd aggastyán korra (30 hónap: 104 ± 6 Hgmm) csökkent (3. ábra).



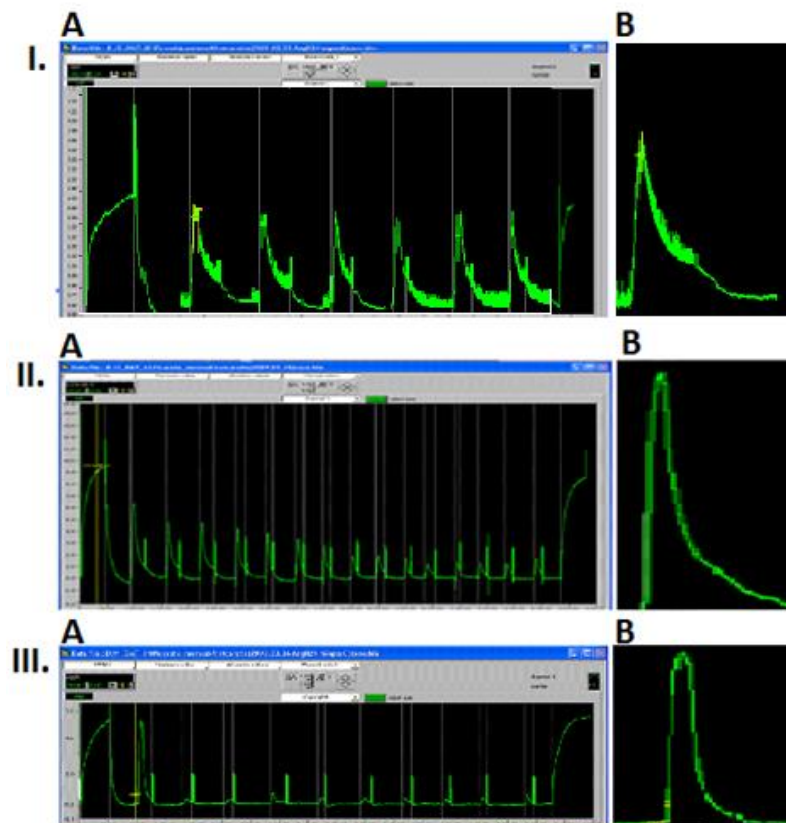
3. ábra: Patkány artériás középnyomásértékek életkorfüggő alakulása. "*" jelzi a szignifikáns különbséget a 0.25 és 4 hónapos, míg "#": a 4 és 30 hónapos patkányok vérnyomásértékei között $p < 0.05$; ($n = 5$).

7.2 Az izolált carotis artériák kontrakciós erejének vizsgálata

Kísérleteinkben az izolált carotis artériák Ang II-re adott kontrakciós erejének korfüggő változásait mértük.

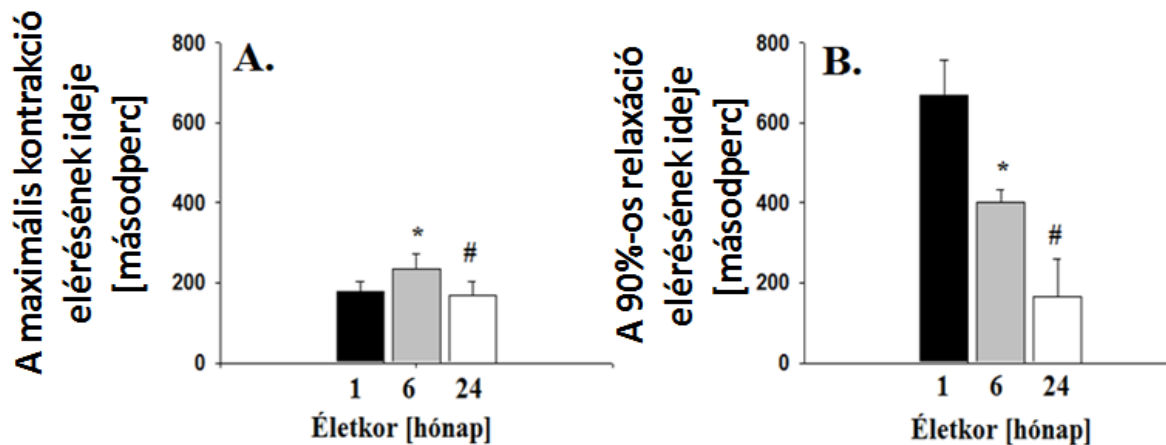
7.2.1 Az Ang II-indukálta kontrakciós görbe karakterisztikájának alakulása az életkor függvényében

A carotis artériákban, az Ang II jelentős kontrakciót okozott, melynek a maximumértékének elérését "csúcs", és relaxációját elemeztük (4 ábra és 5. ábra).



4/a. ábra: A 1-, (I) 6-, [II] és 24- [III] hónapos patkány carotis artéria ismételt (20 perc) Ang II hozzáadása során adott izometriás kontrakciós válaszainak alakulása az idő függvényében. Az ábra jobb oldalán ("B" jelzéssel) mindhárom korcsoport első Ang II hozzáadása során kapott kontrakciós görbéje látható az idő függvényében (eredeti regisztrátum).

A csúcs kontrakció elérésének ideje 1 hónapos kortól 6 hónapos korig nőtt (1 hónap: 179 ± 23 sec vs. 6 hónap: 235 ± 35 sec), majd 24 hónapos korra (24 hónap: 167 ± 46 sec) csökkent. A relaxáció ideje 1 hónapos kortól 24 hónapos korig fokozatosan csökkent (1 hónap: 670 ± 87 sec vs. 6 hónap: 400 ± 31 sec vs. 24 hónap: 164 ± 94 sec) (5. ábra).



5. ábra: Patkány carotis artéria Ang II-re adott vazomotor válaszok maximális kontrakciós idejének (A) és a 90%-os relaxációs idejének (B) alakulása az életkor függvényében (másodpercben kifejezve). "*" : szignifikáns különbséget jelez 1 és 6 hónapos ($p < 0.05$); "#": a 6 és 24 hónapos korcsoportok között ($p < 0.05$); ($n = 5$).

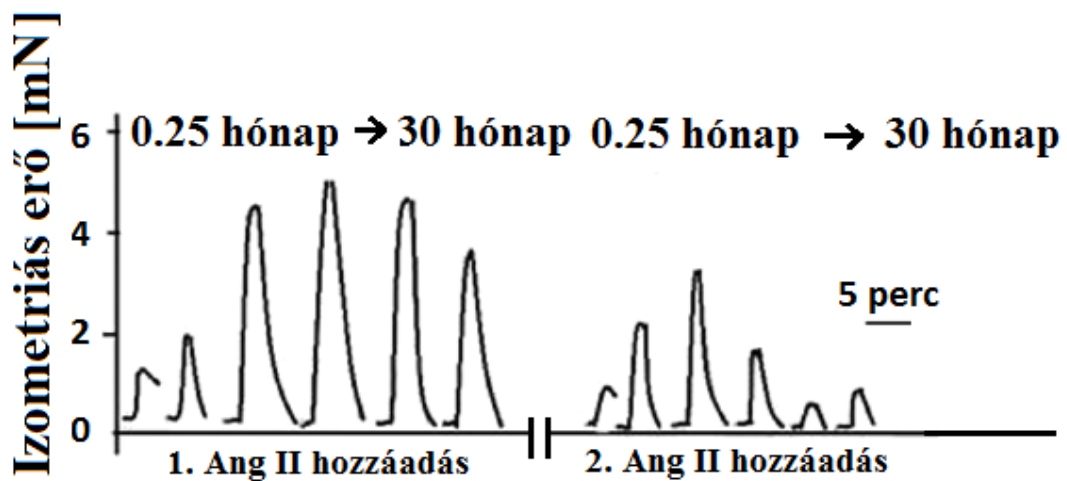
7.2.2 Az Ang II-indukálta kontrakciós erő alakulása az életkor függvényében

Az eredeti ábrán is látható, hogy az Ang II-indukálta maximális kontrakciós erő az életkorral folyamatosan változott, azaz újszülött kortól felnőtt korig nőtt, majd aggastyán korra csökkent (6/a ábra).

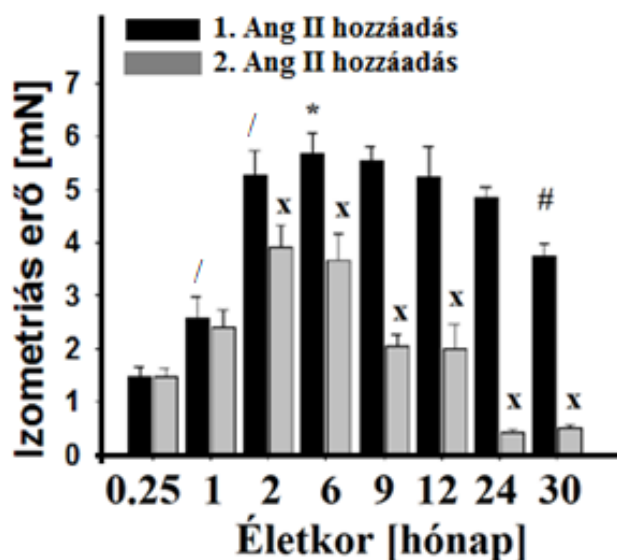
Oszlop diagrammon ábrázolva az Ang II-indukálta maximális kontrakciós erő nagysága "harang alakú" eloszlást mutatott, azaz újszülött kortól (0.25 hónap: 1.5 ± 0.2 mN) felnőtt korig nőtt (6 hónap: 5.2 ± 0.3 mN), majd aggastyán korra csökkent (30 hónap: 3.8 ± 0.4 mN) (6/b ábra).

7.2.3 Az ismételt Ang II-indukálta kontrakciós erő alakulása az életkor függvényében

A második az Ang II-indukálta maximális kontrakciós erők nagysága – az első hozzáadáshoz hasonlóan – "harang alakú" eloszlást mutatott, azaz újszülött kortól (0.25 hónap: 1.7 ± 0.3 mN) fiatal-felnőtt korig nőtt (2 hónap: 3.8 ± 0.4 mN), majd aggastyán korra csökkent (30 hónap: 1.2 ± 0.4 mN) (6/a ábra, 6/b ábra).



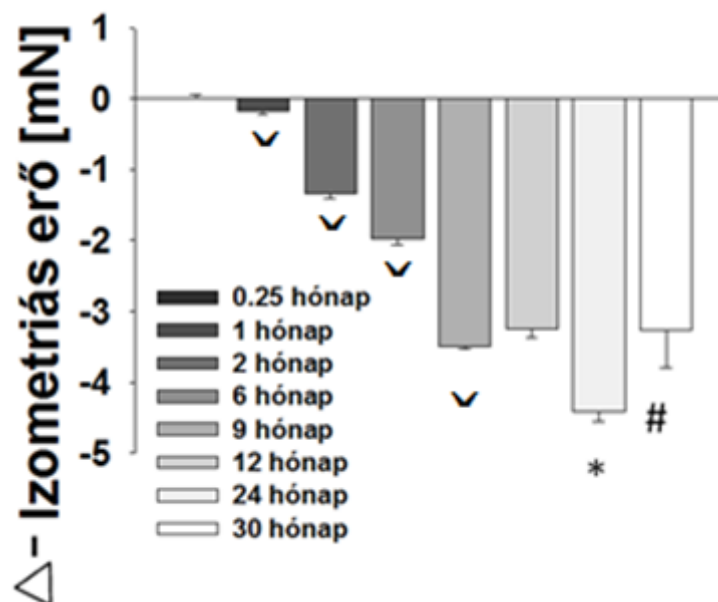
6/a ábra: Az eredeti ábra mutatja az Ang II első és második hozzáadása során kapott izometriás kontrakciót újszülött kortól (0.25 hónap), aggastyán korig (30 hónap).



6/b ábra: Az Ang II első (fekete oszlop) és második (szürke oszlop) hozzáadását követően kapott izometriás kontrakciós erők nagysága látható 0.25 hónapos kortól - 30 hónapos korig. **"*"**: szignifikáns különbséget jelez 0.25 és 6 hónapos ($p < 0.05$), **"#"**: a 6 és 30 hónapos korcsoportok ($p < 0.05$), **"x"**: szignifikáns különbséget jelez az azonos korú patkányok 1. és 2. Ang II hozzáadása során kapott válaszok nagysága között ($p < 0.001$), **"/'"**: szignifikáns különbséget jelez a megelőző korcsoportéhoz képest az Ang II-indukálta válaszban ($p < 0.001$); ($n=8$).

7.2.4 Az ismételt Ang II-indukálta kontrakciók során kialakult tachyphylaxia alakulása az életkor függvényében

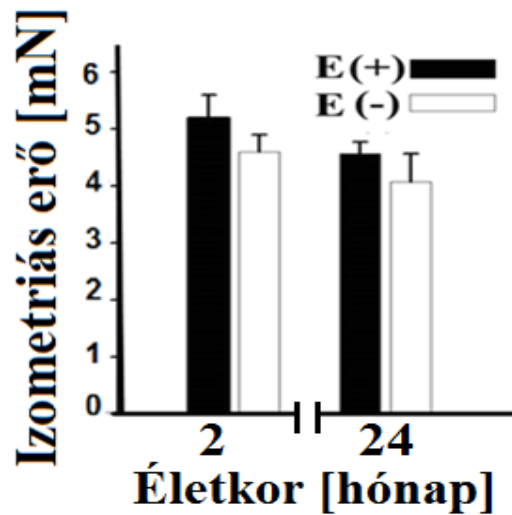
A 5. ábrán látható a második és az első Ang II-indukálta maximális kontrakciós erők nagysága közötti különbség (delta érték). A második Ang II hozzáadás során kapott kontrakciós erő nagysága, 0.25 és 1 hónapos korcsoportokban – az első hozzáadáshoz képest – nem különbözött. Azonban fiatal felnőtt kortól (2 hónapos: $1.4 \pm 0.2 \text{ mN}$) – idős-felnőtt korig (9 hónapos korig: $3 \pm 0.4 \text{ mN}$) a válaszok közötti különbség nőtt, majd agastyán korra (30 hónapos: $2.6 \pm 0.2 \text{ mN}$) csökkent (7 ábra).



7. ábra: A második es első Ang II hozzáadása során kapott izometriás kontrakció különbsége látható az életkor függvényében. "*" : szignifikáns különbséget jelez: 0.25-, és 24 hónapos között ($p < 0.001$), "#": a 24-, és 30 hónapos korcsoport között ($p < 0.05$), "v": szignifikáns különbséget jelez a megelőző korcsoportokhoz képest ($p < 0.001$) ($n = 8$)

7.2.5 Az Ang II-indukálta kontrakciós erő alakulása: vaszkuláris endotélium jelenlétében és hiányában

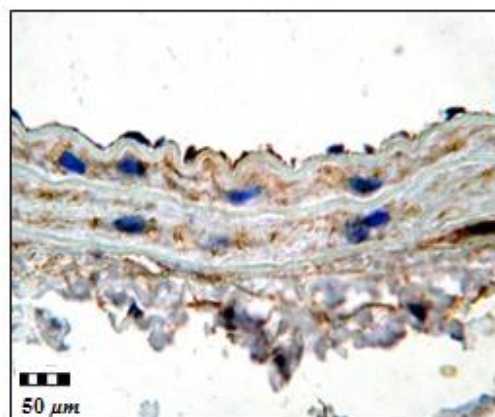
Külön kísérleti csoportban vizsgáltuk az Ang II-indukálta kontrakciós erő alakulását vaszkuláris endotélium jelenlétében és hiányában. Mintaként ezen kísérleteket fiatal-felnőtt (2 hónapos) és öreg (24 hónapos) patkány carotis artériákon végeztük. Eredményeink szerint, az Ang II-indukálta kontrakciós erő szignifikánsan nem különbözött endotélium jelenlétében és hiányában, egyik korcsoportban sem (2 hónap [E+]: $5.2 \pm 0.5 \text{ mN}$ vs. 2 hónap [E-]: $4.7 \pm 0.4 \text{ mN}$; 24 hónap [E+]: $4.5 \pm 0.3 \text{ mN}$ vs. 24 hónap [E-]: $4.2 \pm 0.3 \text{ mN}$) (8. ábra).



8. ábra: Az Ang II-indukálta kontrakció erejének alakulása 2 és 24 hónapos patkány carotis artériákban, a vaszkuláris endotélium jelenlétében (fekete oszlop) és hiányában (fehér oszlop) ($n=5$).

7.3 AT₁R jelenléte patkány carotis artériák falában (simaizomban)

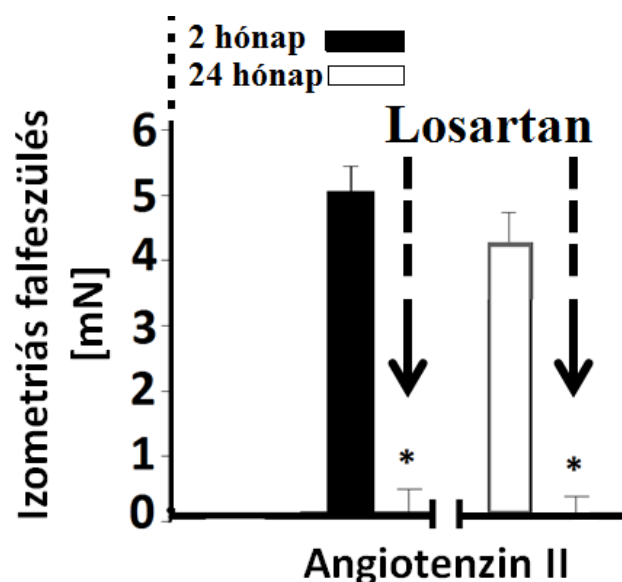
A funkcionális eredmények megerősítésére immunohisztokémiai módszert alkalmaztunk. Célunk volt, az AT₁R érfalbeli lokalizációjának kimutatása. A 9. ábrán látható, hogy az AT₁R-ok döntő többségben a simaizom rétegben helyezkednek el. A hisztokémiailag a barna színnel jelzett AT₁R-immunokomplexek a teljes érfalban megtalálhatóak (9. ábra). A festődések korfüggését és kvantifikálását későbbi munkánkban kívánjuk elvégezni.



9. ábra: Az ábrán 2 hónapos formalinban fixált, paraffinban ágyazott patkány carotis artéria immunohisztokémiai metszete látható. Az AT_1R immunokomplexet barna színű festődés mutatja. A kék festődés a simaizom magjait jelzi. A 400x nagyítású ábra bal alsó sarkába a mérőskálát illesztettük. BAR: 50 μm .

7.4 Az Ang II-indukálta kontrakció erejének változása AT_1R blokkoló jelenlétében és hiányában

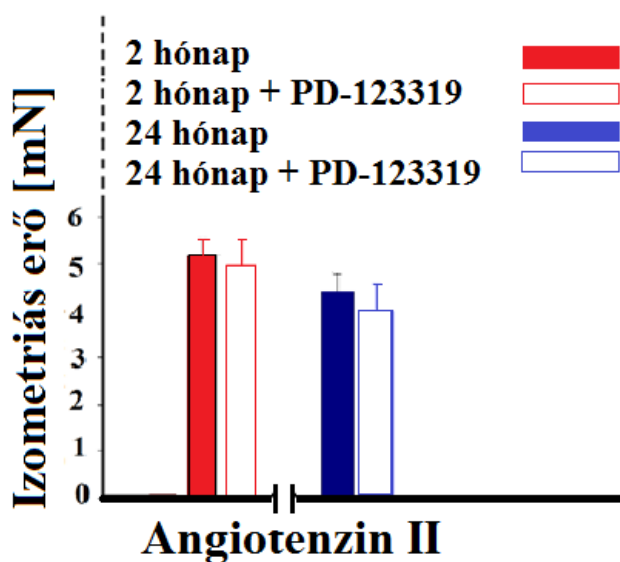
A 10. ábrán fiatal és öreg patkány carotis artériák Ang II-indukálta kontrakciója látható AT_1R blokkoló jelenlétében és hiányában. Eredményeink azt mutatják, hogy az AT_1R blokkoló jelenlétében, az Ang II hozzáadása nem okozott érdemi kontrakciót, sem fiatal (2 hónapos), sem öreg (24 hónapos) patkány carotis artériákban (2 hónap [L-]: $5.3 \pm 0.4 mN$ vs. 2 hónap [L+]: $0 \pm 0.4 mN$; 24 hónap [L-]: $4.2 \pm 0.5 mN$ vs. 24 hónap [L+]: $0 \pm 0.3 mN$) (10. ábra).



10. ábra: Az Ang II hozzáadása során kapott kontrakció látható AT_1R blokkoló (Losartan) jelenlétében illetve hiányában 2-, és 24 hónapos patkány carotis artériákon. *: szignifikáns különbséget jelez a Losartan jelenlétében és hiányában mért kontrakciós erők nagysága között; ($p < 0.001$); ($n=5$).

7.5 Az Ang II-indukálta artériás kontrakció erejének változása AT₂R blokkoló jelenlétében és hiányában

A 11. ábrán fiatal és öreg patkány carotis artériák Ang II-indukálta kontrakciója látható AT₂R blokkoló (PD-123319) jelenlétében és hiányában. Eredményeink azt mutatják, hogy az Ang II-indukálta kontrakció nem különbözött szignifikánsan az AT₂R blokkoló jelenlétében illetve hiányában, sem fiatal (2 hónapos), sem pedig öreg (24 hónapos) patkány carotis artériákban (2 hónap [PD-]: 5.1 ± 0.4 mN vs. 2 hónap [PD+]: 4.8 ± 0.3 mN; 24 hónap [PD-]: 4.5 ± 0.5 mN vs. 24 hónap [PD+]: 4 ± 0.5 mN) (11. ábra).



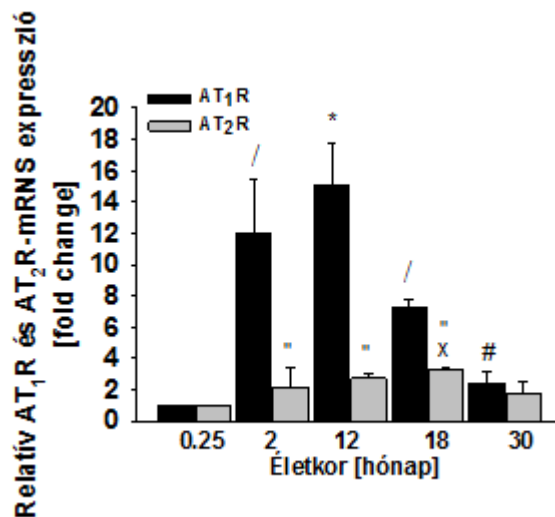
11. ábra: 2-, és 24 hónapos patkány carotis artériákon, az Ang II-indukálta kontrakció AT₂R blokkoló jelenlétében (teli oszlopok) és hiányában (üres oszlopok) ($n=5$).

7.6 A vaszkuláris AT₁R–mRNS expresszió változása az életkor függvényében

A carotis artériák falában az AT₁R-mRNS expresszióját vizsgáltuk. Eredményeink szerint az AT₁R-mRNS expressziója újszülött (0.25 hónapos: 1±0) kortól – felnőtt korig nőtt (12 hónapos: 15±2.7), majd aggastyán korra csökkent (30 hónapos: 2.4±0.8) (13. ábra).

7.7 A vaszkuláris AT₂R–mRNS expresszió változása az életkor függvényében

A carotis artériák falában az AT₂R-mRNS expresszióját vizsgáltuk. Eredményeink szerint az AT₂R-mRNS expressziója korral változik; azaz újszülött (0.25 hónapos: 1±0) kortól – idős-felnőtt (18 hónapos: 3.3±0.4) korig nőtt, majd aggastyán (30 hónapos: 1.8±0.7) korig továbbiakban nem változik (13. ábra). Az AT₂R expressziója, az AT₁R-mRNS expresszióhoz viszonyítva jelentősen és szignifikánsan kisebb volt 2 hónapostól 18 hónapos korcsoportig (13. ábra).

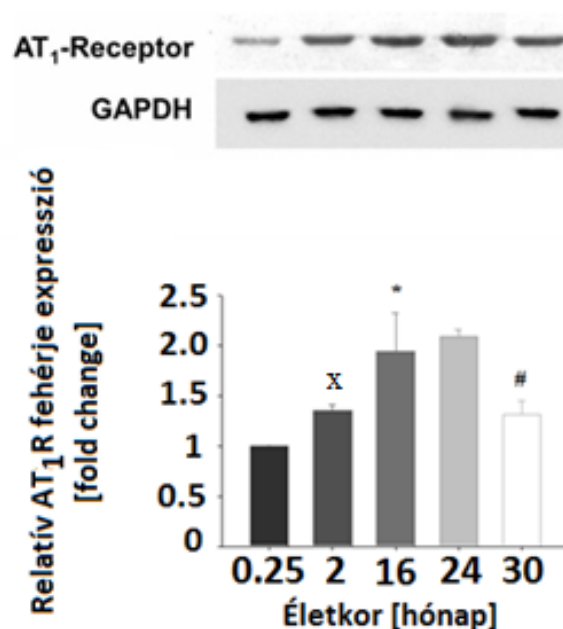


13. ábra: Az AT₁R-mRNS (fekete oszlop), és AT₂R-mRNS (szürke oszlop) expresszió korfüggő változása. "*" : szignifikáns különbséget jelez (AT₁R-mRNS): a 0.25 és 12 hónapos ($p < 0.001$), "#": szignifikáns különbséget jelez (AT₁R-mRNS): a 12 és 30 hónapos korcsoportok között ($p < 0.001$). "x": szignifikáns különbséget jelez (AT₂R-mRNS): 0.25 és 18 hónapos

korcsoportok között ($p < 0.05$). ”: szignifikáns különbséget jelez az AT_1R -mRNS és az AT_2R -mRNS expressziója között az egyes korcsoportokon belül ($p < 0.05$); ”/”: szignifikáns különbséget jelez a megelőző korcsoportokhoz képest ($p < 0.001$) ($n = 7$).

7.8 A vaszkuláris AT_1R -fehérje expresszió változása az életkor függvényében

A carotis érfalban vizsgáltuk az AT_1R -fehérje korfüggő expresszióját. Eredményeink azt mutatják, hogy az AT_1R -fehérje expresszió újszülött kortól (0.25 hónap: 1 ± 0.3) idősebb felnőtt (16 hónap: 2 ± 0.4) korig nőtt, majd aggastyán (30 hónap: 1.5 ± 0.2) korra csökkent, hasonlóan harang alakú eloszlást mutatva (14. ábra). A pozitív kontroll-ként az érfalban, állandó mennyiségben expresszálandó GAPDH-t használtunk.



14. ábra: A patkány carotis artériákban mérhető AT_1R -fehérje expresszió alakulása az életkor függvényében. ”*”: szignifikáns különbséget jelez a 0.25 és 16 hónapos ($p < 0.05$), ”#”: a 16 és 30 hónapos korcsoportok között; ($p < 0.05$); ”x”: szignifikáns különbséget jelez a megelőző korcsoportokhoz képest ($p < 0.001$) ($n = 7$). A felső panel az eredeti gél blott-ot mutatja. A gélblott felső részében az AT_1R carotis artériákban mérhető expresszióját mutatja az életkor

függvényében. A gél-blott alsó részében (pozitív kontroll-ként) az érfalban konstans mennyiségben jelen lévő glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) tüntettük fel.

8 MEGBESZÉLÉS

Kísérleteinkben az Ang II-indukálta artériás kontrakció erejének és az annak háttérében lévő AT₁R-expresszió változását vizsgáltuk az életkor (újszülött kortól aggastyánkorig) függvényében. A jelen kutatássorozatunk eredményei szerint, az AT₁R közvetített konstriktor válasz, valamint annak háttérében lévő AT₁-mRNS és -fehérje expresszió a vérnyomáshoz hasonlóan az életkorral folyamatosan módosul.

8.1 A vérnyomás változása az életkor függvényében

A megfelelő vérnyomás és annak pontos szabályozása nélkülözhetetlen a kellő szöveti perfúzió fenntartásához. A szisztémás vérnyomás számos egymást kölcsönösen erősítő mechanizmuson keresztül szabályozódik, amit a bevezető fejezetekben már taglaltunk.

Állat kísérletek: Dawes 1980-ban végzett kísérleteiben a születést követően naponta mérte a bárányok vérnyomását. Eredményei szerint a bárányok újszülöttkori vérnyomásértékei a patkány vérnyomásértékeihez képest nagyobb. A patkányok vérnyomás-növekedés dinamikája gyorsabb, mint más vizsgált emlős-állatoké (pl.: bárány) (MABP bárány: fötus: 44±1.8 Hgmm vs. újszülött: 73±8.2 Hgmm vs. felnőtt: 85 ±4.5 Hgmm - MABP patkány: újszülött: 69±7 Hgmm vs. felnőtt: 110 ±8 Hgmm) (Dawes, 1980; Kasper, 2005; Matsuoka, 2007).

Humán vizsgálatok: Franklin és munkatársai *Framingham Heart Study*-ban közölt humán eredményei szerint, a MABP emberben is életkorfüggő eloszlást mutatott, azaz kezdetben újszülött kortól - felnőtt korig nőtt, majd öregkorral csökkent (Franklin, 1997). Ennek háttérében lévő mechanizmusok nem tisztáztak, de feltételezik, hogy a jelenség háttérében a szívizom kontraktilitás és a perifériás ellenállás változásán felül, a teljes plazmatérfogat csökkenése is szerepet játszik (Goldman, 2012; Kobayashi, 2014).

Saját kutatási eredmények: Saját kutatási eredményeink szerint az egészséges patkányokban invazívan megmért artériás középnyomás érték újszülött kortól felnőtt korig nőtt, majd aggastyán-korra csökkent. A patkány kísérleteink során talált vérnyomásértékek eloszlása, korrelál egyes korábbi munkacsoportok eredményeivel (Chamiot-Clerc, 2001).

Ennek háttérében lévő pontos mechanizmusok illetve azok interakciójának változása nem pontosan ismert. Érdekes, hogy míg csecsemő és gyermekkorban az adekvát szöveti perfúzió elsősorban nem a perifériás ellenállás növelésével, hanem a szívfrekvencia emelésével éri el a szervezet (Krishna, 2006), addig felnőtt korban az érrendszer centrális (nyúltvelő, szimpatikus posztganglionáris rostja, valamint paraszimpatikus rostok) és perifériás – lokális – szabályozásával éri el a szervek perfúziójának fenntartását (Fonyó, 2014). Navar és munkatársai az öregkori alacsonyabb vérnyomásértékeket az extracelluláris folyadékterek változásával, az ahhoz kapcsolódó nátriumegyensúly szabályozásának romlásával is magyarázza (Navar, 1997). Ehhez kapcsolódik a neuroendokrin rendszerek (pl.: artériás baroreflex, kallikrein-kinin rendszer, prosztaglandinok és eikozanoidok) aktivitásának csökkenése is (Navar, 1997). Kakuk és munkatársai emellett a renálisan ható vazoaktív anyagok időskori expressziójának csökkenését tételezik fel (Kakuk, 2003). Az irodalomban található különböző elméletek is azt mutatják, hogy a vérnyomás korfüggő alakulása számos egymást kölcsönösen befolyásoló bonyolult rendszer interakcióján múlik.

8.2 Az Ang II-indukálta kontrakciók erejének alakulása az életkor függvényében

Mára jól ismert tény, hogy az Ang II az AT₁R aktiválásán keresztül másodperceken belül vazokonstriktiót hoz létre (McEniery, 2007; Nguyen, 2011; Fonyó, 2014). Vizsgálatainkban az Ang II hozzáadására jelentkező maximális kontraktilis erő alakulását mértük az életkor

függvényében. Eredményeink szerint a vazokontrakció nagysága korral - a patkány artériás középnyomás értékekhez hasonlóan - "harang alakú" eloszlást mutat (6/a és 6/b ábra). Az Ang II-indukálta konstriktor válasz mértékének korfüggő alakulásával foglalkozó irodalmi adatok eredményei továbbra sem egyértelműek. Számos munkacsoport vizsgálta az Ang II-indukálta vazokonstriktor válaszok körfüggő alakulását. Eredményeik szerint izolált patkány mesenterialis artériákon (Marin, 1999) illetve carotisokon (Docherty, 1990) nem találtak különbséget az életkor növekedésével. Más munkacsoportok az Ang II-indukálta konstriktor válaszok növekedését (Konishi, 1997), illetve csökkenését (Wakabayashi, 1990; Diz, 2008) írták le izolált patkány aortagyűrűkön, illetve mesenterica ereken az életkor függvényében. A legtöbb izolált érvizsgálatot fiatal és öreg kutya, nyúl vagy patkány coronaria (Tschudi, 1995), mesenterica (Coelli, 1997), femorális (Juul, 1987), thoracalis aorta (Wakabayashi, 1990) vagy carotis (Vamos, 2013) artériákon végezték. Az ellentmondó adatok hátterében feltehetően állatfajtabeli, különböző érpreparátumokkal végzett vizsgálatok mellett a különböző módszer használata (in vivo [Leite, 1997] vs. in vitro [Wang, 2003]); izolált ér (Konishi, 1997; Bagi, 2008) vs. szerv preparátumokon (Baylis, 2012), sejt-vizsgálatok (Hunyady, 2000) is szerepelhet.

Minthogy korábbi életkorfüggő kutatások elsősorban felnőtt korú (2~16 hónapos) kísérleti állatokon történtek, így fontosnak tartottuk az Ang II-indukálta vazomotor válaszok vizsgálatát újszülött-fiatal (8 napos) és kifejezetten öreg-aggastyán korú (25-30 hónapos) patkányok carotis ereiben is elvégezni. Ezzel lehetőség nyírt egy szélesebb életkorspektrum vizsgálatára is. Tehát az Ang II-indukálta kontrakció ereje különböző életkorokban, különböző mértékben járul hozzá a teljes perifériás ellenállás növeléséhez (Vamos, 2014). Feltehetően az idő és aggastyánkori kontraktilitás fokozása számos kórkép (pl. hipertónia), patogenezisében játszhat fontos szerepet (Cassis, 2010).

8.2.1 Az Ang II-indukálta kontrakciós görbék karakterisztikájának alakulása az életkor függvényében

Az Ang II-indukálta kontrakciós görbék karakterisztikája is korról különbözik. A kontrakció ideje fiatalkortól felnőtt korig nőtt, majd öregkorra csökkent. Ezzel szemben a relaxációs idő fiatalkortól öregkorig fokozatosan csökkent. Bár ezen görbék matematikai függvényekkel való elemzése bonyolult, mégis felmerül, hogy a görbe-karakterisztikák különbségeinek hátterében az Ang II - AT₁-receptorkötődés sebességétől, a receptor-potenciál lecsengési idejétől, illetve a receptorális deszenzitizációjától (ld. később) is függhet. Más munkacsoportok a kontrakciót illetve relaxációt az intracelluláris MLC₂₀-kináz / MLC₂₀-foszfataz enzim aktivitás változásával, az intracelluláris anorganikus foszfát puffer vagy az intracelluláris calcium jel korfüggő alakulásával is magyarázza (Fujimura, 2011). A kontrakciós görbék matematikai elemzése segítheti, az Ang II-indukálta kontrakciók közötti különbségek megértését akkor is, amikor a kapott kontrakciós erők nagysága nem, de a kontrakciós görbék alakja különbözik. Ez főleg a fiatal-idősödő (9-16 hónapos) korcsoportokban válik érdekessé, ahol az Ang II-indukálta maximális kontrakciós erők (a kontrakciós görbék karakterisztikájával ellentétben) szignifikánsan nem különböznek. Ezen jelenségek hátterében lévő mechanizmusokat jövőbeli kutatásokkal kívánjuk pontosítani (6/b ábra).

8.3 Az ismételt Ang II-indukálta kontrakció alakulása az életkor függvényében.

Tachyphylaxia jelenség és annak korfüggő alakulása

Az egyes korcsoportokon belül az első és második Ang II-indukálta vazomotor válaszok erejét hasonlítottuk össze. A második vazomotor válaszok nagysága - az első hozzáadáshoz hasonlóan - "harang alakú" korfüggő eloszlást mutattak; Az ismételt hozzáadások során

jelentkező kontrakciós erő csökkenést receptorális deszenzitizációnak (Barker, 1995), vagy más néven tachyphylaxiának nevezzük (Chiba, 1986). Eredményeink szerint a tachyphylaxia újszülött és fiatal korban (1 hónapos korig) nem alakult ki; ugyanakkor a mértéke felnőtt korig nőtt, majd aggastyán korra csökkent (Vamos, 2013). Ennek hátterében lévő pontos mechanizmusokat nem teljesen ismerjük. Azonban tudott ugyanakkor, hogy az Ang II - AT₁R kötődéssel Gq-Ca²⁺-PKC útvonalon vazokontrakciót okoz (Balla, 2011). Az aktivált foszforilált receptorokhoz β-arresztin fehérjemolekula is kötődik, amely a receptor internalizációját és deszenzitizációját hozza létre (Hunyady, 2006) (15. ábra). A receptor internalizációja alatt azt a mechanizmust értjük, mely során a receptor a sejt felszínéről klatrin-függő vezikuláris transzporttal a sejt belsejébe kerül (Torres-Tirado, 2013), majd onnan visszatér (recirkulál) a sejtfelszínre (Hunyady, 2000). A recirkulációt követően egy átmeneti receptorális deszenzitizáció jelentkezik (Linder, 2007) (16. ábra). Feltételezésünk szerint a korfüggő tachyphylaxia hátterében az aktivált receptorok internalizációt követő recirkulációs idejének változása (megnyúlása) is állhat, ami érinti a simaizomsejtek (és endotélium) felszínén lévő receptorokat is; így a továbbiakban funkcionálisan inaktív állapotba kerülnek (Hunyady, 2000; Bagi, 2007) (16. ábra). A tachyphylaxia élettani folyamatokban betöltött szerep nem pontosan ismert. Ugyanakkor tudott, hogy az Ang II/AT₁R kapcsolódás a kontrakció mellett az intracelluláris reaktív oxigén származékok (ROS) szintézisét is fokozza, ami főleg késői életkorokban számos kórkép (pl. hipertónia) kialakulásában játszhat szerepet (Cassis, 2010). Az idős és öregkorban a tachyphylaxia fokozódása feltehetően csökkentheti a folyamatos vazokonstrikció kialakulását és a ROS szintézisét is (Linder, 2007). Ezen teoretikus hipotézis igazolását szintén későbbi munkáinkkal kívánjuk pontosítani.

8.4 Az endotélium szerepe az Ang II-indukálta kontrakcióban

Eredményeink szerint az ép és eltávolított vaszkuláris endotélium-mal vizsgálat carotis artériák Ang II-indukálta kontrakciója, szignifikánsan nem különbözött (9. ábra). Tehát az AT₁R közvetített kontrakciók endotéliumtól függetlenül történtek, amit immunohisztokémiai eredményeink is alátámasztanak. Bár az AT₁R-immunokomplexeket nem quantifikáltuk, mégis jól látható hogy legnagyobb denzitása a simaizomban van jelen (10. ábra). Eredményeink korrelálnak korábbi patkány aorta (1-, 4-, és 22 hónapos) (Wakabayash, 1990), coronaria (1-, és 18 hónapos) (Marín, 1999), valamint mesenterialis (1-, és 18 hónapos) artériákon (Konishi, 1997) végzett izolált ér kísérletekkel ahol szintén az Ang II endotélium független kontrakcióját írták le (Allen, 2000).

Korábbi kutatásokból ismerjük, hogy bár az endotélium nem játszik szerepet az Ang II okozta konstriktor válaszok kialakításában, ugyanakkor az endotéliumban termelődő vazodilatátor faktorok feltehetően befolyásolják az értónus kialakulását (Leite 1997). Az életkorral az endotéliumban termelődő dilatátor mediátorok (NO, dilatátor prosztaglandin) szintézise illetve biológiai hatásossága fokozatosan csökken, feltehetően a reaktív szabad gyökök fokozott termelődése miatt (Gruetter, 1988; Csiszar, 2002; Paravicini, 2008; Baylis, 2012). Bagi és munkatársai felhívták a figyelmet arra is, hogy a magas intravaszkuláris nyomás súlyosan károsítja – többek között – az endotélium mediálta vazomotor működéseket is (Bagi, 2008). Már rövid ideig tartó magas intravaszkuláris nyomás is jelentősen befolyásolja az endotélium-független, simaizom eredetű ACE és az AT₁R működését és expresszióját (Bagi, 2008) Ezen eredmények igazolják, hogy bár életkorral az Ang II-indukálta kontrakció jelentősen módosul, ennek hátterében lévő mechanizmusok nem kötődnek közvetlenül az endotéliumhoz.

8.5 A vaszkuláris AT₁R-mRNS és fehérje expressziójának alakulása az életkor függvényében

Eredményeink azt mutatják, hogy a kontrakciós válaszokhoz hasonlóan az AT₁R-mRNS és AT₁R-fehérje expresszió újszülött kortól felnőtt korig nőtt, majd aggastyán korra csökkent. A molekuláris biológiai eredményekben talált hasonló korfüggő tendencia felveti, hogy az Ang II-indukálta korfüggő vazomotor válasz tulajdonképpen egy jól szabályozott genetikai program része (Vámos, 2014). Az AT₁R-mRNS korfüggő eloszlásához hasonlóan, korábbi közlemények számos növekedési hormon (pl. ghrelin) korfüggő alakulását írták le, hangsúlyozva a genetikai program élettani folyamatok szabályozásában betöltött fontos szerepét (Sechi, 1996; Paukku, 2012; Bailey-Downs, 2012). A vazokonstrikció kialakításában szintén fontos szerepet játszó norepinephrin, a vaszkuláris α_{1a} -receptorok (α_{1a} R) aktiválásával vazokonstrikciót okoz. Előzetes eredményeink korrelálnak más munkacsoportok köztük (Chen, 1995) eredményeivel is, mely szerint az Ang II/AT₁R hasonlóan az α_{1a} R-mediálta kontrakció illetve vaszkuláris mRNS expressziója az életkor előrehaladtával párhuzamosan változik (Vámos, 2014). Ezen eredményeinket későbbi munkáinkban kívánjuk ismertetni.

8.6 A vaszkuláris AT₁R mediálta kontrakció intracelluláris jelátvitelének alakulása az életkor függvényében.

Az Ang II-indukálta kontrakciós erő korfüggő változásának hátterében feltehetően nem csak arról van szó, hogy az AT₁R-mRNS és fehérje expresszió korral változik (Sechi, 1996; Vámos, 2013), hanem arról is az AT₁R-bár jelen van az érfalban, Ang II-vel mégsem aktiválható. Ezen jelenséget korábbi munkacsoportok AT₁R-funkcionálisan inaktív állapotnak nevezte (Bagi, 2008). Marin és munkatársai szerint a korfüggő konstriktor válaszok hátterében a nyugalmi membránpotenciál változás, a feszültség-függő kalcium-csatornák

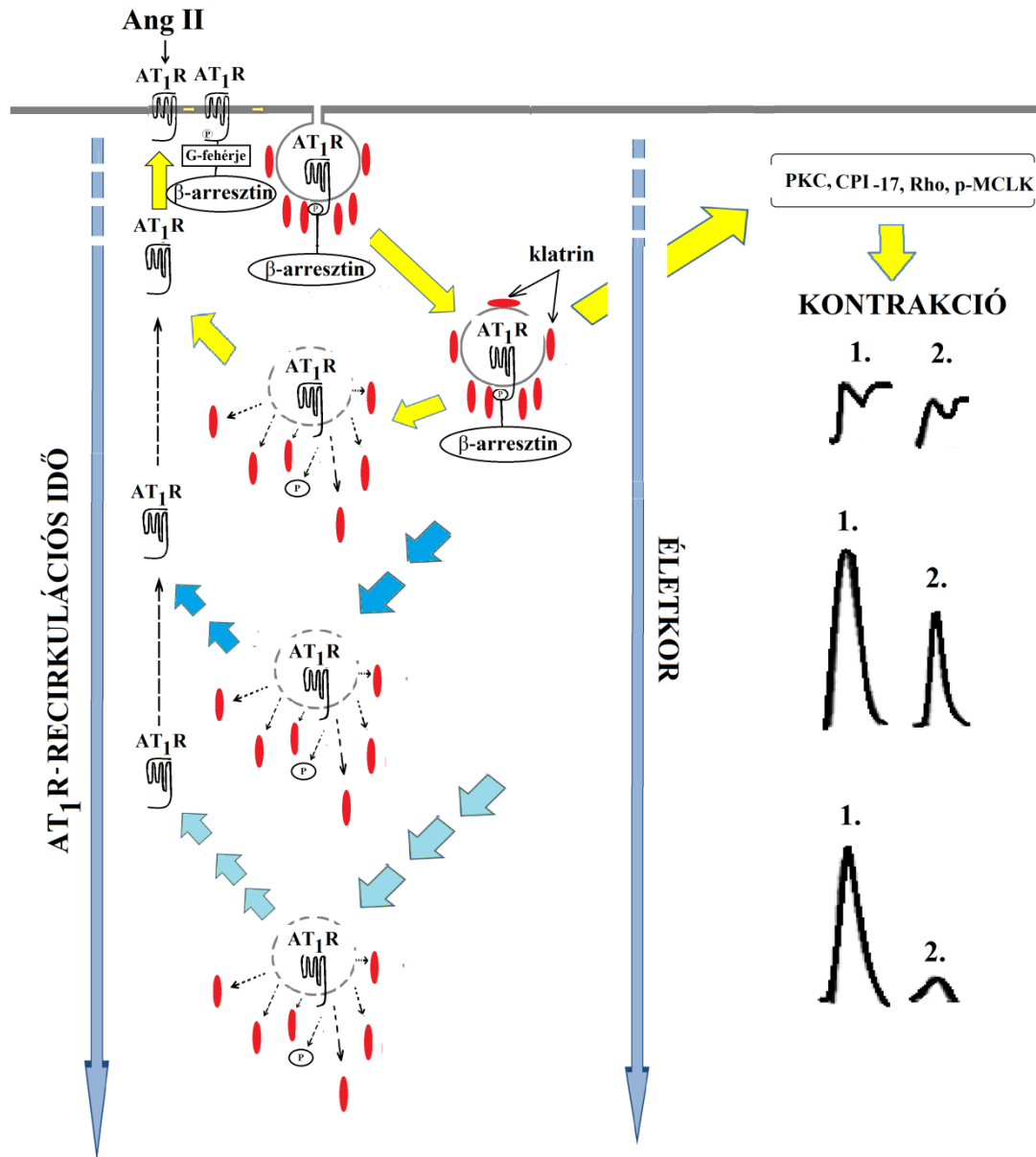
csökkent ingerlékenysége illetve az intracelluláris kalcium-koncentráció és érzékenység változása is állhat (Marin, 1999, Hu, 2011). Az Ang II jelátalakító és jelátvivő mechanizmusok sorát indítja el. Felvetődik, hogy az egyes jelátviteli fehérjék, mint például a β -arrestin (Balakumar, 2014), p-PKC (Csiszár, 2012; Padilla, 2014), p-CPI7 (Su, 2013), Rho-kináz (Bagi, 2011), p-MCLK (Ito, 2004; Fujimjura, 2011; Belik, 2006) expressziója is korrall változik, ami befolyásolhatja az Ang II-indukálta vazomotor válaszok erejét (15. ábra). Az eredményeink magyarázata teoretikus, hiszen a funkcionális válaszok háttérében lévő mechanizmusokat nem vizsgáltuk.

Ezen ismeretek remélhetőleg későbbiekben hozzájárulhatnak az Ang II függő keringésszabályozási elméletek korszerűbb kidolgozásához.

8.7 A vaszkuláris AT₂-Receptor szerepe az Ang II-indukálta konstriktor válaszokban

Az Ang II-indukálta konstriktor válaszok alakulását AT₂R blokkoló jelenlétében és hiányában is vizsgáltuk. Az AT₂R blokkoló az Ang II-indukálta kontrakciót nem befolyásolta sem fiatal (2 hónapos) sem pedig idős (24 hónapos) patkány carotis artériákban (11. ábra). Az AT₂R vaszkuláris dilatátor hatását feltelhetően a bradikinin/NO/cGMP útvonalon keresztül éri el (Carey, 2005). Funkcionális szerepét inkább kóros körülményekhez kötik. Érfal-sérülés, miocardiális infarctus, vagy sebgyógyulás során az AT₂R fokozott expresszióját mutatták ki. Feltételezik, hogy az AT₂R szerepet játszik a sejtnövekedés, differenciálódás és az apoptózis szabályozásában (Kakukk, 2004). Kísérleteinkben a qRT-PCR-ral mért AT₂R-mRNS újszülött (0.25 hónapos) kortól felnőtt korig (12 hónapos) nőtt, majd továbbiakban nem változott. Az AT₁R-mRNS expresszióhoz viszonyítva, az AT₂R-mRNS szignifikánsan kisebb mértékben expresszálódik (13/a és 13/b ábra). Minthogy eredményeinket a nemzetközi

szakirodalomban elfogadott "fold change"-ben fejeztük ki, így a 8 napos patkányok az AT₁ és AT₂-receptor -mRNS expresszióját nem tudjuk összehasonlítani. Ugyanakkor a felnőtt korcsoport tekintetében a carotis erekben az AT₁R-mRNS-hez képest, az AT₂R-mRNS szignifikánsan kisebb mértékben expresszálódik. Az aggastyán korban ugyanakkor nem látunk szignifikáns különbséget a két receptor expressziója között. Ezen jelenség háttérében lévő élettani mechanizmusokat nem ismerjük. Stoll és munkatársai feltételezik, hogy míg az AT₂R stimulálása gátolja az endotelsejtek osztódását, a myointimális proliferációt és az angiogenezist, az időskorban amúgy is sérülékenyebb szervezet szöveti regenerációját fokozza (Stoll, 1995; Kakuk, 2004). Érdekes, hogy a nem-vaszkuláris szövetekben, mint például az agy, a máj és vese szöveteiben az AT₂R protein expresszió a főtális életkortól öregkorig folyamatosan nő (Yu, 2010). Ugyanakkor, Viswanathan és munkatársai patkány aorta falában a fiatal korcsoportokhoz képest – felnőtt korban – csökkent expressziót találtak (Viswanathan, 1991). Mao és munkatársai szerint a posztnatális életben az AT₂-mRNS expresszió csökkenését írták le, aminek alapján az AT₂R élettani szerepét megkérdőjelezték (Mao, 2009). De Gasparo korábbi közleményeiben felveti, hogy az AT₂R az intrauterin növekedés és organogenezis szempontjából fontos (De Gasparo, 2000). Későbbi közlemények az AT₂R-nak a vazodilatátor hatása mellett, vaszkuláris növekedési faktor szintézisét-, valamint a remodellinget gátló hatást tulajdonítanak (Kakuk, 2004; Ferrao, 2014). Saját kísérleteink is azt az elképzelést látszanak alátámasztani, miszerint az AT₂R nem játszik döntő szerepet az egészséges vaszkuláris ellenállás szabályozásában.



15. ábra: Eredményeinket a fenti ábrán foglaltuk össze. Korábban Hunyady és munkatársai (2006) igazolták, hogy az AT_1R közvetített jelátviteli fehérjék kulcsfontosságú szerepet játszanak az AT_1R -indukálta kontrakció kialakításában. A korfüggő Ang II-indukálta vazomotor válaszok hátterében az alább jelátviteli fehérjék (β -arresztin, PKC, CPI-17, Rho, P-MCLK) szerepe is felmerül, melyek a recirkulációs időtől függően expresszálódnak az erek simaizom sejtjeiben (Hunyady, 2000). Az Ang II hatására a simaizom-sejtben több irányú (sokarcú) jelátviteli folyamat indul el. Bekövetkezik az aktivált receptor internalizációja,

melynek során a receptor a sejt felszínéről vezikuláris transzportmechanizmussal a sejt belsejébe kerül. Fiziológias körülmények között az AT₁R internalizációjának fő mechanizmusa, hogy az aktivált receptor foszforilálódik és az internalizációt beindító β -arresztin fehérjékhez kapcsolódik. E fehérjék a receptor internalizációja mellett jelátviteli folyamatokat is beindít. A receptor a jelátvitelt követően visszatér (recirkulál) a sejt felszínre. Ezen folyamatok az életkorral változnak, aminek hátterében a funkcionális aktiválható AT₁R szám változás, az internalizáció, illetve a recirkulációs idő változása is állhat. Az Ang II-indukálta kontrakció ereje korral hasonlóan változik, aminek hátterében az egyes szubcelluláris fehérjék expressziójának változása is feltételezhető. Ezen jelenség hátterében lévő mechanizmusokat további kutatásokkal kívánjuk felderíteni.

9. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Kísérleti patkányokban végzett kutatásaink új eredményei a következők:

1. a MABP korfüggő eloszlást mutatott: az újszülött kortól a felnőtt korig nőtt, majd a felnőtt kor végétől az aggastyán korig csökkent;

Az izolált carotis artériákban:

2. az Ang II-indukálta kontrakció az életkorral fokozatosan változott: az újszülött kortól felnőtt korig nőtt, majd aggastyán korra csökkent;
3. a válasz kontrakciós részének ideje és relaxációs részének ideje korral változott;
4. az Ang II-indukálta tachyphylaxia a 8 napos és 1 hónapos korcsoportokban nem jelentkezett, míg az egyedfejlődés további szakaszaiban, kezdetben nőtt, majd aggastyánkorra csökkent.
5. az Ang II-indukálta kontrakciót elsősorban (majdnem kizárólagosan) a vaszkuláris endotéliumtól és az AT₂R-től függetlenül a simaizomban elhelyezkedő AT₁R közvetíti.
6. az AT₁R-mRNS és AT₁R-fehérje expressziója életkorral változott: újszülött kortól felnőttkorig nőtt, majd aggastyán korra csökkent;
7. az AT₂R-mRNS expressziója életkorral változott, azaz újszülött kortól felnőtt korig nőtt, majd aggastyánkorra továbbiakban nem változott. Expressziója az AT₁R-mRNS expresszióhoz képest szignifikánsan kisebb fiatal és felnőtt korban. Aggastyán korban a két receptor expressziója között nem volt szignifikáns különbség.

10 KONKLÚZIÓK

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy patkányban, de feltehetően az emberben is, az Ang II-indukálta vazokonstriktió mértékének korfüggése a funkcionálisan aktiválható AT₁ receptorok számától függ, ami egy jól szabályozott genetikai és transzlációs program eredménye. Úgy tűnik, hogy míg felnőtt korban a fokozottabb mértékű-, addig újszülött és aggastyánkorban a kisebb mértékű Ang II-indukálta artériás konstriktió a fiziológiás. Mivel a vaszkuláris renin angiotenzin rendszer fontos szerepet játszik a szisztémás artériás vérnyomás szabályozásában, feltehető, hogy a csecsemő és aggastyánkorban a fiziológiásan alacsonyabb szisztémás vérnyomásértékek részben ennek a jelenségnek is tudhatóak be. Ennek megfelelően felmerül, hogy míg felnőtt korban a fokozottabb vazokonstriktor válasz részt vehet a fiziológiásan magasabb szisztémás vérnyomás kialakításában, addig gyermek és aggastyán korban az Ang II-indukálta konstriktió – az Ang II által szabályozott artériás vazomotor tónus - kisebb szerepet játszik a nyugalmi vérnyomás kialakulásában. Feltehető, hogy hipertóniában a kísérleteinkben talált fiziológiás konstriktor válaszok mértéke valamint a funkcionálisan aktiválható AT₁R expresszió megnő. Ezt az elképzelést alátámasztja az AT₁R-blokkolók széleskörű és sikeres alkalmazása az antihipertenzív terápiában. Mivel a jelenlegi tanulmányok felvetik az epigenetikai szabályozás fontos szerepet az életkor-függő (pl. AT₁R-génexpresszió) vérnyomás szabályozásában (Soltis, 1987; McEniery, 2007, Berdasco, 2012) további kutatásoknak tisztázni és pontosítani kell azokat az életkörülményeket és epigenetikai mechanizmusokat, melyek a fiziológiás konstriktor mechanizmusok korfüggését és epigenetikai meghatározottságát patofiziológiai irányba terelik.

11 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok témavezetőmnek Prof. Dr. Koller Ákosnak, aki megszeretette velem a tudományos gondolkozást, és aki mellett rájöttem, hogy bizony tényleg "kell egy csapat"! Témavezetői munkája mellett megtanított arra is, hogy bizony milyen nehéz feltenni egy igazán "jó kérdést" és hipotézist. Szintén köszönetet mondok Prof. Dr. Hamar Jánosnak, aki türelmesen sokszor hosszú éjszakákon keresztül tanította nekem az élettant. Nélkülük ezen dolgozat soha nem készülhetett volna el.

Továbbá, köszönöm tanárainknak Prof. Dr. Székely Miklósnak és Dr. Kanizsai Péternek, hogy már Tudományos Diákkörösként lehetővé tették, hogy elkezdjem a kutatásaimat a PTE ÁOK Kóréletani és Gerontológiai Intézetben.

Nagyon köszönöm barátaimnak, Dr. Cséplő Péternek, Dr. Springó Zsoltnak és Ivan Ivicnek, hogy barátként és kollégaként segítettek és támogattak kutatásaim elvégzésében az évek során. Köszönöm Dr. Degrell Péter adjunktusnak az immunohisztokémiai munkákban való segítséget és Dr. Mátics Róbert adjunktusnak a molekuláris biológia méréseket. Köszönöm Dusikné Szommer Dalmának, Visnyei Tündének, Potóné Emőkének valamint Pákai Eszternek hogy pontosságukkal segítették méréseinket.

Köszönöm Dr. Gaszner Balásznak, Dr. Szántó Zalánnak és Dr. Garai Jánosnak, hogy előopponensként kritikai észrevételeikkel javították a dolgozat szakmai színvonalát.

Köszönöm Prof. Dr. Bogár Lajos professzor Úrnak és Dr. Ezer Erzsébet Főorvos Nőnek hogy klinikai munkám mellett lehetőséget biztosítanak az aktív kutató munkához.

Köszönöm a családomnak (szüleimnek, testvéreimnek, Sáríkáknak és Tomnak) akik minden tekintetben sajátjuknak érezhetnek mindent, amit valaha sikerült elérnem.

12 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACE: angiotenzin-konvertáz enzim

ACEi: angiotenzin-konvertáz enzim inhibitor

AGT: angiotenzinogén

Ang I: angiotenzin I

Ang II: angiotenzin II

AT₁R: angiotenzin-1-receptor

ATRAP: angiotensin receptor-binding protein

BK: bradykinin

CAGE: chymostatin-sensitive angiotensin II-generating enzyme

cDNS: komplement DNS

DAB: diaminobenzidin-tetrahidroklorid

DMT610M: Danish Myo Technology 610M

ff: fiatal felnőtt

H₂O₂: hidrogén-peroxid

if: idős felnőtt

JAK-2 kináz: Janus kinase-2 kináz

kDa: kilo-Dalton

MAPK: mitogen activated protein kinase

mN: mili-newton

Na⁺: Natrium ion

NADP(H): nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NIH image: National Institutes of Health image

NO: nitrogén-monoxid

ök: öregkor

PBT: Dulbecco-fél foszfát puffer sóoldat

qRT-PCR: kvantitatív valósídejű-polimeráz láncreakció

RAAS: renin angiotenzin aldosteron rendszer

RAS: renin–angiotenzin rendszer

ROS: reaktív oxigényökök

SDS poliakrilamid gél: nátrium dodecyl sulfát–poliakrilamid elektroforézis gél

SHR: spontán hipertóniás patkány

13 IRODALOMJEGYZÉK

1. Alistar E, Dacu G: Diagnosis and therapeutic aspects of isolated systolic hypertension. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*; 114(3):650–657 (2010).
2. Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA: Localization and function of angiotensin AT₁ receptors. *Am J Review Hypertension* 13 (1 Pt 2):31S-38S. (2000).
3. Assayag P, Charlemagne D, de Leiris J, Boucher F, Valère PE, Lortet S, Swynghedauw B, Besse S: Senescent heart compared with pressure overload–induced hypertrophy, *Hypertension*. 29(1):15-21 (1997).
4. Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH: *Biology and diseases. The laboratory rat: volume I*, Academic Press, New York, p. 411. (1979)
5. Bagi Z, Erdei N, Koller A: High intraluminal pressure via H₂O₂ upregulates arteriolar constrictions to angiotensin II by increasing the functional availability of AT₁ receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 295(2):835–841 (2008).
6. Bagi Z, Feher A, Cassuto J, Akula K, Labinsky N, Kaley G, Koller A: Increased availability of angiotensin AT₁ receptors leads to sustained arterial constriction to angiotensin II in diabetes—role for Rho-kinase activation. *Br J Pharmacol*. 163(5):1059-68 (2011).
7. Balakumar P, Jagadeesh G: A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT₁ receptor signaling cascades in cardiovascular pathophysiology. *Cell Signal*. 26(10):2147-60 (2014).
8. Balla A, Erdélyi L, Hunyady L: G-fehérjéhez kapcsolt receptorok aktivációs modelljeinek elemzése, *Magyar Tudomány folyóirat*, (2011).

9. Balyasnikova IV, Danilov SM, Muzykantov VR, Fisher AB: Modulation of angiotensin-converting enzyme in cultured human vascular endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 34(7):545-54 (1998).
10. Barker S, Kapas S, Fluck RJ, Clark AJ: Effects of the selective protein kinase C inhibitor Rho on human angiotensin II receptor desensitisation and intracellular calcium release. *FEBS Lett.* 369(2-3):263-266 (1995).
11. Bartha E, Solti I, Kereskai L, Lantos J, Plozer E, Magyar K, Szabados E, Kálai T, Hideg K, Halmosi R, Sumegi B, Toth K: PARP inhibition delays transition of hypertensive cardiopathy to heart failure in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 83(31):501–510 (2009).
12. Basso N, Cini R, Pietrelli A, Ferder L, Terragno NA, Inserra F: Protective effect of long-term angiotensin II inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293(3):1351–1358 (2007).
13. Baylis C: Sexual dimorphism: the aging kidney, involvement of nitric oxide deficiency, and angiotensin II overactivity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 67(12):1365-72 (2012).
14. Belik J, Kerc E, Pato MD: Rat pulmonary arterial smooth muscle myosin light chain kinase and phosphatase activities decrease with age. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 290(3):L509-16 (2006).
15. Berdasco M, Esteller M: Hot topics in epigenetic mechanisms of aging: 2011. *Aging Cell.* 11(2):181-6 (2012).
16. Beregi E: *Az öregedés*, Akadémiai Kiadó, Budapest, (1984).
17. Beril T., de Vries R, , Saxena P, Danser A: Bradykinin potentiation by ACE inhibitors: a matter of metabolism. *Br J Pharmacol.* 137(2): 276–284 (2002).

18. Bernstein KE, Shai SY, Howard T, Balogh R, Frenzel K, Langford K: Structure and regulated expression of angiotensin-converting enzyme and the receptor for angiotensin II. *Am J Kidney Dis.* 21(4):53-7 (1993).
19. Bonnet F, Cooper ME, Carey RM, Casley D, Cao Z: Vascular expression of angiotensin type 2 receptor in the adult rat: influence of angiotensin II infusion. *J Hypertensi.* 19(6):1075-81 (2001).
20. Brouwers S, Smolders I, Massie A, Dupont AG: Angiotensin II type 2 receptor-mediated and nitric oxide-dependent renal vasodilator response to compound 21 unmasked by angiotensin-converting enzyme inhibition in spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension* 62(5):920-6 (2013).
21. Carey RM: Update on the role of the AT₂ receptor. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 14(1):67-71 (2005).
22. Cassis P, Conti S, Remuzzi G, Benigni A: Angiotensin receptors as determinants of life span. *Pflugers Arch.* 459(2):325-32 (2010).
23. Cernucan DL, Gurzu B, Slătineanu S, Dumitriu IL, Slătineanu SM, Costuleanu M, Petrescu G: Contractile effects of angiotensinogen and its multiple metabolization pathways on vessel walls. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi;* 111(3):717–721 (2007).
24. Chamiot-Clerc P, Renaud JF, Safar ME: Pulse pressure, aortic reactivity, and endothelium dysfunction in old hypertensive rats. *Hypertension* 37(2):313 (2001).
25. Chappell MC, Marshall AC, Alzayadneh EM, Shaltout HA, Diz DI: Update on the Angiotensin converting enzyme 2-Angiotensin (1-7) - MAS receptor axis: fetal programming, sex differences, and intracellular pathways. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9.4:201 (2014).

26. Chen L, Xin X, Eckhart AD, Yang N, Faber JE: Regulation of Vascular Smooth Muscle Growth by α_1 -Adrenoreceptor Subtypes in Vitro and in Situ. *J Biol Chem.* 29;270(52):30980-8 (1995).
27. Chiba S, Tsukada M: Angiotensin II-induced tachyphylactic constrictions in isolated and perfused canine mesenteric arteries. *Tohoku J Exp Med.* 150(4):417-26 (1986).
28. Coelli AP, Nascimento LR, Mill JG, Molina MD: Preterm birth as a risk factor for high blood pressure in angiotensin II responses of isolated, perfused mesenteric arteries and veins of rats. *Eur J Pharmacol.* 320(2-3):175–181 (1997).
29. Comfort A: Biological theories of aging, *Hum, dev.*, 1,1 127 (1970).
30. Csiszar A, Sosnowska D, Wang M, Lakatta EG, Sonntag WE, Ungvari Z: Age-associated proinflammatory secretory phenotype in vascular smooth muscle cells from the non-human primate *Macaca mulatta*: reversal by resveratrol treatment. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 67(8):811-20 (2012).
31. Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski P, Wolin MS, Koller A, Kaley G: Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res.* 90(11):1159–1166 (2002).
32. Danser A: Local renin–angiotensin systems: the unanswered questions. *Int J Biochem Cell Biol*, 35 (6), pp. 759–768 (2003).
33. Dawes GS, Johnston BM, Walker DW: Relationship of arterial pressure and heart rate in fetal, new-born and adult sheep. *J Physiol.* 309:405-17 (1980).
34. De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T: International union of pharmacology. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev. Review* 52(3):415-72. (2000).

35. Diniz C, Leal S, Logan K, Rocha-Pereira C, Soares AS, Rocha E, Gonçalves J, Fresco P: Immunohistochemical localization of angiotensin II receptor types 1 and 2 in the mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats. *Microsc Res Tech.* 70(8):677-81 (2007).
36. Diz DI, Lewis K: Dahl memorial lecture: the renin-angiotensin system and aging. *Hypertension* 52(1):37-43 (2008).
37. Docherty L: Cardiovascular responses in ageing: a review, *Pharmacol Rev.* 42(2): 103-25 (1990).
38. Dong Y, Loufrani L, Baron C, Levy B, Widdop R, Henrion D: Influence of changes of blood pressure on vascular angiotensin II receptor subtype expression, *Circulation*, 111(8): 956-957
39. Dudley DT, Panek RL, Major TC, Lu GH, Bruns RF, Klinkefus BA, Hodges JC, Weishaar RE: Subclasses of angiotensin II binding sites and their functional significance. *Mol Pharmacol.* 38(3):370-7 (1990).
40. Escobales N, Ramos JA, Santacana GE, Crespo MJ: Hemodynamic alterations in the coronary circulation of cardiomyopathic hamsters: age and Ang II-dependent mechanisms. *J Card Fail.* 15(10):929-38 (2009).
41. Falkner B, Onesti G, Angelakos ET, Fernandes M, Langman C: Cardiovascular response to mental stress in normal adolescents with hypertensive parents. Hemodynamics and mental stress in adolescents. *Hypertension* 1:23–30 (1979).
42. Farsang Cs: A hipertónia kézikönyve, Libri kiadó, Budapest (2013)
43. Ferrao FM, Lara LS, Lowe J: Renin-angiotensin system in the kidney: What is new? Review, *World J Nephrol.* 3(3):64-76 (2014).

44. Fonyó A: Az Orvosi élettan tankönyve, 7. átdolgozott és bővített kiadás, Medicina kiadó, Budapest, (2014).
45. Franklin SS, Gustin W, Wong ND, Larson MG, Weber MA, Kannel WB, Levy D: Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. The Framingham Heart Study. *Circulation*. 96(1):308-15 (1997).
46. Frolkisz V.V: Az öregedés és az életkor, Gondolat kiadó, Budapest, (1980).
47. Fujimura T, Hotta M, Kitahara T, Takema Y: Loss of contraction force in dermal fibroblasts with aging due to decreases in myosin light chain phosphorylation enzyme. *Arch Pharm Res*. 34(6):1015-22 (2011).
48. Fujimura T, Hotta M, Kitahara T, Takema Y: aging due to decreases in myosin light chain phosphorylation enzymes. *Arch Pharm Res*. 34(6):1015-22 (2011).
49. Goldman L: Goldman's Cecil Medicine, 24th edition, Elsevier canada, (2012).
50. Gruetter CA, Ryan ET, Lemke SM, Bailly DA, Fox MK, Schoepp DD: Endothelium-dependent modulation of angiotensin II-induced contraction in blood vessels. *Eur J Pharmacol*. 146(1):85-95 (1988).
51. Guo DF, Sun YL, Hamet P, Inaganu T: The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins. *Cell Research*; 11(3):165-80 (2001).
52. Hattangady NG, Olala LO, Bollag WB, Rainey WE: Acute and chronic regulation of aldosterone production. *Mol Cell Endocrinol*. 24;350(2):151-62 (2012).
53. Hall KL, Venkateswaran S, Hanesworth JM, Schelling ME, Harding JW: Characterization of a functional angiotensin IV receptor on coronary microvascular endothelial cells. *Regul Pept*. 22; 58(3):107-15 (1995).

54. Hecker M, Pörsti I, Busse R: Mechanisms involved in the angiotensin II-independent hypotensive action of ACE inhibitors. *Braz J Med Biol Res.*; 27(8):1917-21 (1994).
55. Hiroyoshi S, Atsuko S, Hiromi O, Kazue Y, Yasuhiko N, Saburo S, Yusuke M: Age-related changes in control of blood pressure and heart rate during sleep in the rat. *Sleep.* 25(3):279-85 (2002).
56. Hollenberg NK, Barbero LR, Hinrichs KP: Angiotensin tachyphylaxis and vascular angiotensinase activity. *Experientia* 27(9):1032-4 (1971).
57. Hu Z, Ma A, Tian H, Xi Y, Fan L, Wang T: Effects of age on expression of BKca channel in vascular smooth muscle cells from mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Biochem.* 69(4):945-55 (2013).
58. Hunyady L, Catt K: Pleiotropic AT₁ receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Molecular Endocrinology* 20(5):953-70 (2006).
59. Inagami T: The renin angiotensin system. *Essays Biochem.* 28:147–164 (1994).
60. Ito M, Nakano T, Erdodi F, Hartshorne DJ: Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem.* 259(1-2):197-209 (2004).
61. Izzo JL Jr, Weir MR: Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Clin Hypertens.* 13(9):667-75 (2011).
62. Juul B, Aalkjaer C, Mulvany MJ: Responses of femoral resistance vessels to angiotensin in vitro. *Eur J Pharmacol.* 135(1):61-8 (1987).
63. Kakuk Gy: *A klinikai nephrológia, Medicina kiadó Rt, Budapest, (2004).*

64. Kasper SO, Carter CS, Ferrario CM, Ganten D, Ferder LF, Sonntag WE, Gallagher PE, Diz DI: Growth, metabolism, and blood pressure disturbances during aging in transgenic rats with altered brain renin-angiotensin systems. *Physiol Genomics*. 23(3):311-7 (2005).
65. Klinger A: Magyarország népesedési helyzete az 1960-as években, Különlenyomat a Statisztikai Szemle 1969. évi 11.12., az 197. évi 3.,11.,12 és 1971. évi 1 számaiból.
66. Koller Á, Vámos Z, Koller ÁH, Cséplő P: Új eredmények a renin-angiotenzin rendszer és a hipertónia kutatásában. *Orvostovábbképző Szemle, XVIII. Évf. 5. szám*, 11-15, (2011)
67. Konishi C, Naito Y, Saito Y, Ohara N, Ono H: Age-related differences and roles of endothelial nitric oxide and prostanoids in angiotensin II responses of isolated, perfused mesenteric arteries and veins of rats. *Eur J Pharmacol*. 320(2-3):175-81 (1997).
68. Krishna P, Prasanna N, Kumar KM, Desai N, Thennarasu K. Blood pressure reference tables for children and adolescents of Karnataka. *Indian Pediatr*. 43(6):491-501 (2006).
69. Kristek F, Koprdoва R: Long-term effect of prazosin administration on blood pressure, heart and structure of coronary artery of young spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol*. 62(3):295-301 (2011).
70. Langman M, Sadler W: *Orvosi embriologia, Medicina Kiadó*, (2013).
71. Lansing A: Some physiological aspects of ageing, *Physiol. Rev*. 31(3):274-84 (1951).
72. Leite R, Estevão R, Resende AC, Salgado MC: Role of endothelium in angiotensin II formation by the rat aorta and mesenteric arterial bed. *Braz J Med Biol Res*. 30(5):649-56 (1997).
73. Li LJ, Cheung CY, Liu Y, Chia A, Selvaraj P, Lin XY, Chan YM, Varma R, Mitchell P, Wong TY, Saw SM: Influence of blood pressure on retinal vascular caliber in young children. *Ophthalmology* 118(7):1459-65 (2011).

74. Linder AE, Thakali KM, Thompson JM, Watts SW, Webb RC, Leite R: Methyl-beta-cyclodextrin prevents angiotensin II-induced tachyphylactic contractile responses in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 323(1):78-84 (2007).
75. Kobayashi L, Wardle J, Wolf M, Wagner C: Aging and functional health literacy: a systematic review and meta-analysis. *Journals of Gerontology, Series B: Psychological Sciences and Social Sciences* doi:10.1093 (2014)
76. Lizanecz E: Az érátmérő szabályozása a renin-angiotenzin rendszer és a vanilloid receptorok által. PhD doktori értekezés, Debreceni Egyetem, ÁOK, (2009).
77. Li Y, Li XH, Yuan H: Angiotensin II type-2 receptor-specific effects ont he cardiovascular system. *Cardiovascular Diagn. Ther.* 2(1);56-62 (2012).
78. Mandolini C, Vacca K, Borgia MC: New aldosteron receptor inhibitors in heart failure. *Minerva Cardioangiol.* 53(4):241-8 (2005).
79. Mao C, Shi L, Xu F, Zhang L, Xu Z: Development of fetal brain renin-angiotensin system and hypertension programmed in fetal origins. *Prog Neurobiol;* 87(4):252–263 (2009).
80. Marin J, Rodriguez-Martinez MA: Age-related changes in vascular responses. *Exp Gerontol.* 34(4):503–512 12 (1999).
81. Matsuoka OT1, Shibao S, Leone CR: Blood pressure and kidney size in term newborns with intrauterine growth restriction. *Sao Paulo Med J.* 1;125(2):85-90 (2007).
82. McEniery CM, Wilkinson IB, Avolio AP: Age, hypertension and arterial function. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 34(7):665-71 (2007).
83. Min LJ, Mogi M, Iwai M, Horiuchi M: Signaling mechanisms of angiotensin II in regulating vascular senescence. *Ageing Res Rev.* 8(2):113-21 (2009).

84. Moreau P, d'Uscio LW, Lüscher TF: Structure and reactivity of small arteries in aging. *Cardiovasc Res.* 37(1):247–253 (1998).
85. Mosher, H., Lund, B, Kripalani S, Peter J: Association of health literacy with medication knowledge, adherence, and adverse drug events among elderly veterans. *Journal of Health Communication*, 17 (Suppl. 3), 241–251(2012).
86. Nguyen Dinh Cat A, Touyz RM: A new look at the renin-angiotensin system—focusing on the vascular system. *Peptides* 32(10):2141-50 (2011).
87. Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD: Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest.* 109(11):1417-27 (2002).
88. Norman M: Preterm birth--an emerging risk factor for adult hypertension? *Semin Perinatol*, 34(3):183-7 (2010).
89. Oláh E: *Gyermekgyógyászati kézikönyv I-II.* Medicina Könyvkiadó, Budapest (2008).
90. Ordodi VL, Mic FA, Mic AA, Toma O, Sandesc D, Paunescu V: A simple device for invasive measurement of arterial blood pressure and ECG in the anesthetized rat. *Timisoara Med J.* 55(8):35–7 (2005).
91. Orfanos SE, Langleben D, Khoury J, Schlesinger RD, Dragatakis L, Roussos C, Ryan JW, Catravas JD: Pulmonary capillary endothelium-bound angiotensin-converting enzyme activity in humans. *Circulation.* 30;99(12):1593-9 (1999).
92. Padilla J, López RM, López P, Castillo MC, Querejeta E, Ruiz A, Castillo E: Inhibition of PKC-dependent extracellular Ca²⁺ entry contributes to the depression of contractile activity in long-term pressure-overloaded endothelium-denuded rat aortas. *Braz J Med Biol Res.* 47(9):789-98 (2014).

93. Paravicini TM, Touyz RM: NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 31(2):170–180 (2008).
94. Patel D, Alhawaj R, Wolin MS.: Exposure of mice to chronic hypoxia attenuates pulmonary arterial contractile responses to acute hypoxia by increases in extracellular hydrogen peroxide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 15;307(4):R426-33 (2014).
95. Paul M, Zintz M, Böcker W, Dyer M: Characterization and functional analysis of the rat endothelin-1 promoter. *Hypertension.* 25(4):683-93 (1995).
96. Quinn: Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition* 21(6):775-7 (2005).
97. Rafiq K, Nagai Y, Nakano D: Prorenin/renin and insulin resistance. *Front Biosci (Elite Ed) review;* 2:1143–1146 (2010).
98. Ramírez-Sánchez M, Prieto I, Wangenstein R, Banegas I, Segarra AB, Villarejo AB, Vives F, Cobo J, de Gasparo M: The renin-angiotensin system: new insight into old therapies. *Curr Med Chem.* 20(10):1313-22 (2013).
99. Rothwell PM: The Interrelation between carotid, femoral and coronary artery disease. *Eur Heart J.* 22(1):11–14 (2001).
100. Saito H, Yomi Y, Minami M, Parvez SH: New advances in SHR research, Pathophysiology and pharmacology 90-6467-198-7 (1998).
101. Saliques S, Zeller M, Lorin J, Lorgis L, Teyssier JR, Cottin Y, Rochette L, Vergely C: Telomere length and cardiovascular disease. Review, *Arch Cardiovasc Dis.* 103(8-9):454-9. (2010).

102. Sayeski PP, Bernstein KE: Signal transduction mechanisms of the angiotensin II type AT₁-receptor: looking beyond the heterotrimeric G protein paradigm. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2(1):4-10 (2001).
103. Sechi LA, Griffin CA, Giacchetti G, Valentin JP, Llorens-Cortes C, Corvol P, Schamblan M: Tissue-specific regulation of type 1 angiotensin II receptor mRNA levels in the rat. *Hypertension* 28 (3):403–408 (1996).
104. Singh M, Mensah GA, Bakris G: Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. *Cardiol Clin. review*; 28(4):545–559 (2010).
105. Soltis E: Effect of age on blood pressure and membrane-dependent vascular responses in the rat. *Circ Res*; 61(6):889-97 (1987).
106. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T: The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest.* 95(2):651-7 (1995).
107. Su W, Xie Z, Liu S, Calderon LE, Guo Z, Gong MC: Smooth muscle CPI17 expression increases vascular smooth muscle contraction and blood pressure. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* 305(1): 104-13 (2013).
108. Subramani P, Ramasamy R: Measurement of invasive blood pressure in rats. *J Pharmacol Pharmacother* 3(2):172–177 (2012).
109. Székely M: A korélettani alapok, egyetemi tankönyv, Medicina kiadó (2013)
110. Szidonya L, Süpeki K, Karip E, Turu G, Várnai P, Clark AJL, Hunyady L: AT₁-receptor blocker-insensitive mutant AT_{1A} angiotensin receptors reveal the presence of G-protein-independent signaling in C9 cells. *Biochem Pharmacol.* 73(10):1582-92 (2007).

111. Szidonya László: Az AT_{1A}-angiotenzinreceptor G-fehérjétől független jelátvitelének vizsgálata C9 sejtekben, Doktori értekezés, Semmelweis Egyetem, (2007).
112. Takeda-Matsubara Y, Matsubara K, Ochi H, Ito M, Iwai M, Horiuchi M: Expression of endothelial angiotensin II receptor mRNA in pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertension* 16(12):993-9 (2003).
113. Torres-Tirado D, Ramiro-Diaz J, Knabb MT, Rubio R: Molecular weight of different angiotensin II polymers directly determines: density of endothelial membrane AT₁ receptors and coronary vasoconstriction. *Vascul Pharmacol.* 58(5-6):346-55 (2013).
114. Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL: Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 30(11):860-6 (2003).
115. Tschudi MR, Lüscher TF: Age and hypertension differently affect coronary contractions to endothelin-1, serotonin, and angiotensins. *Circulation* 91(9):2415-22 (1995).
116. Ungvari Z, Bailey-Downs L, Gautam T, Sosnowska D, Wang M, Monticone RE, Pinto JT, de Cabo R, Sonntag WE, Lakatta EG, Csiszar A: Age-associated vascular oxidative stress, Nrf2 dysfunction, and NF- κ B activation in the nonhuman primate *Macaca mulatta*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 66 (8):866–875 (2011).
117. Ungvari Z, Csiszar A: The emerging role of IGF-1 deficiency in cardiovascular aging: recent advances. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 67(6):599-610 (2012).
118. Ungvari Z, Tucsek Z, Sosnowska D, Toth P, Gautam T, Podlutzky A, Csiszar A, Losonczy G, Valcarcel-Area MN, Sonntag WE, Csiszar A: Aging-induced dysregulation of dicer1-dependent microRNA expression impairs angiogenic capacity of rat cerebrovascular endothelial cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 68(8):877–891 (2013).
119. Vamos Z, Cseplo P, Ivic I, Matics R, Hamar J, Koller A: Age determines the magnitudes of angiotensin II-induced contractions, mRNA, and protein expression of angiotensin

- type 1 receptors in rat carotid arteries. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 69(5):519-26 (2014).
120. Vamos Z, Cseplo P, Ivic I, Matics R, Koller A: Changes in norepinephrine induced vasomotor response and vascular α 1-receptor expression as a function of age. *Acta Physiologica* 211, SI Supplement: 697, 183-184. FEPS (2014)
121. Veresh Z, Debreczeni B, Hamar J, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A: Asymmetric dimethylarginine reduces nitric oxide donor-mediated dilation of arterioles by activating the vascular renin-angiotensin system and reactive oxygen species. *J Vasc Res.* 49(4):363-72 (2012).
122. Viswanathan M, Tsutsumi K, Correa FM, Saavedra JM: Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. *Biochem Biophys Res Commun.* 179(3):1361-7 (1991).
123. Vivian: Cardiovascular endocrinology; shared pathways and clinical crossroads, Springer Science. (2009).
124. Wakabayashi I, Sakamoto K, Hatake K, Yoshimoto S, Kurahashi M: Effect of age on contractile response to angiotensin II in rat aorta. *Life Sci.* 47(9):771-9 (1990).
125. Wang M, Khazan B, Lakatta EG: Central arterial aging and angiotensin II signaling. *Curr Hypertens Rev.* 6(4):266-281 (2010).
126. Wang M, Takagi G, Asai K, Resuello RG, Natividad FF, Vatner DE, Vatner SF, Lakatta EG: Aging increases aortic MMP-2 activity and angiotensin II in nonhuman primates. *Hypertension* 41(6):1308–1316 (2003).
127. Widdop RE, Vinh A, Henrion D, Jones E: Vascular angiotensin AT₂ receptors in hypertension and ageing. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 35(4):386-90 (2008).

128. Yu L, Zheng M, Wang W, Rozanski GJ, Zucker IH, Gao L: Developmental changes in AT₁ and AT₂ receptor-protein expression in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone* 11(4):214–221 (2010).
129. Zhang LN, Meng QJ, Zhang LF, Ma J: A study on gene expression of angiotensin receptors in arteries from tail-suspended rats. *Space Med Med Eng (Beijing)*. 15 (5):343–346 (2002).

14 PUBLIKÁCIÓS LISTA

IDEGEN NYELVŰ KÖZLEMÉNYEK:

- 1) **Vamos Z**, Cseplo P, Ivic I, Matics R, Hamar J, Koller A: Age determines the magnitudes of angiotensin II-induced contractions, mRNA, and protein expression of angiotensin type 1 Receptors in rat carotid arteries. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 69:519-526 (2014) (IF: 4.984)
- 2) **Vamos Z**, Ivic I, Cseplo P, Toth G, Tamas A, Reglodi D, Koller A: Pituitaryadenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) induces location- and age-dependent relaxation of isolated arteries, *Journal of Molecular Neuroscience* 54(3):535-42 (2014) (IF: 2.757)
- 3) Papp J, Sandor B, **Vamos Z**, Botor D, Toth A, Rabai M, Kenyeres P, Cseplo P, Juricskay I, Mezosi E, Koller A, Toth K.: Antiplatelet effect of acetylsalicylic acid, metamizole and their combination - in vitro and in vivo comparisons. *Clin Hemorheol Microcirc.*; 56(1):1-12. (2014) (IF: 3.398)
- 4) Kanizsai P, **Vámos Z**, Solymár M, Garami A, Szelényi Z. Effects of repeated surgical stress on daily changes of body core temperature in mice. *Acta Physiol Hung.* 97(2):201-7. doi: 10.1556/APhysiol.97.2010.2.6. (2010) (IF:1.226)

Nemzetközi folyóiratokban megjelent közlemények kumulatív impakt faktora: **11.695**

Nemzetközi folyóiratokban megjelent közleményekre való hivatkozások száma: **7**

Az idézhető idegen nyelvű absztraktok kumulatív impakt faktora: **122.79**

Idézhető idegen nyelvű absztraktok száma: **39**

MAGYAR NYELVŰ KÖZLEMÉNYEK:

1. Kanizsai P, Jónás A, Juhász V, Pető A, **Vámos Z**, Pótó L, Szelényi Z: Mag- és axilláris hőmérséklet alakulása ortopédiai nagyműtétek után. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia*;40:189-193 (2010).
2. Koller Á, **Vámos Z**, Koller ÁH, Cséplő P: Új eredmények a renin-angiotenzin rendszer és a hipertonia kutatásában. *Orvostovábbképző Szemle*, XVIII. Évf. 5. szám, 11-15, május (2011).
3. Ezer E, **Vámos Z**: Az agy keringés szabályozása (Az agyi autoreguláció élettani és klinikai aspektusai) *Aneszteziológia és Intenzív Terápia* 42(3):425-429 (2012).
4. **Vámos Z**, Cséplő P, Koller Á: Az életkor hatása a vaszkuláris renin–angiotenzin rendszer működésére. *Hypertónia és Nephrológia* 16(5):187-200 (2014).
5. **Vámos Z**, Kanizsai P: A többszervi elégtelenség. *Focus Medicinae* (2014).

Magyar nyelvű absztraktok száma: **95**

TANKÖNYVI FEJEZETEK:

1. Kórélettani alapok – **Vámos Zoltán**: A kórélettan sürgősségi vonatkozásai (16.-ik fejezet) (Szerkesztő: Székely Miklós) (Medicina könykiadó: 2010, 2013).
2. Neuronról a viselkedésig – Ezer Erzsébet, Cséplő Péter, **Vámos Zoltán**: Súlyos koponyasérültek akut ellátása. (Szerkesztő: Komoly Sámuel (Magyar, Angol, Német nyelven) (E-book; 2014).
3. Kórélettani alapok – lektor, fejezetszerző **Vámos Zoltán**: A kórélettan sürgősségi vonatkozásai (16.-ik fejezet egyetemi jegyzet 2005-2010 Magyar, Angol, Német nyelven).

IDÉZHETŐ IDEGEN NYELVŰ ABSZTRAKTOK

1. Kanizsai P., **Vámos Z.**, Kardos M., Szelényi Z.: Mechanism of the return of daily energetic rhythms following surgical stress in mice. *Acta Physiol. Hung.* 94: 356-357 (2007)
2. Kanizsai, P., **Vámos Z.**, Szelényi Z.: Effects of steroid treatment on the return of circadian temperature rhythms after surgical stress in mice. *Clin. Neurosci. Ideggyógyászati Szemle* (2008)
3. Balaskó M., Vinagre J. M., Pétervári E., Solymár M., **Vámos Z.**, Székely M.: Relationship between the effects of a central leptin infusion and the feeding rats. *Acta Physiol. Hung* (2008)
4. **Vámos Z.**, Garami A., Cséplő P., Soós Sz., Székely M.: Effects of a central alpha-MSH infusion on parameters of energy balance in young and old rats *Acta Physiol. Hung* (2008)
5. Soós Sz., Cséplő P., **Vámos Z.**, Pétervári E., Székely M.: Age-related alterations in alpha-MSH-induced acute anorexia *Acta Physiol. Hung* (2008)
6. Toth P., **Vámos Z.**, Rozsa B., Hamar J., Komoly S., Koller A.: Flow/shear stress-induced constrictions of rat middle cerebral artery. "Works and Views in Endothelium dependent vasodilation", Iasi, May 13-14., 2009. In: Abstract book: Works and Views in Endothelium Dependent Vasodilation, In: *Faseb J.* 24/1 976.1, (2010)
7. **Vámos Z.**, Cseplo P., Rozsa B., Hamar J., Koller A.: Differences in angiotensin I- and II-induced responses of isolated carotid arteries. Role of ACE and AT1 receptors. "Works and Views in Endothelium dependent vasodilation", Iasi, May 13-14., 2009. In: Abstract book: Works and Views in Endothelium Dependent Vasodilation, In: *Faseb J.* 24/1 976.1, S5 (2010)
8. Balaskó M., Vinagre JM., Pétervári E., Solymár M., **Vámos Z.**, Székely M.: Relationship between the effect of a central leptin infusion and the feeding state of rats. *Acta Physiol. Hung.* 96 55-56 (2009)
9. Koller A., Marki A., Gara E., **Vámos Z.**, Veres Z.: Superoxide release which interferes with NO-mediated dilations., FEPS 2009, Ljubjana, Slovenia, Nov. 12-15., 2009. Abstract book, pp:251., *Acta Physiologica Hungarica* 2009; Volume 197, Supplement 675 P2370 (2009)
10. Toth P., **Vámos Z.**, Rozsa B., Tekus E., Cseplo P., Komoly S., Koller A. Increases in flow/shear stress elicit constriction of small cerebral arteries. Magyar Élettani Társaság (MÉT), Budapest, Aug. 27-29., 2009. In: *Acta Physiologica Hungarica*, 97(1):144-145, (2010)
11. Toth P., **Vámos Z.**, Springo Zs., Komoly S., Doczi T., Koller A.: Flow/shear stress-induced constriction of rat middle cerebral artery, *Experimental Biology*, Anaheim, April 24-28., *Faseb J.*, 24/1 976.1, (2010)

12. Koller A., Toth P., Rozsa B., Cseplo P., Hamar J., **Vamos Z.**: Aging-induced changes in angiotensin II-induced contractions and tachyphylaxis of isolated carotid arteries. *Experimental Biology*, Anaheim, April 24-28., *Faseb J.*, 24/1, 775.1 (2010)
13. Magyar K., **Vamos Z.**, Bruszt K., Solti I., Cseplo P., Hideg K., Sumegi B., Toth K., Halmosi R., Koller A.: Egy új PARP-gátló vazoprotektív hatása spontán hipertóniás patkányokban. Vasoprotective effects of a novel PARP-inhibitor in spontaneously hypertensive rats. *A Magyar Kardiológusok Társasága 2010. évi Tudományos Kongresszusa, Balatonfüred, May 5-8., 2010*, In: *European Heart Journal*, 31:84-84, (2010)
14. Cséplő P., **Vámos Z.**, Hamar J., Koller Á.: Modeling of vasomotor effects of hemorrhagic stroke in isolated rat cerebral arteries. 5th Pannonian Symposium on Central Nervous System Injury, Pécs, May 13-15., 2010., In: *Clinical Neuroscience*, 63:200-201 (2010)
15. Koller A., **Vamos Z.**, Cseplo P., Toth P., Rozsa B., Hamar J.: Age-related changes in the angiotensin II-induced vasomotor activity, ESC Congress, Stockholm, August 28.-Sept. 1., 2010., In: *European Heart Journal*, 31:101-101, Suppl.1.(2010)
16. Papp J., **Vámos Z.**, Sándor B., Tóth A., Rábai M., Kenyeres P., Cséplő P., Koller Á., Tóth K.: Acetilszalicilsav és metamizol trombocita aggregáció gátló hatásának in vitro összehasonlítása egészséges önkéntesek vérmintáin. Magyar Élettani Társaság LXXV. Vándorgyűlése, Pécs, június 8-11., 2011., In vitro comparison of platelet aggregation inhibitory effect of acetylsalicylic acid and metamizole in blood samples of healthy subjects. In: *Acta Physiologica Suppl* 684. 202:91, (2011)
17. Cséplő P., **Vámos Z.**, Tucsek Zs., Pákai E., Koller Á.: In vitro model of hemorrhagic stroke: extraluminal blood increases basal tone and impairs vasomotor responses of isolated rat cerebral arteries. Magyar Élettani Társaság LXXV. Vándorgyűlése, Pécs, június 8-11., 2011., In: *Acta Physiologica Suppl* 684. 202:23, (2011)
18. Cseplo P., **Vamos Z.**, Toth P., Hamar J., Koller A.: Vasomotor effects of hemolysed blood in isolated rat cerebral arteries. 2nd International Symposium on Hypertension Osijek - Conference of Young investigators researching hypertension (CYH) Pecs (HU)-Osijek (HR) Nov 17-21., 2010., In: *Kidney & Blood Pressure Research*, 2010 (33):417, 2nd International Symposium on Hypertension. Translational Medicine in Hypertension. Final programme and abstract book. Page:23 (2010)
19. Magyar K., **Vamos Z.**, Bruszt K., Balogh A., Kálai K., Hideg K., Seress L., Sumegi B., Koller A., Halmosi R., Toth K.: Poly (ADP-ribose) polymearase inhibition reduces vascular remodeling in a chronic hypertension model.. - Conference of Young investigators researching hypertension (CYH) Pecs (HU)-Osijek (HR) Nov 17-21., 2010., In: *Kidney & Blood Pressure Research*, 2010 (33):425, 2nd International Symposium on Hypertension. Translational Medicine in Hypertension. Final programme and abstract book, Page:30 (2010)

20. Papp J., Sándor B., Tóth A., Rábai M., **Vámos Z.**, Kenyeres P., Koller Á., Tóth K.: Effects of hyperhomocysteinemia on various hemorheological parameters. - Conference of Young investigators researching hypertension (CYH) Pecs (HU)-Osijek (HR) Nov 17-21., 2010., In: *Kidney & Blood Pressure Research*, 2010 (33):428, 2nd International Symposium on Hypertension. Translational Medicine in Hypertension. Final programme and abstract book, Page:32. (2010)
21. Magyar K., **Vámos Z.**, Bruszt K., Balogh A., Kállai T., Hideg K., Seress L., Sümegi B., Koller Á., Halmosi R., Tóth K.: Inhibition of Poly(ADP-ribose) polymerase reduces hypertension induced vascular remodeling in spontaneous hypertensive rat model. Second international Symposium on Hypertension, november 18-21, 2010, Osijek, Croatia, *Kidney and Blood Pressure Research*; 33: 425 (2010)
22. Magyar K., Riba A., **Vámos Z.**, Balogh A., Deres L., Hideg K., Sümegi B., Koller A., Halmosi R., Tóth K.: The role of AKT and mitogen-activated protein kinase systems in the protective effect of PARP inhibition in a chronic hypertensive rat model. Magyar Élettani Társaság LXXV. Vándorgyűlése, Pécs, június 8-11., 2011., In: *Acta Physiologica Suppl* 684. 202:73, (2011)
23. **Vámos Z.**, Cséplő P., Koller A. H., Kósa D., Hamar J., Koller Á.: Az angiotenzin II-indukálta vazomotor válasz és az AT1-receptor expresszió korfüggő változása. Aging alters angiotensin II-induced contractile responses of rat carotid arteries. Correlation with changes in blood pressure and expression of AT1-receptors. Magyar Élettani Társaság LXXV. Vándorgyűlése, Pécs, június 8-11., 2011. In: *Acta Physiologica Suppl* 684. 202:126, (2011)
24. **Vámos Z.**, Cseplo P., Koller A., Toth P., Degrell P., Hamar J.: Aging dependent changes in angiotensin II-induced contractions of isolated rat carotid arteries. 2nd International Symposium on Hypertension Osijek - Conference of Young investigators researching hypertension (CYH) Pecs (HU)-Osijek (HR), Nov. 17-21., 2010., In: *Kidney & Blood Pressure Research*, 2010 (33):436, 2nd International Symposium on Hypertension. Translational Medicine in Hypertension. Final programme and abstract book., Page:38. (2010)
25. **Vámos Z.**, Cseplo P., Koller H., Degrell P., Hamar J., Toth P., Koller A.: Functional availability of vascular angiotensin type 1 (AT₁) receptors is altered by aging., *EB* 2011., Washington, ápr. 9-13., 2011., In: *FASEB J* March 17, 2011 25:635.2 (2011)
26. Cseplo P., **Vámos Z.**, Koller A.: Hemolysed blood-induced vasomotor dysfunction in isolated rat cerebral arteries. *EB* 2011., Washington, ápr. 9-13., 2011. *FASEB J* March 17, 25:1b435 (2011)
27. Magyar K., **Vámos Z.**, Solit I., Hideg K., Sümegi B., Koller Á., Halmosi R., Tóth K.: Vasoprotective effects of a novel PARP- inhibitor in spontaneously hypertensive rats. Congress of the European Society of Cardiology, 28 August - 01 September, 2010, Stockholm, Sweden, *EHL*, 31, Abstract Suppl., 84 (2010)
28. Cseplo P., Torok O., Springo Zs., **Vámos Z.**, Kosa D., Hamar J., Koller A.: Hemolysed blood elicits substantial constriction of isolated basilar artery, which is

restored by calcium channel blocker and increased CO₂. FCVB, London, március 30-április 1., 2012., In: Cardiovascular Research, 93: p. S75., (2012)

29. Ivic I., **Vamos Z.**, Cseplo P., Kosa D., Torok O., Hamar J., Koller A.: Vascular contractility increases from newborn to senescence. FCVB, London, március 30-április 1., 2012., In: Cardiovascular Research, 93: p. S75., (2012)
30. Cseplo P., Torok O., **Vamos Z.**, Kosa D., Springo Zs., Hamar J., Koller A.: Perivascular blood induces substantial constrictions of isolated basilar artery, which can be reversed by high pCO₂ EB 2012, San Diego, április 21-25., 2012., In: Faseb J. 26:707.3, (2012)
31. **Vamos Z.**, Cseplo P., Batai I. Z., Torok O., I. Ivic, Matics R., Hamar J., Koller A.: Changes in angiotensin II-induced vasomotor function from newborn to senescence: correlation with expression of AT₁ and AT₂ receptors. Experimental Biology 2013, Boston, április 20-24., 2013, Faseb Journal 27: p. 1165.4. 1 p. (2013)
32. Papp J., Sándor B., Toth A., Horváth Z., Botor D., Rábai M., Kenyeres P., **Vámos Z.**, Cséplő P., Koller Á., Tóth K.: In vitro and in vivo comparison of platelet aggregation inhibitory effect of acetylsalicylic acid, metamizole and their combination. 14th International Congress of Biorheology and 7th International Conference on Clinical Hemorheology, July 4-7, 2012, Istanbul, Turkey, Biorheol, 49, 110, (2012)
33. **Vámos Z.**, Dancs K., Ivic I., Cséplő P., Koller Á.: Subcellular mechanisms of AT₁-receptor mediated vasomotor responses change with aging. Congress of Croatian Physiological Society and 1. Regional Congress of the Physiological Societies, Rijeka, szeptember 13-15., 2013. In: Periodicum Biologorum 115: Suppl2, 58, (2013)
34. Ivic I., **Vamos Z.**, Cseplo P., Koller A.: During physiological aging the contractile force of arteries increases. Congress of Croatian Physiological Society and 1. Regional Congress of the Physiological Societies, Rijeka, szeptember 13-15., 2013. In: Periodicum Biologorum 115: Suppl2, 29, (2013)
35. Cseplo P., **Vamos Z.**, Kalinics P., Torok O., Csato V., Batai I.Z., Toth A., Koller A.: Role of intracellular calcium-ion in the development of hemolysed-blood induced cerebrovascular constriction. International Neurotrauma Society (INTS 2014), Budapest, március 19-23., 2014. Journal of Neurotrauma, in press (2014)
36. Ivic I., **Vamos Z.**, Cseplo P., Szollosi R., Reglodi D., Tamas A., Koller A.: Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) induces age-dependent changes in vasomotor responses on isolated rat arteries. International Neurotrauma Society (INTS 2014), Budapest, március 19-23., 2014. Journal of Neurotrauma, in press (2014)
37. Ezer E., Csabai L., Cseplo P., Kanizsai P., Szenohradszki K., **Vamos Z.**: Effect of Intravenous administration of NSAIDs on platelet aggregation after herniated disc surgery International Neurotrauma Society (INTS 2014), Budapest, március 19-23., 2014. Journal of Neurotrauma, in press (2014)

- 38. Vamos Z.,** Cseplo P., Belak M., Ivic I., Molnar T., Koller A.: The Ca²⁺-binding protein S100B elicits a concentration-dependent relaxation on isolated cerebral arteries. International Neurotrauma Society (INTS 2014), Budapest, március 19-23., Journal of Neurotrauma, in press (2014)
- 39. Vamos Z.,** Cseplo P., Ivic I., Toth G., Tamas A., Reglodi D., Akos Koller: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) induces location- and age-related relaxations of isolated arteries. Acta Physiologica, 211, SI Supplement: 697, 97. FEPS 2014, Budapest, augusztus 27-30, (2014)

Kutatásaimat az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA) OTKA K71591, K67984, K 108444; Társadalmi Megújulás Operatív Program, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0024; TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 és a Magyar Hipertónia Társaság (MHT) 2010/2011, 2013/2014 pályázatok támogatták.