

**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,
SZENTÁGOTHA JÁNOS KUTATÓKÖZPONT
Pécs, 2015**

1. BEVEZETÉS

Az időskorúak száma a népességben belül világszerte jelentősen növekszik, ezért az öregedés a társadalomtudományokkal foglalkozó kutatók mellett, a biológusokat és orvosokat is foglalkoztatni kezdte (Beregi, 1984). Az öregedés során a szervezet sejtjei, szövetei, szervei halmazott módon módosulnak. Nem kivétel ez alól a kardiovaszkuláris rendszer sem, ahol az életkorral a teljes vaszkuláris (centrális és perifériás) hálózat biomechanikai és funkcionális tulajdonságai fokozatosan változnak (Ungvari, 2011; Valcarcel-Ares 2012). Az angiotenzin II (Ang II), mint a Renin-Angiotenzin Rendszer (RAS) fő effektor hatású molekulája, az Angiotenzin 1 -Receptor (AT_1R) aktiválása révén fontos szerepet játszik a vaszkuláris ellenállás és ez által a szisztémás vérnyomás szabályozásában. Ugyanakkor, az ismételt Ang II hozzáadása során kapott vazomotor válaszok, a vaszkuláris AT_1 -receptor (AT_1R) és AT_2 -receptor (AT_2) - mRNS valamint AT_1R -fehérje expresszió korfüggése ez idáig nem kellő képpen ismert. Korábbi izolált erekben végzett vizsgálatok öregedéssel az Ang II - indukálta vazokontrakció csökkenését írták le patkány mellkasi aorta preparátumokon (Wakabayashi, 1990), míg mások nem találtak különbséget 1-18 hónapos normotenziós Wistar-Kyoto hím patkányok, basiláris és mesenterialis artériák Ang II - indukálta vazokonstriktor válaszai között (Moreau, 1998). Konishi és mtsai a vazokonstriktor válasz erősségének csökkenését találták (mesenterialis erekben) 1-8 hónapos normotenziós patkány korcsoportok között (Konishi, 1997). Saito és mtsai a spontán hipertóniás patkányokban koraival az Ang II-indukálta kontraktilitás fokozódását mutatták ki izolált coronaria erekben (Saito, 1998). Az irodalomban található ellentmondásos eredményekre számos lehetséges magyarázat adható, pl.: a különböző életkorú illetve patkánytörzsű kísérleti patkányok, a különböző erekben illetve különböző módszerrel (izotóniás vs. izometriás rendszerek, in vivo mérések vs. in vitro) végzett kísérletek. További lehetséges magyarázat, hogy a pathológiás körülmények jelenléte, mint például a magas intralumináris nyomás, aminek következtében az AT_1R expressziója illetve funkcionális aktiválhatósága nőhet (Dudley, 1990; Bagi, 2008; Escobales, 2009). Az ismételt Ang II hozzáadása során jelentkező válaszok kontrakciós erejének csökkenése (tachyphylaxia) illetve annak háttérben lévő mechanizmusok folyamatos kutatások témája (Hollenberg, 1971; Bagi, 2007). Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai (Bagi, 2008) igazolták, hogy az ismételt Ang II hozzáadások következtében létrejövő kontrakciós erő csökkenés háttérben az AT_1R internalizációja és deszenzitizációja is állhat (Lefkowitz, 1998, Hunyady, 2000). Bár az öregedés a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásában meghatározó tényező (Docherty 1990; Escobales, 2009), mégis nagyon keveset tudunk arról, hogy az öregedés hogyan és miként módosítja az erek Ang II-indukálta vazomotor válaszait, a tachyphylaxiát, valamint az érfalban mérhető AT_1R - AT_2R -mRNS és AT_1R -fehérje expresszióját.

2. HIPOTÉZISEK

A jelen értékezés alapját képező kutatásban feltételeztük, hogy patkányban újszülött-kortól - aggyastán-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 AT₁R-től, az endotéliumtól valamint az AT₂R-től függetlenül közvetítődik;
- 5) az AT₁R-ok döntően az erek simaizom rétegében helyezkednek el;
- 6) az AT₁R-mRNS és AT₁R-fehérje expressziója, valamint az AT₂R expressziója változik.

3. CÉLOK

A hipotéziseink bizonyításához, különböző korú patkányból izolált carotis communis artériák vazomotor válaszait vizsgáltuk, majd ezen erekben az AT₁R expresszióját qRT-PCR és Western blot technikával, lokalizációját immunohisztokémiai módszerrel vizsgáltuk. Az izolált ér technika lehetővé teszi, az artériák un. intrinsic funkcióinak és mechanizmusainak vizsgálatát, 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).

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Kísérleti állatok, altatás

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. 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).

4.2. Műtétek

4.2.1 Az invazív vérnyomásmérés

Az altatott patkányok bal oldali carotis communis artériáiba egy polietilén katétert vezetünk, majd a kanült egy nyomás-transducerhez (Experimetria, Budapest, Magyarország) csatlakoztattuk. Az artériás középnyomást (MABP) digitálisan az ISOSYS program segítségével számítottuk ki (Ordodi, 2005; Subramani Parasuraman, 2012).

4.2.2. 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 artéria carotis communisok izolálását követően, az érgyűrűkbe két-két rozsdamentes acélból készült drótot vezetünk (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. 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.

4.2.3. 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.**

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

A vaszkuláris endotélium réteget az ereken áthúzott lenszöke 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).

4.3. 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. Intermediereként xilolt használtuk és paraffinos átítatás 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 megfestették. 10 perces desztillált vízben való öblítés után, a metszeteket haematoxilinnal felülfestették, kékítették, felszálló alkohol soron víztelenítették, majd xilol öblítés után Pertexxel lefedték. Negatív kontrollnak ugyanezt az eljárást alkalmaztuk, a primer specifikus antitest elhagyásával. A felvételeket Leitz Laborlux D mikroszkópra rögzített Olympus E 450 típusú kamerával készítettük. Az immunohisztológiai eljárás Diniz és munkatársai leírása alapján végeztük (Diniz, 2007).

4.4. 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 óráig, 3% - os zsírtmentes 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 torma 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 glicerin-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.

4.5. 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 un."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'

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

5. 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.

6. EREDMÉNYEK

6.1. Patkány artériás középnyomásértékek életkorfüggő alakulása

Az altatott patkányok MABP értékei korfüggő eloszlást mutatnak: azaz újszülött kortól (8 napos) felnőtt korig (4 hónap) nőtt, majd aggastyán korra (30 hónap) csökkent.

6.2. Az izolált carotis artériák kontrakciós erejének vizsgálata

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

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

A carotis artériákban, az Ang II jelentős kontrakció során a kontrakciós "csúcs" elérése 1 hónapos kortól 6 hónapos korig nőtt (1 hónap), majd 24 hónapos korra (24 hónap:) csökkent. A relaxáció ideje 1 hónapos kortól 24 hónapos korig fokozatosan csökkent.

6.4. Az Ang II-indukálta kontrakciós erő alakulása az életkor függvényében

Az Ang II-indukálta maximális kontrakciós erők nagysága "harang alakú" eloszlást mutatott, azaz újszülött kortól (8 napos) felnőtt korig nőtt (6 hónap), majd aggastyán korra csökkent (30 hónap).

6.5. 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 (8 nap) fiatal-felnőtt korig nőtt (2 hónap), majd aggastyán korra csökkent (30 hónap).

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

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) – idős-felnőtt korig (9 hónapos) a válaszok közötti különbség nőtt, majd aggastyán korra (30 hónapos) csökkent.

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

Eredményeink szerint, az Ang II-indukálta kontrakciós erő szignifikánsan nem különbözött endotélium jelenlétében és hiányában, egyik korcsoportban sem (2 hónap vs 24 hónap).

6.8. Az AT₁R jelenléte patkány carotis artériák falában (simaizomban)

Az AT₁R-ok döntő többségben a simaizom rétegben helyezkednek el. A hisztokémiailag a barna színnel jelzett AT₁R-immunokomplexek a teljes érfalban megtalálhatóak.

6.9. Az Ang II-indukálta kontrakció erejének változása AT₁R blokkoló jelenlétében és hiányában

Az AT₁R blokkoló jelenlétében, az Ang II hozzáadása nem okozott érdemi kontrakciót, sem fiatal (2 hónapos), sem öreg (24 hónapos) patkány carotis artériákban.

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

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

6.11. 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).

6.12. A vaszkuláris AT₂R–mRNS expresszió változása az életkor függvényében

A carotis artériák falában az AT₂R-mRNS expressziója újszülött (8 napos) kortól – idős-felnőtt (18 hónapos) korig nőtt, majd aggastyán (30 hónapos) korig továbbiakban nem változott.

6.13. A vaszkuláris AT₁R-fehérje expresszió változása az életkor függvényében

A carotis érfalban vizsgáltuk az AT₁R-fehérje korfüggő expresszióját. Eredményeink azt mutatják, hogy az AT₁R-fehérje expresszió újszülött (8 nap) kortól idős-felnőtt (16 hónap) korig nőtt, majd aggastyán (30 hónap) korra csökkent.

7. 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 kísérlet-sorozatunk eredményei szerint, az AT₁R közvetített konstriktor válasz, valamint annak háttérében lévő AT₁-mRNS és -fehérje expresszió a vérnyomáshoz hasonlóan az életkorral folyamatosan módosul és egy harang alakú görbét ír le.

8. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Kísérleti patkányokban végzett kutatásaink **új eredményei a következők:**

1. A MABP korfüggő eloszlást mutatt: az újszülött kortól a felnőtt korig nő, majd a felnőtt kor végétől az aggastyán korig csökken;

Az izolált carotis artériákban:

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

9. KÖVETKEZTETÉSEK

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 tudathatók 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.

IRODALOM

- Ungvari Z, Bailey-Downs L, Gautam T, et al. 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*. 2011;66:866–875.
- Ungvari Z, Csiszar A. The emerging role of IGF-1 deficiency in cardiovascular aging: recent advances. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012;67:599–610.
- Valcarcel-Ares MN, Gautam T, Warrington JP, et al. Disruption of Nrf2 signaling impairs angiogenic capacity of endothelial cells: implications for microvascular aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012;67:821–829.
- Ungvari Z, Tucsek Z, Sosnowska D, et al. Aging-induced dysregulation of dicer1-dependent microRNA expression impairs angiogenic capacity of rat cerebromicrovascular endothelial cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013;68:877–891.
- Wang M, Takagi G, Asai K, et al. Aging increases aortic MMP-2 activity and angiotensin II in nonhuman primates. *Hypertension*. 2003;41:1308–1316.
- Diz DI, Lewis K. Dahl memorial lecture: the renin-angiotensin system and aging. *Hypertension*. 2008;52:37–43.
- Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Age-related changes in vascular responses. *Exp Gerontol*. 1999;34:503–512.
- Tschudi MR, Lüscher TF. Age and hypertension differently affect coronary contractions to endothelin-1, serotonin, and angiotensins. *Circulation*. 1995;91:2415–2422.
- Konishi C, Naito Y, Saito Y, Ohara N, Ono H. Age-related differences and roles of endothelial nitric oxide and prostanooids in angiotensin II responses of isolated, perfused mesenteric arteries and veins of rats. *Eur J Pharmacol*. 1997;320:175–181.
- 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*. 2008;295:H835–H841.
- 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*. 1997;30:649–656.
- Li Y, Mingqi Z, Wei W, et al. Developmental changes in AT1 and AT2 receptor-protein expression in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2010;11(4):214–221.
- Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Age-related changes in vascular responses. *Exp Gerontol*. 1999;34:503–512.
- Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008;31(suppl 2):S170–S180.
- Rothwell PM. The Interrelation between carotid, femoral and coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2001;22(1):11–14.
- 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*. 2012;49:363–372.
- Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization of angiotensin AT1 and AT2 receptors. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(suppl11):S23–S29.
- 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)*. 2002;15:343–346.
- Bartha E, Solti I, Kereskai L, et al. PARP inhibition delays transition of hypertensive cardiopathy to heart failure in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 2009;83:501–510.
- Nguyen Dinh Cat A, Touyz RM. A new look at the renin-angiotensin system—focusing on the vascular system. *Peptides*. 2011;32: 2141–2150.
- Wakabayashi I, Sakamoto K, Hatake K, Yoshimoto S, Kurahashi M. Effect of age on contractile response to angiotensin II in rat aorta. *Life Sci*. 1990;47:771–779.
- Cassis P, Conti S, Remuzzi G, Benigni A. Angiotensin receptors as determinants of life span. *Pflugers Arch*. 2010;459:325–332.
- Franklin SS, Gustin W IV, Wong ND, et al. Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. The Framingham Heart Study. *Circulation*. 1997;96:308–315.
- Anishchenko TG, Semyachkina-Glushkovskaya OV, Berdnikova VA, Sindyakova TA. Effect of age and sex on blood pressure, development of renal hypertension, and concentration of nitric oxide in the blood of albino rats. *Bull Exp Biol Med*. 2010;149:1–3.
- Xu J, Carretero OA, Liao TD, et al. Local angiotensin II aggravates cardiac remodeling in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299:H1328–H1338.

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: 4.954)
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).
5. Cseplo P, **Vamos Z**, Toth A, Ivic I, Torok O, Koller A: The specific beta-1-receptor blocker nebivolol elicits dilation of cerebral arteries by reducing smooth muscle [Ca²⁺]_i: *J. Vascular Pharmacology* (2015). Megjelenés alatt.

Nemzetközi folyóiratokban megjelent közlemények kumulatív impakt faktora: **12.365**

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

Idézhető idegen nyelvű absztraktok száma: **43**

Az idézhető idegen nyelvű absztraktok kumulatív impakt faktora: **138.79**

Magyar nyelvű közlemények:

1. **Vámos Z**, Cséplő P, Koller Á: Az életkor hatása a vaszkuláris renin–angiotenzin rendszer működésére. *Hypertónia és Nephrológia* 16(5):187-200 (2014).
2. **Vámos Z**, Kanizsai P: A többszervi elégtelenség. *Focus Medicinae* (2014).
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. Koller Á, **Vámos Z**, Koller ÁH, Cséplő P: Új eredmények a renin-angiotenzin rendszer és a hypertonia kutatásában. *Orvostovábbképző Szemle, XVIII. Évf. 5. szám*, 11-15, május (2011).

5. 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).

Magyar nyelvű absztraktok száma: **115**

Tankönyvi fejezetek:

1. Kórélettani alapok – **Vámos Zoltán**: A kórélettan sürgősségi vonatkozásai (16.-ik fejezet) (Szerkesztő: Székely Miklós) (Medicina könyvkiadó: 2010, 2013).
2. Neurontól 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).

Támogatás: 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.

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 szeretnék mondani kollégáimnak és tanáraimnak: Prof. Hamar János, Cséplő Péter, Springó Zsolt, Ivan Ivic, Matics Róbert, Degrell Péter, Bodnár Tamás, Csécsei Péter, Prof. Székely Miklós, Kanizsai Péter, Prof. Bogár Lajos, Ezer Erzsébet, Komáromi Gabor, Szenohradzki Katalin, Nagy Klára, Visnyei Tunde, Dusikné Dalma, Potóné Dalma, Pákai Eszter akik nélkül ezen dolgozat soha nem készülhetett volna el. Külön köszönöm a családomnak és szeretteimnek, akik minden tekintetben sajátjuknak érezhetnek mindent, amit valaha sikerült elérnem.