

Theoretical Medical Sciences Ph.D. Program

**AGE-DEPENDENT CHANGES IN ANGIOTENSIN II-INDUCED
ARTERIAL VASOCONTRACTION AND VASCULAR AT₁-RECEPTOR
EXPRESSION**

Ph.D. Thesis

Zoltan VAMOS MD

Tutor

Prof. Dr. Akos KOLLER

Head of the Ph.D. Program

Prof. Dr. Akos KOLLER

Head of the Ph.D School

Prof. Dr. Gabor L. KOVACS

**DEPARTMENT OF PATHOPHYSIOLOGY AND GERONTOLOGY
UNIVERSITY OF PÉCS FACULTY OF MEDICINE AND
SZENTÁGOTHAJ RESEARCH CENTER
PÉCS, 2015**

1. INTRODUCTION

Angiotensin II (Ang II) by activating angiotensin type 1 receptors (AT₁R) is one of the most potent vasoconstrictors in the regulation of vasomotor tone and thus systemic blood pressure. The topic of this thesis is the examination of age related changes in angiotensin II (Ang II) induced vasomotor activity, AT₁-Receptor (AT₁R and AT₂R) mRNA and AT₁R protein expression. In developing countries the aging and age-dependent physiological and pathological changes are important public health problem in modern society. Previous studies described the link between age-related molecular, cellular (Ungvari, 2011), and functional changes that occur in the cardiovascular system (Ungvari, 2012, Valcarcel-Ares 2012). These are important because the age-associated arterial structural and functional changes are closely linked to an impairment of coronary and cerebrovascular blood flow and development of cardiac ischemia and vascular cognitive impairment (Ungvari, 2013). With aging, the altered responsiveness of vessels and expression levels of the AT₁R and AT₂R mRNA level have been observed, but more details about the meaning and potential mechanism of the change of AT₁R and AT₂R expression during aging from young to senescence require further investigations (Wang, 2003) in order to understand the potentials of systemic and local renin–angiotensin system to regulate vasomotor functions. By now it is well established that aging reduces the dilator function of vessels, thereby contributing to the development of vasomotor dysfunction and dysregulation of peripheral vascular resistance (Diz, 2008). Much less is known regarding the age-dependent changes in the contractile functions of vessels, such as Ang II-induced vasomotor responses. This issue is important because Ang II plays an important role in the regulation of tissue blood flow peripheral vascular resistance, and thus blood pressure (Marin 1999). Previous studies suggested that aging decreases the contractile response of isolated rat thoracic aorta to Ang II (Tschudi, 1995). Other studies showed an age-dependent increase in the Ang II-induced contractile responses in isolated coronary arteries of spontaneously hypertensive rats; however, there were no differences observed in normotensive Wistar Kyoto rats from 1- to 18-month-old (Tschudi, 1995). Whereas others found that in mesenteric arteries, the Ang II-induced constrictions diminished with aging from 1- to 8-month-old rats (Konishi 1997). These findings appear to be controversial and could be due to several reasons: among others, many of these results have been obtained in different ages and species of animals and vessel preparations (Konishi 1997), and the experimental protocols were also different (varying in the length–tension curves, incubation time, oxygen concentration of bath chambers and so on). In addition, it is difficult to assess the magnitude of Ang II-induced responses of isolated vessels due to tachyphylaxis, namely the continuous reduction in Ang II-induced contractions after repeated administrations (Bagi, 2008, Leite, 1997). The primary vasomotor actions of Ang II have been attributed to the stimulation of the AT₁R, which exhibit desensitization as shown by the reduced constriction to sequential application of Ang II (Bagi, 2008). Interestingly, AT₁Rs are highly expressed in rat fetal brainstem tissues, which decreases during maturation; however, in whole kidney tissue, AT₁R expressions do not change between newborn

and senescence age (28 months) in Sprague–Dawley rat (Li, 2010). These data show that AT₁R can be differentially expressed under different developmental tissue- and disease-specific conditions (Li, 2010). Although numerous studies have shown that age is a dominant risk factor for cardiovascular diseases in association with the alterations in the vasomotor function of large arteries (Marin, 1999), at present, very little is known how aging modulates the vasomotor response to Ang II and the vascular expression of mRNA level and protein AT₁R and AT₂R-mRNA expression (Marin, 1999). These issues are important however, because Ang II is one of the key multiple role signalling molecules of the renin-angiotensin system responsible for the regulation of cardiovascular system, both in health and diseased conditions (Paravicini, 2008).

2. HYPOTHESIS

In the present study, we hypothesized that aging has a major impact on the mean arterial blood pressure (MABP), on magnitude and characteristic of Ang II-induced contractile responses-curves of isolated arterial vessels, which correlate with the vascular AT₁R-mRNA and AT₁-protein expression, but not with AT₂R-mRNS expression. Also, that the AT₁R are mostly present in the smooth muscle layer of the carotid arteries.

Thus, we characterized the vasomotor responses of isolated rat carotid arteries to repeated administrations of Ang II and vascular AT₁R and AT₂R mRNA and AT₁R protein expressions as a function of age, from newborn to senescence. For this study, we have chosen carotid arteries because experimental and clinical studies documented that carotid arteries mirror the changes occurring in coronary and cerebral vessels (Rothwell, 2001).

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Experimental animals and their housing

Different ages of male Wistar Kyoto rats were used: 8 days, 1, 2, 6, 9, 12, 24, and 30 months (body weights: 14±4 g (n=5), 108±14 g, 202±15 g (n=5), 281±15 g (n=5), 320±10 g (n=5), 292±18 g (n=5), 360±14 g (n=5), and 270±54 g (n=5). Rats were kept individually in plastic cages with approximately 3-5 cm wood shaving bedding. Food pellets were available ad libitum with the exception of fasting periods, when only tap water was provided. The experiments were run according to the general rules set in the Hungarian law on animals and the experimental protocols used were approved by the Ethical Committee of the Pécs University (BA02/2000–8/2008 directive).

3.2. Surgeries

Rats were operated under ketamine/xylazine anesthesia (78 mg/kg Calypsol [Richter] + 13 mg/kg [Eurovet]). The anesthesia was always the same regardless of the type of the surgery. After anesthesia, the common carotid arteries were isolated from the rats, cleaned, and prepared under an Olympus operation microscope and quickly transferred

into an ice/cold (4°C) oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) physiological Krebs solution, as described previously (Veresh, 2012). Then, the carotid arteries were dissected into 5-mm rings.

3.3. Measurement of arterial blood pressure

Rats were anesthetized with intraperitoneal ketamine + xylazine anesthesia (78 mg/kg calypsol [Richter] + 13 mg/kg [Eurovet], respectively) and placed on a heated pad to maintain body temperatures at 37°C. The left carotid artery was cannulated by a polyethylene catheter that was connected to a pressure transducer (Experimetria, Hungary), and the blood pressure was measured and monitored online by a data acquisition computer system (ISOSYS, Experimetria, Budapest, Hungary), and the mean arterial blood pressure was calculated.

3.4. Measurement of isometric force of isolated rat carotid arteries in response to Ang II

Each ring was positioned between two stainless steel wires (diameter 0.04 mm) in a 5-mL organ bath of a wire myograph system (DMT 610M, Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark). Isometric tension generated by the vessels was continuously measured, and the software Myodaq 2.01 M610+ was used for data acquisition and display. At the beginning of experiments, the length–tension curve—normalized to 2.0 g (13.34 mN)—was obtained, and the vessels were allowed to stabilize for 60 minutes before experimental protocols (Allen, 1999). At the beginning and the end of experiments, administration of 60 mM KCl was used to assess the vasomotor capability of carotid arteries (Paravicini, 2008). The bath solution was continuously oxygenated with a gas mixture of 95% O₂ plus 5% CO₂, and kept at 36.8°C (pH 7.4). In the first series of experiments, increasing doses of Ang II (10⁻⁹ to 10⁻⁵ mol/L) were administered to the vessels bath. Two dose–response curves to Ang II were obtained in a sequential manner (1-administrations and 2-administrations). In preliminary studies, we determined the optimal time delay between the two responses. We have found that 20 minutes was necessary for tachyphylaxis to develop (Bagi, 2008). In a group of experiments, the endothelium was removed by hair (Diz, 2007), and vasomotor responses were obtained in the presence and absence of endothelium. The functional presence or absence of endothelium was tested by the vasomotor responses to acetylcholine (Bagi, 2008). The vasomotor curves were characterized by time measurement (time from „baseline to peak”, time from „peak to baseline”)

3.5. Measurement of mRNA level of vascular AT₁R and AT₂R

To assess the expression of AT₁R and AT₂R in carotid arteries, mRNA extraction and quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction were used. Total RNA extraction from the right and left carotid arteries of rats (aged from 8 day to 30 months) and reverse transcription of RNA (0.5 µg) were performed as described previously (Zhang, 2008). One microliter of complementary DNA was used in the reactions 45 × 95°C for 15 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds preceded by an initial 95°C for 10 minutes. Downloaded from with Maxima SYBR

Green/Fluorescein qPCR Master Mixn(Fermentas, Burlington, Ontario, Canada). Detection was performed with the Chromo 4 System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The following primers were used:

Receptor / Control	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'

Statistical analysis of relative expression of the target gene was based on the $\Delta\Delta C_t$ -method with efficiency correction made with the program Opticon Monitor Version 3.1 (Bio- Rad, Hercules, CA, USA) normalized for the housekeeping gene 18S rRNA as previously.

3.6. Measurement of protein level of vascular AT₁R

According to previous studies (Bartha, 2009), segments of carotid arteries were homogenized in ice-cold 50 mM Tris-buffer, pH 8.0 containing protease inhibitor cocktail 1:1000 and 50 mM sodium vanadate (Sigma–Aldrich Co., Budapest) and harvested in 2 x concentrated sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. Proteins were separated on 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide electrophoretic gels. Proteins were transferred to Protran nitrocellulose membranes. After blocking (2 hours with 3% nonfat milk in Tris-buffered saline), membranes were probed overnight at 40°C with antibodies recognizing AT₁R (1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc.). Membranes were washed six times for 5 minutes in Tris-buffered saline (pH 7.5) containing 0.2% Tween before the addition of goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:3000, Bio-Rad, Budapest, Hungary). The antibody–antigen complexes were visualized by means of enhanced chemiluminescence. After scanning, results were quantified by NIH Image J program.

3.7. Localization of AT₁R in the vascular smooth muscle layer

We investigate the pattern of distribution of angiotensin AT₁R on carotid artery sections in Wistar-Kyoto rats. Immunohistochemistry using anti-AT₁ antibodies was performed on perfused-fixed/paraffin-embedded carotid arteries from rats. 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; activated by hydrogen peroxide) staining revealed distinct AT₁ labeling of all artery layers from WKY rats,

4. STATISTICAL ANALYSES

Based on the design of the actual experiment, for statistical analyses one-way ANOVA with post hoc test, and Tt-test were used, as appropriate. All results are presented as means \pm S.E.M. The level of significance was set at $p < 0.05$.

5. RESULTS

5.1. Changes in the mean arterial blood pressure of rats as a function of age

The mean arterial blood pressure of rats increased from newborn until the age of 6 months and then it did not change significantly until the age of 30 months.

5.2. Changes in the vasomotor responses of carotid arteries to the first administration of Ang II as a function of age

The vascular contractions of carotid arteries to the first administration of Ang II significantly increased from newborn (8 days) to the age of 6 months then it decreased to the age of 30 months, indicating the changes in the contractility of smooth muscle.

5.3. Changes in the vasomotor responses of carotid arteries to the second administration of Ang II as a function of age

The second administration of Ang II significantly increased from newborn (8 days) to the age of 2 months then it decreased to the age of 30 months.

5.4. Changes in the difference of vasomotor responses of carotid arteries between second and first administrations of Ang II as a function of age

The magnitude of tachyphylaxis, (calculated the difference between the second and first Ang II-induced contractile responses of carotid arteries) increased from newborn (8 days) to the age of 9 months, then decreased to the age of 30 months.

5.5. Characteristic of vasomotor response curve to Ang II-induced administration

The time to peak increased from newborn (8 days) to adult life (6 months), then decreased to the old age (24 months). The time from peak to baseline decreased from newborn (8 days) to old age (24 months)

5.6. Vasomotor responses of carotid arteries to Ang II in the presence and absence of the endothelium

The potential modulatory role of endothelium was tested in isolated carotid arteries of 2- and 24-month-old rats. We have found no significant differences in the Ang II-induced contractile responses of endothelium-intact and endothelium-denuded carotid arteries.

5.7. Vasomotor responses of carotid arteries to Ang II in the presence and absence of the AT₂R-blokker

The potential modulatory role of AT₂R was tested in isolated carotid arteries of 2- and 24-month-old rats. We have found no significant differences in the Ang II-induced contractile responses of AT₂R in young and old carotid arteries.

5.8. Changes in AT₁R-mRNA level in carotid arteries as a function of age

The relative AT₁R mRNA level substantially changed as a function of age: it significantly increased from newborn (8 days) to the age of 12 months then decreased to the age of 30 months.

5.9. Changes in AT₁R protein density in carotid arteries as a function of age

The AT₁R protein density significantly increased from newborn (8 days) to the age of 16 months, and then it decreased to the age of 30 months.

5.10. Changes in AT₂R mRNA level in carotid arteries as a function of age

The AT₂R mRNA level substantially changed as a function of age: it significantly increased from newborn (8 days) to the age of 18 months then did not change to the age of 30 months.

5.11. Localization of AT₁R in the wall of carotid arteries

The AT₁R-immunocomplexes are present in the dominantly in the smooth muscle layer of carotid arteries.

6. DISCUSSION

In the present thesis, we have focused our investigation on the contractile responses of isolated rat carotid arteries to Ang II as a function of age.

The novel findings of the present thesis are as follows:

- (1) MABP changes as a function of age: increases from new born until adult life, than decreases to senescence age;
- (2) The first Ang II-induced contractile responses increased from newborn until adult age, then decreased in senescent rats, exhibiting a “bell-shaped” curve;
- (3) The second Ang II-induced contractile responses reduced and showed a similar pattern to that observed at the first administration as a function of age;
- (4) The characteristic of the Ang II-induced vasomotor curves, also show an age dependency
- (5) The Ang II-induced an endothelium and AT₂R independent vasomotor response;
- (6) Vascular AT₁R mRNA and protein expression showed similar pattern as vasomotor responses to Ang II, first increased, and then decreased as a function of age;
- (7) Vascular AT₂R mRNA expression increased from new born to the adult life, did not change as a function of age;

(8) Vascular AT₁R are present dominantly in the smooth muscle layer of carotid arteries.

The important role of the renin - angiotensin system in the regulation of peripheral resistance and thus blood pressure has been well investigated and described previously (Nguyen, 2011). It has been shown that Ang II is one of the key molecules involved in the regulation of cardiovascular system, and it has many other functions (Nguyen, 2011). It is also known that the cardiovascular system is greatly affected by aging (Marin, 1999), among others aging likely affects the regulation of vascular resistance (Diz, 2008), which is known to be greatly influenced by Ang II (Wakabayashi, 1990). Thus, it seemed to be important to elucidate the vasomotor effect of Ang II as a function of age, which may also shed light on its many other functions. Interestingly, little is known regarding the aging-induced changes in the magnitude of vasomotor response elicited by Ang II, which, however, would be important to know because constriction of arterial vessels is the final effector mechanism modulating the resistance of vascular system by Ang II (Wakabayashi, 1990). The present study was conducted in carotid arteries isolated from rats from newborn (8 days) to senescence (30 months), which correspond to humans aged ~80 to 90 years (Franklin, 1997). Thus, our findings are important regarding the role of age-dependent regulation of arterial resistance by Ang II and its mediation by vascular AT₁R. In the present study, we have found that the systemic blood pressure of rats increased from newborn until the age of 4 months, and then it decreased to the age of 30 months. These findings are in agreement with findings of others (Cassis, 2010), showing the similar trends of changes in blood pressure with age in rats (Anisheenko, 2010) and humans (Franklin, 1997).

6.1. Physiological importance

The findings with the first and second administrations show that aging alters the mechanisms responsible for restoring the functional availability of AT₁Rs that can be activated. Although previous studies showed similar increase in the contractile responses of arterial vessels, they did not investigate the responses of very old and senescent rats (24–30 months). The findings that both Ang II-induced vascular contractility and systemic blood pressure are lower in very young and in old and senescent ages compared to the adults suggest different contribution of vascular AT₁Rs in determining vascular resistance and systemic blood pressure. There are a number of possible explanations for the findings that in very old and senescent age, vasomotor response to Ang II declines. For example, aging can lead to the alterations of AT₁Rs, such as changes in their density and/or sensitivity to action of agonist (Chiba, 1986). Although the physiological role of tachyphylaxis is still not clearly defined, nevertheless it gives the opportunity to investigate the behavior and signaling of AT₁R, all of which are greatly affected by aging. This leads to the altering of not only the vasomotor responses to Ang II but also other signaling mechanism attached to these receptors and thus stimulated by Ang II, such as activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and consequent free radical production

(Paravicin, 39) or cellular growth processes during hypertrophy of tissues (Xu, 2010), all of which may have physiological and clinical significances in aging.

7. SUMMARY

In conclusion, the novel findings of the present study are that Ang II-induced vascular contractions, tachyphylaxis, vascular AT₁R mRNA level, and protein expressions substantially change from newborn to senescence, showing bell-shaped curves. Thus, we propose that primarily genetic programs determine the regulation of vasoconstrictor responses to Ang II, in part, via the regulation of the functional availability of vascular AT₁Rs. Although further studies are warranted to understand the role of vascular renin-angiotensin system in the regulation of arterial resistance from newborn to senescence age, these findings add important novel aspects to our understanding of the age-dependent regulation of peripheral vascular resistance.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank Professor Dr. Akos Koller, my supervisor for tutoring, mentoring and funding this research, from whom I have learned how to do scientific research. I whole heartedly thank to my colleagues and teachers Prof. Janos Hamar, Peter Cseplo MD, Zsolt Springo MD, Ivan Ivic MsC, Robert Matics CsC, Peter Degrell MD, PhD, Prof. Miklos Szekely, Peter Kanizsai MD, PhD, Prof. Lajos Bogar, Erzsebet Ezer MD, Gabor Komaromi MD, Katalin Szenohradszki MD, Klara Nagy MD, Tunde Visnyei, Dalma Dusikne, Eموke Potóné, Eszter Pakai and also to my family for their continuous help and valuable advices.

REFERENCES

- 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 cerebrovascular 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 prostanoids 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.

LIST OF PUBLICATIONS

Publications in peer-reviewed journals (in English):

- 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)
- 5) Cseplő P, **Vámos 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). submitted.

Cumulative impact factor: **12.365**

Independent citations: **7**

Number of citable abstracts: **43**

Impact factor of citable abstracts: **138.79**

Other Publications (in Hungarian)

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).

Number of non-citable abstracts: **115**

Chapter publication:

1. Neurontól a viselkedésig – Ezer E, Cséplő P, **Vámos Z**: Emergency aspects in sever trauma brain injury. [Editor: Samul Komoly (Chapter: in Hungarian, English, German language) (E-book; 2014)].
2. Basic of Pathophysiology – **Vámos Zoltán**: Emergency aspects of pathophysiology (Chapter N^o: 16) (Editor: Székely Miklós) (Medicina könykiadó: 2010, 2013).
3. Basic of Pathophysiology – Review, author **Vámos Zoltán**: Emergency aspects of pathophysiology (Chapter N^o: 16 2005-2010 in Hungarian, English, German language).

**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 társadalomtudománnyal foglalkozó kutatók mellett, a biológusokat és orvosokat is foglalkoztatni kezdte (Beregi, 1984). Az öregedés során a szervezet sejtjei, szövetei, szervei halmozott 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 korrall 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 érgyűrűbe 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. Intermedierként 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 mutat: 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 koraival 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 életkorral változott: újszülött kortól felnőttkorig nőtt, majd aggastyán korra csökkent;
8. az AT₂R-mRNS expressziója életkorral 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 Medicinæ* (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.