

ENDOTELNA DISFUNKCIJA I HIPERTENZIJA

*Đurđica Jovović, Nevena Mihailović-Stanojević,
Zoran Miloradović*

S a ž e t a k: Hipertenzija je nerazdvojivo povezana sa funkcionalnim i strukturnim promenama na zidovima krvnih sudova, a endotel, kao endokrini organ i funkcionalna barijera ima važnu ulogu u regulaciji krvnog pritiska i hemodinamskih procesa. Endotel je mesto sinteze sekrecije i delovanja mnogobrojnih vazokonstriktornih i vazodilatatornih medijatora, čiji balans reguliše funkciju krvnih sudova i fiziološki nivo krvnog pritiska. Centralnu ulogu u ovoj regulaciji imaju najpotentniji vazokonstriktori endogenog porekla: endotelini i angiotenzin II, kao i moćni vazodilatatorni molekul azotni monoksid. U hipertenziji dolazi do oštećenja endotela, gubitka funkcije ili čak do njegove denudacije, što za posledicu ima promenu vaskularne reaktivnosti i strukturne promene na krvnim sudovima. Važnu ulogu u oštećenju endotela, uzrokovanom hipertenzijom, imaju slobodni kiseonični radikali, koji u fiziološkim uslovima imaju ulogu signalnih i modulatornih molekula, ali u promenjenim patofiziološkim procesima izazivaju toksične efekte, najvećim delom menjajući strukturu ćelijskih membrana. Poslednjih decenija endotel krvnih sudova predstavlja atraktivni model istraživanja, a mnoge terapijske strategije hipertenzije zasnivaju se na intervencijama koje anuliraju poremećen balans vazokonstriktornih i vazodilatatornih medijatora endotelnog porekla.

K l j u č n e r e č i: endotel, hipertenzija, endotelini, azotni monoksid, reaktivni kiseonični radikali, angiotenzin II.

A b s t r a c t: Hypertension is strongly connected with blood vessels structural and functional changes and endothelium as endocrine and functional organ has important role in blood pressure and haemodynamic regulation. Many vasoconstrictory and vasodilatory molecules are synthesized, secreted or directed by endothelium, and their balance regulates both blood vessels function and blood pressure value. The central roles in this regulation have the most potent vasoconstrictory agents as like as endothelins and angiotensin II and potent vasodilatory molecule nitric oxide. Endothelial damage, loose of functionality or even denudation, due to hypertension, lead to changes of vascular reactivity and structure. Free oxygen radicals have important role in hypertension-induced damage of endothelium.

Dr sc. med. Đurđica Jovović, *Laboratorija za kardiovaskularnu fiziologiju, Institut za medicinska istraživanja*, Beograd, Srbija i Crna Gora
Institut za medicinska istraživanja
Laboratorija za kardiovaskularnu fiziologiju
Dr. Subotića 4, PO BOX 102
11129 Beograd, Srbija i Crna Gora
Tel: (381 11) 68 57 88, 68 44 84
FAX: (381 11) 64 36 91
e-mail: djurdjica@imi.bg.ac.yu

They are signal or modulator molecules in physiologic conditions, but very toxic in pathophysiology, at most in part by cell membrane structural damage. Endothelium is attractive target for investigation during the last decade, and many therapeutic strategies have developed to abolish disbalance of vasoconstrictory and vasodilatory endothelial mediators.

Keywords: endothelium, hypertension, endothelins, nitric oxide, reactive oxygen radicals, angiotensin II.

Uvod

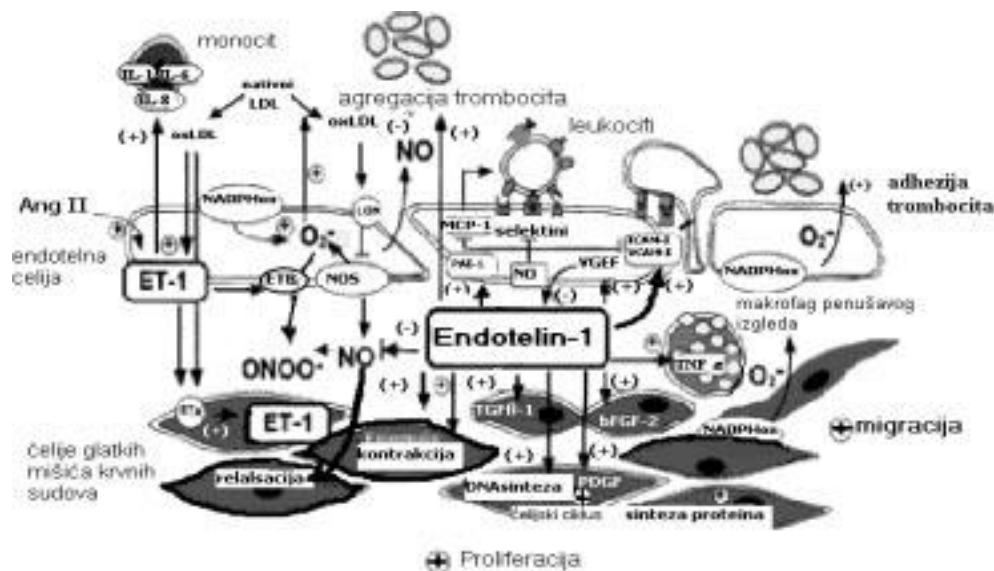
Hipertenzija je nerazdvojivo povezana sa funkcionalnim i strukturnim promenama u zidovima krvnih sudova. Brojne studije su pokazale da je odnos faktora relaksacije i faktora konstrikcije poreklom iz endotela poremećen, kako kod ljudi sa hipertenzijom tako i kod životinja sa eksperimentalno izazvanom hipertenzijom (1). Endotel, dakle, ne predstavlja samo strukturnu barijeru između cirkulacije i okolnog tkiva, već aktivno sintetiše i sekretuje faktore koji u fiziološkim uslovima učestvuju u regulaciji hemodinamike (2). Endotel učestvuje u regulaciji krvnog pritiska i protoka krvi oslobađajući vazodilatatorne supstance, azotni monoksid (NO) i prostaglandine (PGI₂) i hiperpolarizujući faktor (3) poreklom iz endotela (endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF) s jedne strane, i vazokonstriktivne supstance, endotelinske peptide (ET) i faktor aktivacije trombocita (PAF) sa druge strane (2). Njihov osnovni biološki efekat regulisan je lokalizacijom specifičnih receptora na ćelijama krvnih sudova, brzinom njihove razgradnje ili brzinom njihove genske transkripcije. Azotni monoksid se konstitutivno sintetiše u ćelijama endotela, a njegova sinteza može biti regulisana brojnim spoljašnjim fizičkim i hemijskim faktorima, dok se ET, PGI₂ i PAF sintetišu u odgovoru na promene spoljašnje sredine (2). Informacije koje se u citoplazmu ćelija prenose kao primarni signali deluju na nivou DNK tako što menjaju ekspresiju specifičnih gena. Jedan od primarnih signala su i slobodni kiseonični radikali ili reaktivna kiseonična jedinjenja koja sintetišu i oslobađaju ćelije mnogih tkiva (inflamatorne ćelije, fibroblasti, ćelije endotela, ćelije glatkih mišića krvnih sudova) u odgovoru na različite spoljašnje i unutrašnje stimuluse. Pored dobro poznatog toksičnog efekta reaktivnih kiseoničnih radikala (RKR), danas se zna da oni, kao sekundarni glasnici, učestvuju u regulaciji prenosa signala do efektornih gena i da na taj način kontrolišu njihovu ekspresiju. Takođe, oni učestvuju i u post translacionoj modulaciji proteina. Stoga se ovim jedinjenjima pripisuje važna uloga u brojnim patološkim stanjima uključujući Alzheimer-ovu bolest, različite oblike karcinoma pa i vaskularna oboljenja kao npr. ateroskleroza. U vaskularnom sistemu fiziološka uloga RKR ogleda se u regulaciji genske ekspresije tako što modulišu specifične redox-senzitivne puteve prenosa signala, a deluju i kao regulatori transkripcije. Hemodinamske promene do kojih dolazi u esencijalnoj hipertenziji karakterišu se povećanim otporom u perifernoj cirkulaciji, koji je posledica strukturnih, mehaničkih

i funkcionalnih promena perifernih krvnih sudova, a koje se intenziviraju starenjem kod spontano hipertenzivnih (SH) pacova (4). Osnovna strukturna promena podrazumeva suženje lumena i zadebljanje *tunica media* krvnih sudova, dok na ćelijskom nivou ove promene podrazumevaju hiperplaziju, hipertrofiju i elongaciju ćelija glatkih mišića krvnih sudova, zatim reorganizaciju ćelija koje okružuju lumen arterija i/ili poremećen sastav ekstracelularnog matriksa, što takođe doprinosi suženju lumena i smanjenju spoljašnjeg prečnika krvnog suda (5). Među brojnim vazoaktivnim supstancama koje utiču na vaskularnu hiperreaktivnost u hipertenziji, angiotenzin II zauzima najznačajnije mesto zbog perifernih i centralnih efekata koje ostvaruje u cirkulaciji.

Endotelinski peptidi i hipertenzija

Hickey i sar. (6) su 1985. god. otkrili, izolovali, sekvencirali i klonirali peptidni kontraktilni faktor poreklom iz endotela. Naziv endotelin potiče od Yanagisawa-e i sar. (1988.g.) (7). U humanom genomu identifikovana su tri različita gena koja kodiraju endoteline (ET), koji se nalaze na različitim hromozomima i različito su regulisani. Kod ljudi i životinja ET su eksprimirani u tri izopeptidne forme: ET-1, ET-2 i ET-3. Pod uticajem endotelin konvertujućeg enzima sa biološki neaktivnog prekursora, velikog ET, cepa se biološki aktivan zreo peptid ET. Dva podtipa ET receptora su klonirana i biološka aktivnost ET je ispitivana u brojnim animalnim i humanim tkivima *in vitro* i *in vivo* (6). Ekspresija endotelina regulisana je na nivou transkripcije preko vezujućih mesta AP-1 i NK-1 i regulacijom transkripcije forbol-estar senzitivnim *c-fos* i *c-jun* kompleksima (8), kao i na nivou translacije faktorima koji utiču na stabilnost mRNA. Sinteza ET je regulisana i fizičko-hemijskim faktorima kao što su «shear-stres» (napon smicanja ili trenje tj. sila kojom krv deluje na zid krvnog suda prilikom protoka (9)) i intracelularni pH. Fizički napor, hipoksija (jak stimulus za sintezu ET u uslovima ishemije), faktori rizika u kardiovaskularnim oboljenjima (povišen nivo oksidovanog LDL-a i glukoze), zatim nedostatak estrogena, gojaznost, konzumiranje kokaina, starenje, prokoagulantni medijatori (trombin npr.), vazokonstriktori, faktori rasta, citokini, i adhezioni molekuli stimulišu sintezu ET. Azotni monoksid (NO), prostaciklini, aatrijumski natriuretički peptid (ANP) i estrogeni inhibiraju sintezu ET (8). Endotelinski receptori pripadaju familiji G-protein vezanih receptora sa sedam transmembranskih domena (10). Specifična mesta vezivanja ¹²⁵I-ET-1 klasifikovana su prema njihovom relativnom afinitetu za vezivanje ET-skih izopeptida. ET_A podtip receptora karakteriše se veoma visokim afinitetom vezivanja za ET-1 i ET-2 i 70-100 puta manjim afinitetom vezivanja za ET-3. ET_B podtip receptora ima visok i jednak afinitet vezivanja za sve tri izopeptidne forme endotelina. U renalnoj arteriji starih SH pacova (11) kontraktilni odgovor na ET-1 ostvaruje se preko ET_A receptora na površini ćelija glatkih mišića krvnih sudova, ali i preko ET_B receptora na ćelijama

glatkih mišića krvnih sudova (sl. 1.). Endotel zavisna relaksacija starenjem se smanjuje kod spontano hipertenzivnih pacova. Ovaj fenomen je povezan sa pozitivnom regulacijom ET_B receptora na ćelijama glatkih mišića krvnih sudova i/ili pojačanim postreceptornim prenosom signala u starih hipertenzivnih pacova.



Slika 1. Vaskularni efekti ET-1. ET-1 se stvara u ćelijama endotela i glatkih mišića krvnih sudova u odgovoru na oksidovani LDL, angiotenzin II (ANG II), itd. Stimulacija endotelnih ET_B receptora povećava oslobađanje NO-a. Kontrakcija, proliferacija i migracija ćelija stimulisani su preko ET_A receptora. ET-1 stimuliše interleukine (IL) i tumor nekrotični faktor- α (TNF- α) u monocitima, adheziju leukocita, agregaciju trombocita i ekspresiju adhezionih molekula. ET-1 stimuliše stvaranje i delovanje faktora rasta, sintezu DNA i proteina i progresiju ćelijskog ciklusa. Legenda: ONOO⁻ – peroksinitriti; NOS – azot monoksid sintaza; MCP-1 – monosit hemoatraktantni protein-1; ICAM-1 – intracelularni adhezioni molekul-1; VCAM-1 – vaskularni adhezioni molekul-1; ox LDL – oksidovani lipoprotein niske molekulske gustine; O₂⁻ – superoksidni anjon; LOX – lektinu sličan receptor oksidovanog LDL-a; TGFβ-1 – transformišući faktor rasta β-1; NADPHox – oksidaza NADPH; PAI-1 – inhibitor aktivatora plazminogena-1; VEGF – faktor rasta vaskularnog endotela; bFGF-2 – osnovni faktor rasta fibroblasta-2; PDGF – faktor rasta poreklom iz trombocita; + – stimulatorno dejstvo; – - inhibitorno dejstvo. Lüscher, T. F., Barton, M. (2000) (8).

ET-1, ubrizgan *iv vivo*, izaziva snažnu konstrikciju renalnih, mezenteričnih i plućnih sudova u odnosu na ostale konstriktorne agense. Kada se da u bolusu (ET-1, -2, ili -3) dovodi do prolazne, kratkotrajne (1-2 min) vazodilatacije, a zatim sledi produžena vazokonstrikcija, koja kod pacova traje 2-3 h, pri čemu je intenzitet efekta ET-2 = ET-1 >> ET-3. Vazodilatacioni efekat ET povezan je sa aktivacijom

ET_B receptora na površini endotelih ćelija i stimulacijom stvaranja prostaglandina i azotnog monoksida. Vazokonstrikcija se ostvaruje aktivacijom ET_A receptora na ćelijama glatkih mišića krvnih sudova. Takođe, ET_B receptori na glatko-mišićnim ćelijama krvnih sudova doprinose vazokonstrikciji. Endotelini mogu da ostvare svoj efekat i indirektno (12), pojačavanjem efekta drugih vazokonstriktornih supstanci kada su one prisutne u praznim koncentracijama ili u koncentracijama nižim od njih (npr. noradrenalin, serotonin). Pored vazomotorne uloge, endotelini pokazuju i snažan proliferativni efekat na ćelijama glatkih mišića krvnih sudova kao i na mezangijalnim ćelijama bubrega (12).

Rezultati naših istraživanja u kojima smo ispitivali ulogu endotelinskog sistema u patogenezi progresivne bubrežne insuficijencije u hipertenzivnih pacova su pokazali da blokada endotelinskih receptora dvojnim blokatorom, bozentanom, ne dovodi do poboljšanja sistemskih i renalnih hemodinamskih parametara (krvni pritisak, frekvencu srca, renalni protok i glomerularne filtracije) kod starih spontanano hipertenzivnih pacova, da je ekskrecija vode blago povećana, a ekskrecija natrijuma značajno povišena što je verovatno posledica strukturnih oštećenja na nivou bubrega (13). Rezultati histopatološke analize ukazuju na nepovoljan efekat blokade oba podtipa ET receptora i eventualno potencirani efekat ANG II u datim eksperimentalnim uslovima. Na osnovu dobijenih rezultata nameće se pretpostavka da endotelinski sistem verovatno ne igra značajnu ulogu u esencijalnoj hipertenziji i prirodnom razvoju nefroskleroze usled starenja kod SH pacova (14). U uslovima hronične blokade sinteze NO-a nije pokazano značajno učešće cirkulišućeg endotelina u pogoršanju hipertenzije kod SH pacova (15). Ni u hipertenzivnom odgovoru izazvanom dugotrajnom inhibicijom sinteze NO-a kod normotenzivnih pacova cirkulišići nivo endotelina nema presudnu ulogu (16).

Azotni monoksid

Najmoćniji vazorelaksirajući medijator nazvan faktor relaksacije poreklom iz endotela (endothelium-derived relaxing factor-EDRF) identifikovan je kao endogeni NO (17,18).

NO se sintetiše iz L-arginina pomoću familije enzima azot monoksid sintaze (NOS). Dve izoforme ovog enzima su kalcijum zavisne: nNOS (moždana izoforma) i eNOS (endotelna izoforma) i ekspimiraju se konstitutivno. Endotelna izoforma NOS se sintetiše u ćelijama endotela i trombocitima. Sintaza eNOS je regulisana «shear stress-om» i brojnim agonistima aktivacije receptora i hormonima. NO sintetisan u prisustvu eNOS učestvuje u regulaciji krvnog pritiska, vaskularnog tonusa, agregacije trombocita. Kalcijum nezavisna izoforma enzima, nazvana inducibilna NOS (iNOS), ekspimirira se u endotelnim ćelijama, ćelijama glatkih mišića krvnih

sudova i u makrofagima, kao odgovor na brojne citokine i inflamatorne agense. Danas se zna da azotni monoksid (NO) ima značajnu ulogu u patofiziološkim mehanizmima nastanka hipertenzije, kao i u komplikacijama koje je prate. Pored uloge u relaksaciji krvnih sudova NO sprečava i adheziju i agregaciju trombocita. Primena inhibitora sinteze NO-a, infuzijom ili oralno, *in vivo* dovodi do endotel-zavisne konstrikcije izolovanih arterija, smanjenja protoka krvi, kao i uspostavljanja i održanja hipertenzije (19). Pored toga, NO učestvuje u modulaciji ANG II i noradrenalin-zavisne vazokonstrikcije renalne arterije (20). Pogoršanje hipertenzije izazvano dugotrajnom blokadom produkcije NO-a kod SH pacova verovatno je posledica ne samo otklanjanja toničkog vazodilatatornog efekta NO-a, već i povećane aktivnosti sistema renin–angiotenzin. Pokazali smo, takođe, da reninska aktivnost u plazmi normotenzivnih pacova nema ulogu u povećanju krvnog pritiska izazvanom inhibicijom sinteze NO-a (21). Antihipertenzivna terapija može da obezbedi funkcionalnost endotela u prisustvu inhibitora NO-a povećanom produkcijom alternativnih faktora relaksacije koje u normalnim uslovima endotel ne sintetiše (19).

Prostaglandini i tromboksan A₂

Eikosanoidi predstavljaju derivate arahidonske kiseline i sintetišu se u trombocitima i različitim delovima zidova krvnih sudova u reakcijama koje katalizuje ksantin oksidaza, enzim koji egzistira u najmanje dve izoforme: konstitutivnu formu COX-1 neosetljivu na glukokortikoide i inducibilnu izoformu COX-2, osetljivu na glukokortikoide. Brojni inflamatorni citokini učestvuju u regulaciji i aktivaciji sinteze inducibilne ksantin oksidaze u patofiziološkim stanjima. Inhibitor ksantin oksidaze, alopurinol, sam ili u kombinaciji sa enalaprilom, kod pacova sa urođenom hipertenzijom udruženom sa ishemično/reperfuzionom akutnom bubrežnom insuficijencijom dovodi do značajnog smanjenja ukupnog perifernog otpora nezavisno od primene enalapрила, dok samo tretman enalaprilom dovodi do sniženja pritiska (22).

PGI₂ se najvećim delom sintetiše u ćelijama endotela gde ispoljava antiagregatorni i vazodilatatorni efekat aktivacijom receptor vezane adenilat ciklaze. Porast cikličnog AMP-a u ćelijama glatkih mišića krvnih sudova dovodi do relaksacije. TxA₂ se sintetiše većim delom u trombocitima, dok se male količine stvaraju i u zidovima krvnih sudova. TxA₂ stimuliše agregaciju trombocita, vazokonstrikciju i proliferaciju ćelija glatkih mišića krvnih sudova mobilizacijom intracelularnog Ca²⁺. Balans ova dva antagonistička efekta eikozanoida igra odlučujuću regulatornu ulogu u perifernoj i koronarnoj vazomotorici (23). Heparin značajno povećava koncentraciju TxA₂ kod SH pacova, dok nivo PGI₂ i PGF₂α ostaje ne promenjen (24).

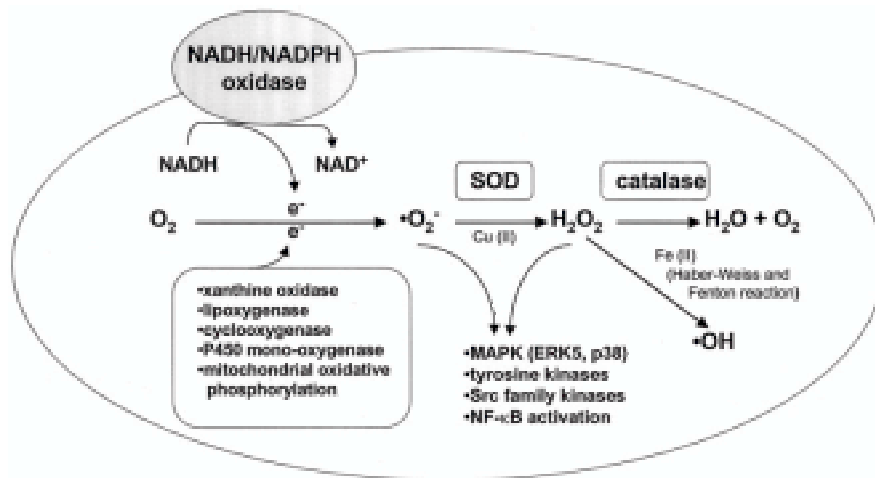
Reaktivni kiseonični radikali

Reaktivni kiseonični radikali učešćem u specifičnim redoks-senzitivnim putevima prenosa signala i regulacijom transkripcionih događaja (Sl. 2.), predstavljaju fiziološke regulatore ekspresije gena. U patološkim stanjima, kakva je hipertenzija, oksidativni stres zbog povećane produkcije kiseoničnih radikala može biti stimulisan ANG II, tj. indukcijom superoksidnih anjona preko NADPH oksidaze. Pored toga, ANG II stimuliše povećanu produkciju MCP-1 (makrofag hemoatraktantni protein-1) i VCAM-1 (vaskularni adhezioni molekul-1), koja može biti blokirana inhibitorima NADPH oksidaze i katalazom što ukazuje na doprinos NADPH oksidaze oksidativnom stresu i učešće u regulaciji inflamatornih gena generisanjem H_2O_2 (25).

Sistem renin-angiotenzin

Renin je otkriven pre više od jednog veka kao presorni agens u renalnom ekstraktu. Kasnija istraživanja su pokazala da je renin-angiotenzin sistem (RAS) biohemijski veoma složen, sa međusobno isprepletanim filogenetskim i evolutivnim aspektima. Osnovne komponente RAS sistema su: *renin* – proteolitički enzim molekulske mase oko 40 000 i nastaje proteolizom prekursorskog peptida *prorenina*; *angiotenzinogen* – reninski supstrat, je α_2 -globulin koji se sintetiše u jetri; *angiotenzin I*, dekapeptid; *enzim konverzije angiotenzina* (ACE) – dipeptidil karboksipeptidaza, nespecifična je tako da cepa dipeptide i sa drugih bioaktivnih molekula kao što su bradikinin, enkefalini i supstancija P; *angiotenzin II*, oktapeptid.

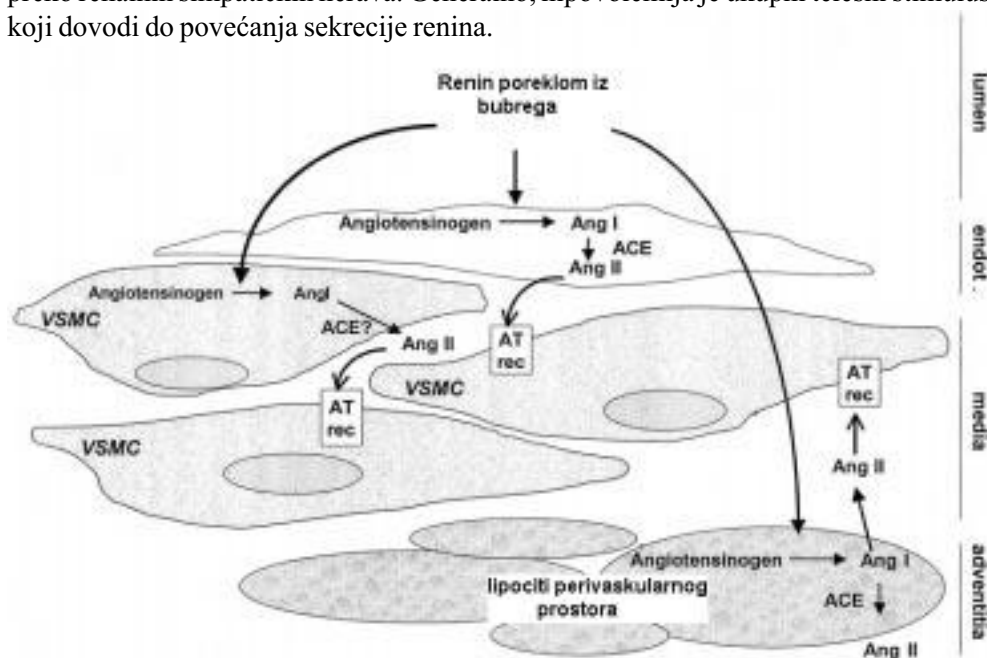
Bubreg čoveka luči i prorenin i renin u krvotok. Prorenin, čija je molekulska masa nešto veća od renina, izgleda da je identičan molekulu koji je ranije identifikovan kao neaktivni renin. Prema klasičnom shvatanju, sistem renin-angiotenzin je endokrini sistem u kome renin, sekretovan od strane bubrega, putem krvi dospeva u cirkulaciju, gde deluje na angiotenzinogen (reninski supstrat) koji sintetišu i sekretuju ćelije jetre. Cepanjem angiotenzinogena nastaje dekapeptid angiotenzin I koji se u prisustvu ACE konvertuje do oktapeptida, angiotenzina II. Konverzija se odigrava prevashodno u plućnoj cirkulaciji. Angiotenzin II zatim ostvaruje dve osnovne fiziološke uloge RAS sistema – održavanje krvnog pritiska i održavanje balansa vode i elektrolita u organizmu, delujući na brojne ciljane organe uključujući zidove krvnih sudova, nadbubrežnu žlezdu i bubrege.



Slika 2. Generisanje reaktivnih kiseoničnih radikala u krvnim sudovima. Brojni enzimski sistemi stimulišu stvaranje superoksidnih anjona ($\cdot\text{O}_2^-$) iz O_2 : NADH/NADPH oksidaza, ksantin oksidaza, lipooksigenaza, ciklooksigenaza, P450 monooksigenaza i enzimi oksidativne fosforilacije u mitohondrijama. NADH/NADPH oksidaza je enzim izgrađen od više subjedinica i glavni je regulator nivoa reaktivnih kiseoničnih radikala u endotelnim ćelijama i ćelijama glatkih mišića krvnih sudova. Spontana dismutacija $\cdot\text{O}_2^-$ ili katalizovana enzimom superoksid dismutazom dovodi do stvaranja vodonik peroksida (H_2O_2) koji u daljim reakcijama daje visoko reaktivne hidroksi radikale ($\cdot\text{OH}$). se može metabolisati u prisustvu katalaza ili peroksidaza do H_2O i O_2 . H_2O_2 i $\cdot\text{O}_2^-$ mogu aktivirati target komponente u daljim nivoima prenosa ćelijskih signala, kao što su MAPK (ERK5, p53) tirozin kinaza, Src familija kinaza, i NF- κ B (nuklearni faktor κ B) (5).

Postoje dokazi da se ANG II može sintetisati i u putevima u kojima ne učestvuje angiotenzin konvertujući enzim. Poluživot ANG II u plazmi je oko 1 minut zbog prisustva brojnih angiotenzinaza u većini tkiva u organizmu (26). Danas se zna da se renin nalazi u mozgu, srcu, krvnim sudovima (sl. 3), korteksu nadbubrežne žlezde, testisima, ovarijumima, amnionskoj tečnosti, pljuvačnim žlezdama, pankreasu i oku. Takođe se zna da je i ACE prisutan u skoro svim tkivima. Čelije proksimalnih tubula sekretuju ANG II (ili njegove prekursore) u tečnost tubula, koji zatim aktivira luminalne receptore za ANG II (27). Intracelularni renin i intracelularno stvaranje ANG II, kao i renin vezan za ekstracelularnu površinu i prisustvo ACE vezanog za ćelijsku površinu predstavljaju dva interesantna aspekta tkivnog RAS sistema. S obzirom da lokalni RAS sistem funkcioniše po autokrinom / parakrinom principu, neophodna su dalja ispitivanja njegovog fiziološkog, patološkog i terapijskog značaja. Na mestu ulaska aferentne arteriole u glomerul, glatkomišićne ćelije se modifikuju da bi preuzele sekretornu funkciju i postaju jukstaglomerularne ćelije. Ove ćelije stvaraju i sekretuju renin. Sniženje krvnog pritiska u bubregu povećava sekreciju renina. Krvni pritisak je

osnovni mehanizam kontrole sekrecije renina ali nije u potpunosti razjašnjen. Postoje dve osnovne teorije: 1) **baroreceptorna teorija** po kojoj se jukstaglomerularne ćelije ponašaju kao baroreceptori. Kada krvni pritisak raste baroreceptori u jukstaglomerularnim ćelijama se grče što dovodi do smanjenja oslobađanja renina; 2) **makula densa ćelije** (po drugoj teoriji) sadrže različite receptore osetljive na opterećenje tečnosti distalnih tubula NaCl-om. Makula densa ćelije su u bliskom kontaktu sa jukstaglomerularnim ćelijama, tako da pad količine NaCl u predelu distalnih tubula biva primećen od strane makula densa ćelija što rezultira u pojačanoj sekreciji renina; 3) Treći značajan stimulus sekrecije renina je pojačana beta adrenergička stimulacija preko renalnih simpatičkih nerava. Generalno, hipovolemija je ukupni telesni stimulus koji dovodi do povećanja sekrecije renina.



Slika 3. Šematski prikaz tkivnog renin-angiotenzin sistema. Angiotenzinogen, ACE i receptori za angiotenzin II prisutni u ćelijama endotela i glatkih mišića krvnih sudova kao i u masnom tkivu oko krvnih sudova. Angiotenzinogen iz tkiva konvertuje se do angiotenzina I u prisustvu renina iz bubrega koji je apsorbovan iz cirkulacije. Tkivni ACE cepa angiotenzin I do angiotenzina II. Touyz1, R. M., Schiffrin, E. L., (2000) (5).

Hipovolemija izaziva pad krvnog pritiska i tako prema baroreceptornoj teoriji, povećava oslobađanje renina. Pad krvnog pritiska takodje smanjuje brzinu glomerularne filtracije i nivo natrijuma i hlorida u distalnim tubulima i tako preko makula densa stimuliše sekreciju renina. Sekrecija renina u hipovolemiji pojačana je i aktivnošću simpatikusa. Smanjena impulsacija pretkomora i plućnih receptora koji reaguju na

rastezanje, kao i smanjena impulsacija arterijskih baroreceptora, dovode preko renalnih nerava do refleksnog povećanja oslobađanja renina. Simpatička aktivnost deluje direktno na jukstaglomerularne ćelije kao i indirektno preko smanjenja protoka krvi kroz bubrege. Vazopresin i ANG II smanjuju sekreciju renina, verovatno delujući na nivou jukstaglomerularnih ćelija. Prema afinitetu za vezivanje antagonista, ANG II receptori su podeljeni u tri podtipa: AT-1 receptori pokazuju visok afinitet za vezivanje specifičnog antagonista losartana i njemu farmakološki sličnih agenasa, dok imaju nizak afinitet za vezivanje tetrahydroimidazopiridina (PD 123177) i pentapeptidnih analoga ANG II; AT-2 podtip pokazuje visok afinitet za vezivanje PD 123177 i pentapeptidnih analoga ANG II i nizak afinitet za vezivanje losartana i njemu sličnih antagonista; AT-3 podtip ima nizak afinitet prema svim prethodno navedenim inhibitorima (28). Receptori podtipa AT-1 i AT-2 su klonirani i pripadaju složenoj familiji receptora vezanih za G-proteine. Poseduju svega 32% homolognih aminokiselinskih sekvenci i preko njih se prenose različiti signali (29). Transkripcija gena angiotenzin II receptora regulisana je sa dva potpuno odvojena mehanizma i oni koriste dva različita signalna mehanizma. AT-1 podtip receptora kod glodara čine dve visoko homologne klase receptora AT-1A i AT-1B (homologija u > 92% aminokiselinskih sekvenci). Ostali sisari, uključujući i čoveka imaju samo jedan podtip AT-1 gena. ANG I se može konvertovati do ANG-(1-7) u prisustvu tkivnih endopeptidaza (neutralne endopeptidaze, NEP 24.11, NEP 24.15 i NEP 24.26). U prisustvu aminopeptidaza iz ANG II nastaju ANG III i ANG IV. Pored puteva sinteze ANG II u kojima učestvuje ACE, postoje i putevi sinteze ANG II nezavisni od ACE. Himotripsinu slična serin proteaza, himaza, predstavlja važan put konverzije ANG I u ANG II u srcu, bubrezima i vaskularnom tkivu čoveka i u karotidnoj arteriji kod pasa. Pored AT-1 i AT-2, opisana su i druga dva podtipa receptora, AT-3 i AT-4. AT-3 podtip receptora inicijalno je opisan u ćelijskoj liniji neuro 2A neuroblastoma, specifično prepoznaje ANG II. Ovaj receptor ne prepoznaje nepeptidne ligande kao što su losartan (selektivni AT-1 receptor antagonist) i PD123319 (selektivni AT-2 receptor antagonist). AT-4 receptor se nalazi u srcu, plućima, bubregu, mozgu i jetri i vezuje ANG IV ali ne i nepeptidne ligande kao što su losartan i PD123319 (5). U ćelijama glatkih mišića krvnih sudova, ćelijama zona glomeruloza, hepatocitama, mezangijalnim ćelijama bubrega delovanje ANG II ostvaruje se aktivacijom fosfolipaze C. Rezultat ovakve aktivacije je kaskada događaja koja dovodi do porasta koncentracije IP3 i oslobađanja intracelularnog kalcijuma i stvaranja DAG i aktivacije protein kinaze C (PKC). DAG povećava oslobađanje arahidonske kiseline koja stimuliše porast sinteze eikozanoidnih metabolita. PKC negativnom povratnom spregom deluje na AT-1 receptor i smanjuje nivo IP3 i metabolizam kalcijuma.

Angiotenzin II, kao snažan presorni agens, svoje efekte ostvaruje na perifernim arteriolama gde dovodi do vazokonstrikcije i na taj način do porasta ukupnog perifernog otpora. Do vazokonstrikcije dolazi u koritima krvnih sudova različitih tkiva, uključujući i bubrege, tako da je vazokonstrikcija uključena u fenomen renalne autoregulacije. Angiotenzin takođe može delovati na srce uzrokujući porast brzine i snage srčane

kontrakcije. Angiotenzin II deluje direktno na adrenalni korteks na taj način što stimuliše sekreciju aldosterona i na taj način igra centralnu ulogu u regulaciji balansa natrijuma. Vazokonstriktorno dejstvo ANG pomaže da se održi krvni pritisak u uslovima smanjenog volumena ekstracelularne tečnosti, dok stimulacija sekrecije aldosterona od strane ANG II i zadržavanje natrijuma omogućava održavanje stalnosti volumena. Sa smanjenjem hematokrita kod SH pacova posle davanja heparina dolazi do značajnog pada nivoa aldosterona u plazmi, koji je verovatno odgovoran za pad krvnog pritiska kod ove grupe životinja (30), iako je reninska aktivnost u plazmi povećana (31).

Angiotenzin II menja aktivnost simpatičkih nervnih završetaka na perifernim krvnim sudovima i srcu. On pojačava simpatičku aktivnost delimično pojačavajući oslobađanje adrenergičkog transmitera, a delom povećavajući odgovor glatkomišićnih ćelija na stimulaciju noradrenalinom. ANG II stimuliše oslobađanje kateholamina iz adrenalne medule. Blokada perifernih efekata ANG II je značajna u terapiji. Npr. kod urođenih srčanih oboljenja sa niskim minutnim volumenom srca, nivo ANG II u plazmi je visok. To dovodi do zadržavanja vode i soli u organizmu i konstrikcije arteriola, što povećava periferni vaskularni otpor i u krajnjoj liniji povećava naknadno opterećenje srca. Lečenje ACEI- ima kao što je kaptopril, dovodi do periferne vazodilatacije, na taj način poboljšava perfuziju tkiva i performanse miokarda (32) i pomaže bubrezima da odstrane so i vodu. ANG II kao polaran peptid ne prolazi hemoencefalnu barijeru. Cirkulišući ANG II može delovati na mozak preko, tj. u oblasti jednog ili više cirkumventrikularnih organa u kojima nema hemoencefalne barijere. Od izuzetnog značaja za delovanje ANG II su: subfornikalni organ, *organum vasculosum lamina terminalis* i *area postrema*. Mnoga tkiva u organizmu, uključujući mozak, srce, periferne krvne sudove, jajnike i nadbubrež sadrže komponente renin-angiotenzin sistema. U nekim od ovih tkiva ANG II može da se lokalno sintetiše i tako nastao može imati fiziološku ulogu. Lokalno nastao ANG II ima ulogu u različitim modelima hipertenzije. Angiotenzin II je snažan dipsogeni agens, kada se aplikuje direktno u mozak ili se ubrizga sistemski. Takođe, on stimuliše sekreciju vasopresina, naročito kada je povišena osmolalnost plazme. Renin-angiotenzin sistem značajnim delom učestvuje u kontroli balansa vode, a naročito tokom hipovolemije. Angiotenzin takođe deluje na mozak tako što povećava krvni pritisak, ali je ovaj njegov efekat slabiji od onih koje ostvaruje direktno u sistemskoj cirkulaciji. Kod većine životinja, receptori su locirani u *area postrema*. Ostali centralni efekti ANG II su : stimulacija sekrecije adenokortikotropnog hormona, supresija plazma reninske aktivnosti, stimulacija unosa soli, naročito u vezi sa visokim nivoom mineralokortikoida.

Rezultati naših eksperimenata u kojima smo ispitivali posledice primene antihipertenzivne terapije na održanje hipertenzije i progresiju bubrežne insuficijencije kod starih sponatano hipertenzivnih pacova, pokazali su da blokada AT-1 receptora ima protektivan efekat na funkcionalne i morfološke parametre na nivou bubrega. Dobijeni rezultati potvrđuju značaj sistema renin–angiotenzin za održanje hipertenzije i nastanak bubrežne insuficijencije kao posledice starenja udruženog sa dugotrajnom

hipertenzijom kod ovog soja pacova. Takođe, naši rezultati nam daju osnov da zaključimo da primena selektivnih angiotentin II tip-1 receptor antagonista može usporiti progresiju bubrežne insuficijencije, kako regulacijom hemodinamskih parametara, tako i efektima koji proizilaze iz izostanka aktivacije nehemodinamskih (mitogenih i proliferativnih) mehanizama angiotenzina II koji se ostvaruju aktivacijom AT-1 receptora (33).

Sve prethodno navedeno definiše endotel kao veoma značajanog učesnika u regulaciji homeostaze krvnog pritiska, a njegova disfunkcija doprinosi razvoju i održanju hipertenzije. Upravo zato se poslednjih decenija mnoge terapijske strategije hipertenzije zasnivaju na intervencijama koje anuliraju poremećen balans vazokonstriktornih i vazodilatatornih medijatora endotelnog porekla.

Literatura

1. Maeso R., Rodrigo E., Munoz-Garcia R., et al.: Factors involved in the effects of losartan on endothelial dysfunction induced by aging in SHR. *Kidney Int. Suppl* 68: S30-S35, 1998.
2. Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A., et al.: Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood* 91:3527, 1998.
3. Fujii K., Ohmori S.M., Tominaga, I., et al.: Age-related changes in endothelium-dependent hyperpolarization in the rat mesenteric artery. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 265: 509 – 516, 1993.
4. Mihailović-Stanojević N., Varagić J., Jovović Đ., Miloradović Z., Marković-Lipkovski J., Ristić G., Stošić G.: Consequences of aging on kidney vessels in spontaneously hypertensive rats. I Jugoslovenski kongres o aterosklerozi, Beograd, Zbornik sažetaka, str.165, 2001.
5. Touyz R.M., Schiffrin E.L.: Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *Pharmacological Reviews* 52: 639, 2000.
6. Rubanyi G.M., Polokoff M.A.: Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacological Reviews* 46: 325, 1994.
7. Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., et al.: A novel potent constrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature (London)*, 332: 411-415, 1988.
8. Luscher T.F., Barton M.: Endothelins and Endothelin Receptor Antagonists : Therapeutic Considerations for a Novel Class of Cardiovascular Drugs. *Circulation* 102: 2434, 2000.
9. Jovović Dj.: Uloga hematokrita u regulaciji arterijskog krvnog pritiska. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, 1998.

10. Gray G.A., Webb D.J.: The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol. Ther.* 72: 109-148, 1996.
11. Seo B., Luscher T.F.: ETA and ETB Receptors Mediate Contraction to Endothelin-1 in Renal Artery of Aging SHR : Effects of FR139317 and Bosentan. *Hypertension* 25: 501, 1995.
12. Luscher T.F., Seo B.G., Buhler F.R.: Potential role of endothelin in hypertension. Controversy on endothelin in hypertension. *Hypertension* 21: 752, 1993.
13. Mihailović-Stanojević N.: Posledice blokade receptora endotelina i sistema renin-angiotenzin u progresivnoj bubrežnoj insuficijenciji kod starih spontano hipertenzivnih pacova. Magistarska teza, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, 2002.
14. Mihailović-Stanojević N., Jovović Dj., Miloradović Z., Marković-Lipkovski J., Jerkić M.: Chronic endothelin receptor blockade in aged spontaneously hypertensive rats. XXXIX Congress of the European Renal Association and European Dialysis and Transplant Association with European Kidney Research Association, Copenhagen, Denmark, July 14-17. *Nephrol Dial Transplant* Vol 17 (Suppl. 1): p. 238, 2002.
15. Varagić J., Jerkić M., Jovović Đ., Veljković V., Adanja-Grujić G., Nastić-Mirić D., Kentera D.: Systemic and regional hemodynamic effects of chronic nitric oxide synthesis inhibition in Wistar rats. *Yugoslav Physiol. Pharmacol. Acta*, 32: 177-182, 1996.
16. Varagić J.: Uloga azot-monoksida u regulaciji arterijskog pritiska kod pacova sa urođenom hipertenzijom. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, 1997.
17. Furchgott J.V., Zawadzki J.V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin. *Nature*, London 288: 373-376, 1980.
18. Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526, 1987.
19. Nava E., Salazar F.J., Luscher T.F.: Endothelial Function in Hypertension: Role of Nitric Oxide. U: *Endothelial Function in Hypertension*, Webb D., Vallance P., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 13-27, 1997.
20. Parekh N., Dobrowolski L., Zou A.P., Steinhausen M.: Nitric oxide modulates angiotensin II- and norepinephrine-dependent vasoconstriction in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 270:R630-R635, 1996.
21. Varagić J., Jerkić M., Jovović Đ., Nastić-Mirić D., Adanja-Grujić G., Marković-Lipkovski J., Lacković V., Radujković-Kuburović G., Kentera D.: Regional hemodynamics after chronic nitric oxide inhibition in spontaneously hypertensive rats. *The American Journal of Medical Sciences*, 320 (3): 1-6, 2000.

22. Radović M., Jovović Dj., Mihailović-Stanojević N., Miloradović Z., Popović T., Oštrić V., Djukanović Lj.: Hemodynamic effects of allopurinol and/or enalapril in spontaneously hypertensive rats. Proceedings of the 5th BANTAO Congress, p. 274-276, 2001.
23. Bassenge E.: Endothelial Function in Different Organs. Prog. Cardiovasc. Dis., 39(3): 209-28, 1996.
24. Sušić D., Mandal A.K., Jovović Đ., Stojanov M., Djordjević-Denić G., Kentera D.: Antihypertensive action of heparin: Role of the renin-angiotensin aldosterone system and prostaglandins. J. Clin. Pharmacol., 33:342-347, 1993.
25. Kunsch C., Medford R.M.: Oxidative Stress as a Regulator of Gene Expression in the Vasculature. Circ. Res., 85: 753-766, 1999.
26. Kelly, Kahr, Aalkjaer, Cumin, Samani: Tissue expression of components of the renin-angiotensin system in experimental post-infarction heart failure in rats: effects of heart failure and angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. Clin. Sci. (Lond.) 92:455-465, 1997.
27. Navar L.G., Harrison-Bernard L.M., Imig J.D., et al.: Intrarenal angiotensin II generation and renal effects of AT1 receptor blockade. J. Am. Soc. Nephrol., 10 Suppl. 12: S266-S272, 1999.
28. Harris R.C., Inagami T.: Molecular Biology and Pharmacology of Angiotensin Receptor Subtypes. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Menagement, Second Edition, Chapter 103, 1995.
29. Nicholls M.C., Robertson J.I.S., Inagami T.: The renin-angiotensin system in the twenty-first century. Blood Press 10: 327-343, 2001.
30. Jovović Đ., Sušić D., Stojanov M., Djordjević-Denić G., Mandal A.K., Kentera D.: Studies on the mechanism of the antihypertensive effect of heparin. Yugoslav Physiol. Pharmacol. Acta 24: 171-172, 1988.
31. Jovović Đ., Jerkić M., Varagić J., Veljković V., Miloradović Z., Marijan M.(1997), The mechanism of antihypertensive action of heparin in spontaneously hypertensive rats, *Acta Vet.*, 47(4): 209-218.
32. Radujković-Kuburović G., Jovović Đ., Varagić J.: Cardiovascular effects of captopril, propranolol and hydralazine in the spontaneously hypertensive rat. Yugoslav Physiol.armacol Acta 28: 149-156, 1992.
33. Mihailović-Stanojević N., Jovović Đ., Miloradović Z., Jerkić M., Ristić G.: Effects of angiotensin II type I receptor blockade on age related progression of renal disease in spontaneously hypertensive rats. J.Mol.Medicine 79: B18 (Suppl.), 2001.