

Polonca Kogoj¹, Simin Hawlina², Matjaž Bunc³

Od endotelija odvisno uravnavanje žilnega napona

Endothelium Dependent Regulation of Vascular Tone

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: endotelij žilni, vazodilatacija, endotelini, vazokonstrikcija

Endotelij je notranja plast žilne stene, ki samostojno ali kot odgovor na različne dražljaje izloča vazoaktivne snovi. Le-te delujejo na steno žile v mehanizmu od endotelija odvisne vazokonstrikcije in vazodilatacije ter igrajo pomembno vlogo pri uravnavanju žilnega napona. Endotelin-1 in nekateri presnovki arahidonske kisline po različnih poteh znotrajceličnega prenosa privedejo do porasta kalcija v gladkomišični celici, ki vodi v skrčenje gladkomišične celice. Dušikov oksid, ogljikov oksid, prostaciklin, iz endotelija sproščeni hiperpolarizirajoči faktor in endokanabinoide pa štejemo med od endotelija odvisne vazodilatatorje. Poleg dobro znanega renin-angiotenzin-aldosteronskega sistema pa so študije pred kratkim pokazale, da je endotelij odgovoren tudi za nastajanje cikličnega peptida, imenovanega urotenzin-II, ki ima vazoaktivne lastnosti. Tako urotenzin-II kot njegov od proteina G odvisni receptor se nahajata v različnih tkivih ter tudi v žilni steni. Delovanje urotenzina-II še ni popolnoma raziskano. Dosedanje študije kažejo, da lahko igra vlogo vazokonstriktorja oz. dilatatorja, odvisno od živalske vrste in od žilnega predela. Na nekaterih žilnih predelih sesalcev je najmočnejši opisani vazokonstriktor. Nekateri so mnenja, da je vazodilatatorno delovanje urotenzina-II odvisno od endotelija, medtem ko je vazokonstrikcija od endotelija neodvisna.

ABSTRACT

KEY WORDS: endothelium vascular, vasodilatation, endothelins, vasoconstriction

The endothelium is an inner layer of the vascular wall which can produce vasoactive mediators alone or in response to various types of stimuli. Endothelium derived vasoactive substances can cause either endothelium dependent vasoconstriction or vasodilatation, and they play a significant role in intrinsic vascular tone regulation. By acting on different pathways of intracellular signaling, endothelin-1 and some arachidonic acid metabolites lead to an increased calcium concentration in vascular smooth muscles that finally leads to constriction. Endothelium dependent vasorelaxants include nitric oxide, carbon monoxide, prostacyclin, endothelium derived hyperpolarizing factor and endocannabinoids. In addition, studies have recently revealed that the vascular endothelium is responsible for the synthesis of a novel cyclic peptide termed urotensin-II, which exhibits vasoactive properties. Urotensin-II was originally isolated from the fish neurosecretor organ, but later on various isoforms of this peptide have also been identified in other animal species and in humans. Urotensin-II and its G-protein coupled receptor are widely represented in different tissues, including the vascular wall.

¹ Polonca Kogoj, dr. med., KO za kardiologijo, KC v Ljubljani, Zaloška c. 7, 1000 Ljubljana.

² Simin Hawlina, dr. med., KO za urologijo, KC v Ljubljani, Zaloška c. 7, 1000 Ljubljana.

³ Prof. dr. Matjaž Bunc, dr. med., KO za kardiologijo, KC v Ljubljani, Zaloška c. 7, 1000 Ljubljana; Inštitut za patološko fiziologijo, MF v Ljubljani, Zaloška c. 4, 1000 Ljubljana.

Although the vascular role of urotensin-II has not been defined in detail yet, it is believed that urotensin-II can act as an endothelium independent vasoconstrictor and endothelium dependent vasodilator, depending on the species and on the vascular bed. With regard to mammals, in some vascular beds urotensin-II is the strongest vasoconstrictor that has been described till now. Some experts believe that the vasodilatory response to urotensin-II depends on the endothelium, while constriction itself is endothelium independent.

UVOD

Krvne žile so v grobem sestavljene iz zunanje adventicije, vmesne gladkomišične plasti in endotelija. Dolgo časa se je zmotno mislilo, da predstavlja endotelij le notranjo plast žilne stene, ki nima drugih funkcij. Danes vemo, da preko izločanja različnih vazoaktivnih snovi, citokinov, rastnih faktorjev, molekul, ki omogočajo pritrjanje celic na endotelij, ter faktorjev, ki vplivajo na strjevanje krvi, sodeluje endotelij pri uravnavanju žilnega napona, vpliva na strjevanje krvi in igra pomembno vlogo pri vnetnih procesih ter pri preoblikovanju žilne stene.

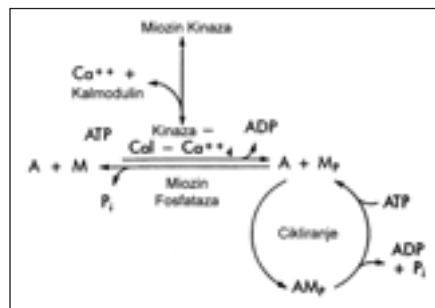
Gladke mišice žil vzdržujejo širino svetline v smislu vazokonstrikcije ali vazodilatacije. Trenutni napon gladkomišične celice (GMC) je odvisen od tega, kam se bo prevsil ravnotežje med vazodilatacijskimi in vazokonstriksijskimi dražljaji. Nanj vplivajo avtonomno živčevje preko simpatičnega in parasimpatičnega živčevja, lokalni dražljaji, kot sta mehanski razteg žile in električna depolarizacija, ter različne vazoaktivne snovi. Vazoaktivne snovi, ki posredno ali neposredno krčijo ali sproščajo GMC, lahko v grobem delimo na tiste, ki delujejo neodvisno od endotelija, in tiste, ki jih izloča endotelij in so zato od endotelija odvisne. Osredotočili se bomo na uravnavanje žilnega napona, ki je odvisno od sodelovanja med endotelijem in GMC.

KRČENJE IN SPROŠČANJE GLADKIH MIŠIČ TER KALCIJ

Krčenje gladke mišice žile lahko povzročimo z mehaničnim, električnim ali kemičnim draženjem. Skupno vsem mehanizmom je dvig koncentracije kalcija v GMC. Tako pasivni razteg GMC kot električna depolarizacija celične membrane odpreta kalcijeve napetostne kanalčke, skozi katere vdira kalcij v celico in prihaja do vazokonstrikcije. Prav tako vplivajo preko

različnih mehanizmov na koncentracijo kalcija v GMC kemični posredniki, tako tisti, ki so odvisni od endotelija, kot tisti, ki delujejo od endotelija neodvisno. V reakciji, kjer prihaja do krčenja GMC, sta pomembna encima miozin-kinaza in miozin-fosfataza, ki fosforilirata oz. defosforilirata specifična mesta na lahki verigi miozina. Aktivno obliko miozin-kinaze predstavlja kompleks kalmodulin, vezan s štirimi molekulami kalcija. Aktivna miozin-kinaza fosforilira neaktivni miozin (porablja se ATP), ki je sposoben reakcije z aktinom, nastopi kroženje aktomiozinskih kompleksov ter krčenje gladke mišice. Če kalcij umaknemo iz mioplazme, miozin-kinaza preneha z delovanjem, miozin-fosfataza pa defosforilira miozin, kar vodi do ustavitve reakcije in do sprostitve GMC (slika 1) (1).

Znotrajcelična koncentracija kalcija je odvisna od kalcija, ki vstopa v celico iz zunajceličnega prostora, kalcija, ki se sprošča iz znotrajceličnega skladišča, ki ga predstavlja gladki endoplazemski retikulum in od odstranjevanja kalcija, bodisi ven iz celice ali nazaj



Slika 1. Uravnavanje aktivnosti gladkomišične miozin-kinaze s kalcijem. Aktiviran kompleks miozin-kinaza-kalmodulin-Ca⁴ (štiri molekule kalcija) premakne fosfatno skupino (P_i) iz ATP molekule na lahko verigo miozina. Tako fosforiliran miozin (Mp) lahko sodeluje v reakciji z aktinom (A). Če kalcij izstopi iz reakcije, postane miozin-kinaza neaktivna, miozin-fosfataza pa defosforilira miozin in krčenje gladke mišice se prekine.

v znotrajcelično skladišče. V normalnih razmerah je koncentracija kalcija v GMC med 10^{-7} do 10^{-5} M. Zunajcelično je koncentracija kalcija višja in znaša 2×10^{-3} M. Za kalcij obstaja torej kemični gradient v smeri vstopa kalcija v celico. Celice imajo negativen mirovni membranski potencial, zato obstaja tudi električni gradient v smeri vstopa kalcija v celico. Celična membrana je večino časa skoraj neprepustna za kalcij. Prepustnost se poveča prek receptorjih, napetostnih, na razteg aktivirajočih kalcijevih kanalčkov, kalcijevih kanalčkov tipa L in preko Na/Ca izmenjevalca (1).

Visoke znotrajcelične koncentracije kalcija so toksične za celico, zato mehanizmi homeostaze odstranjujejo odvečen kalcij iz celice. Osnovna mehanizma odstranjevanja kalcija iz celice sta od ATP odvisna kalcijeva črpalka, ki aktivno odstranjuje kalcij iz celice, ter natrijev oz. kalcijev izmenjevalec. Na koncentracijo kalcija vpliva tudi kalij, saj uravnava membranski potencial in preko tega tok kalcija v celico glede na električni gradient. Poznamo več vrst kanalčkov za kalij, med katerimi so najpomembnejši napetostni kanalčki, ki hiperpolarizirajo endotelijsko celico, s kalcijem aktivirajoči kalijevi kanalčki, muskarinski kalijevi kanalčki in kalijevi kanalčki, odvisni od ATP.

Osredotočili se bomo na tri različne mehanizme uravnavanja koncentracije kalcija v GMC žile: fosfatidilinozitolna pot, G-proteinska pot in pot preko cikličnega gvanozin-monofosfata (cGMP).

Fosfatidilinozitolna pot

Različni vazoaktivni mediatorji, kot so noradrenalin, ki deluje preko adrenoreceptorjev alfa, receptorjev AII – angiotenzinskih receptorjev, endotelin-1 preko receptorjev ETa, lahko aktivirajo fosfolipazo C, ki katalizira reakcijo pretvorbe fosfatidilinozitola (PIP2) v inozitoltrifosfat (IP3). IP3 stimulira izločanje kalcija iz gladkega endoplazemskega retikuluma. V reakciji nastaja tudi diacilglicerol (DAG), ki aktivira protein-kinazo C (PK-C), ta pa sodeluje pri krčenju GMC prek fosforilacije proteinov (2).

G-proteinska pot

Adenilat-ciklaza (AC) katalizira reakcijo, kjer iz ATP nastaja cAMP. Povečanje koncentra-

cije cAMP preko inhibicije encima kinaze lahke verige miozina privede do zmanjšane fosforilacije lahke verige miozina in manj številnih interakcij med aktinom in miozinom ter končne sprostitve GMC (3).

cGMP pot

Dušikov oksid (NO) in ogljikov monoksid (CO) aktivirata gvanilat-ciklazo (GC), ki katalizira reakcijo, kjer se tvori cGMP. Porast cGMP zavira vdor kalcija v mioplazmo prek kalcijevih kanalčkov sarkoleme, znižuje IP3, aktivira izhod kalcija iz celice, stimulira pospešeno defosforilacijo miozinskih lahkih verig ter aktivira kalijeve kanalčke, ki hiperpolarizirajo GMC. Skupen rezultat navedenih mehanizmov privede do končnega vpada znotrajceličnega kalcija in sprostitve GMC (2, 4).

RENIN-ANGIOTENZIN-ALDOS TERONSKI SISTEM (RAAS)

RAAS predstavlja endokrino os, ki preko proteolitične aktivacije svojih sestavin sodeluje pri uravnavanju žilnega napona ter volumna zunajcelične tekočine. Igra pomembno vlogo pri vzdrževanju homeostaze žilnega pretoka, njegova nepravilna aktivacija pa je ključna pri patofiziologiji nekaterih bolezni, kot sta arterijska hipertenzija in srčno popuščanje. Angiotenzin-II (AT-II) je osnovni aktivni produkt RAAS. V krvnem obtoku nastaja po proteolitski aktivaciji plazminogena s pomočjo proteaz renin in angiotenzin konvertaze (ACE). Na srčnožilni obtok deluje preko vezave na membranski receptor. Čeprav poznamo 4 receptorske podtipa, je angiotenzinski receptor 1 (AT1) odgovoren za večino fizioloških učinkov AT-II. Vezava AT-II na AT1 gladkomišičnih celic povzroči vazokonstrikcijo. V centralnem srčnožilnem centru AT-II spodbuja izločanje noradrenalina iz simpatičnih živčnih končičev, kar ojača njegov neposredni vazokonstriktorni učinek. Pri razgradnji AT-II nastajajo metaboliti, ki imajo prav tako biološki učinek. Med njimi je AT (1,7), za katerega mnogi menijo, da z vezavo na popolnoma nov receptor deluje vazodilatatorno (5).

Študije kažejo, da poleg dobro poznane plazemskega obstaja tudi lokalni ali tkivni RAAS (5, 6), ki se nahaja v različnih tkivih, kot so srce, krvne žile, ledvica, nadledvična

žleza in drugih. Njegovo delovanje še ni povsem jasno, v nekaterih tkivih deluje neodvisno, v drugih pa je v tesnem sodelovanju s plazmatskim RAAS. Sinteza nekaterih sestavin tkivnega RAAS poteka lahko v samih tkivih, druge pa prihajajo v tkiva iz krvnega obtoka in se tam skladiščijo.

Mnogi menijo, da je žilni RAAS odgovoren za žilno homeostazo (5, 6). Spodbuja rast in razmnoževanje GMC in fibroblastov. Sinteza AT-II poteka v sami žilni steni, reakcijo katalizira renin, ki prihaja iz krvnega obtoka. Vežava tako sistemskega kot tkivnega AT-II na AT1 receptor žilne stene sproži po fosfatidilinozitolni poti vazokonstrikcijo, medtem ko vezava na žilni AT2 receptor spodbuja sproščanje dušikovega oksida, ki relaksira žilno steno. Poleg tega AT-II spodbuja izločanja drugih vazokonstriktorjev, kot je endotelin-1. V nedavnih objavah poročajo, da aktivira AT-II po AT1 receptorski poti žilno NAD(P)H-oksidazo in nastanek kisikovih prostih radikalov, ki so vpleteni pri nastajanju endotelijske disfunkcije ter ateroskleroze (5, 6).

OD ENDOTELIJA ODVISNA SPROSTITEV GLADKIH MIŠIČ ŽIL

Razširitev žile lahko sprožijo noradrenalin, histamin, serotonin, angiotenzin-II, acetilholin, prostaglandini, substanca P, ADP, trombin, kalij, pa tudi hipoksija in strižne sile. Znani vazodilatatorji, ki jih endotelij samostojno ali kot odgovor na različne nevrohormone sprošča proti gladki mišični celici, pa so NO, CO, prostaglandini (PGI₂), iz endotelija sproščeni hiperpolarizirajoči faktor (EDHF) in endokanabinoidi (2, 3, 12, 16, 17).

Dušikov oksid

Sprva so bili raziskovalci mnenja, da izloča endotelij le eno spojino, ki naj bi povzročala vazodilatacijo. Spojina je bila poimenovana iz endotelija sproščeni relaksacijski faktor (EDRF). Danes prevladuje mnenje, da predstavlja NO biološko aktivno sestavino EDRF (3).

Sinteza NO poteka na dveh ravneh: na bazalni, tonični ravni, ki je stalna in ni odvisna od nevrohormonskih posrednikov, ter na stimulativni, inducibilni ravni, kjer nevro-

hormonski posredniki preko receptorskega draženja sprožijo nastajanje spojine (slika 2) (1). Nastajanje je na obeh ravneh odvisno od porasta koncentracije kalcija v endotelijski celici.

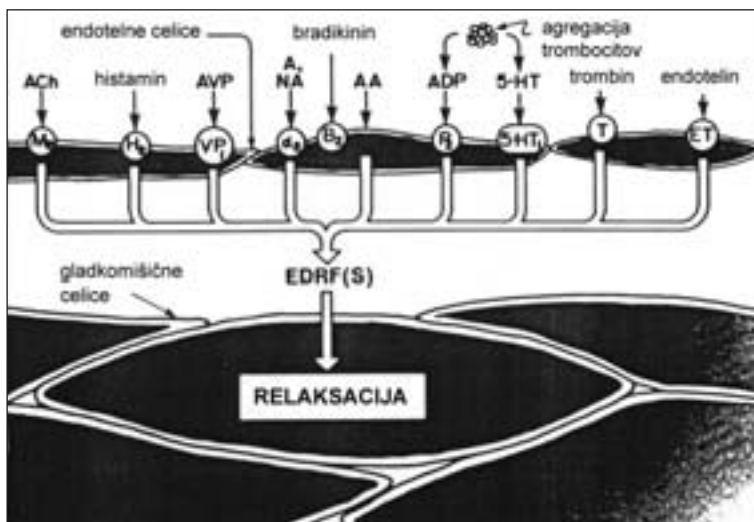
NO nastaja iz L-arginina v reakciji, ki jo katalizira encim NO-sintaza (NOS). Opisane so tri oblike encima NOS. NOS I ali nNOS se nahaja v postsinaptični membrani nevronov in v citoskeletu mišičnih celic. NOS II ali iNOS najdemo v celični membrani levkocitov, v celicah endotelija, v kardiomiocitih, GMC ter v mnogih drugih celicah. NOS III ali eNOS se nahaja v celični membrani, v celicah endotelija, v celicah trombocitov ter v celicah nevronov hipokampusa. NOS I in III sta konstitutivna encima, odgovorna sta za sintezo NO v osnovnih pogojih in potrebujeta za nemoteno delovanje kalcij, vezan na kalmodulin. Po osnovni poti poteka v organizmu 95 % sinteze NO. NOS II je inducibilen encim, neodvisen od spojine Ca-kalmodulin, ki sintetizira NO v posebnih pogojih, kot je npr. vnetje (3, 7).

NO je zelo lipofilna molekula, ki za svoje delovanje ne potrebuje neposrednega stika med endotelijem in GMC ali receptorja na tarčni celici. Endotelij sprošča NO v špranjo med endotelijem in GMC. NO difundira v GMC, kjer aktivira od hema odvisno topno gvanilat-ciklazo (GC), ki po G-proteinski poti vodi v končno sprostitev GMC. Poleg učinka na GMC deluje NO tudi na trombocite in preko aktivacije topne GC inhibira združevanje trombocitov, pospešuje njihovo razdruževanje ter zavira pritrjanje trombocitov. Mehanizem se sproži, ko pride na površini endotelija do združevanja trombocitov. Ti izločajo posrednike, kot so ATP, ADP, 5-HT, ki spodbujajo celice endotelija, da proizvajajo NO (3, 8).

Ogljikov monoksid

CO poznamo kot človeku strupen plin, ki se sprošča pri nepopolnem gorenju organskih snovi. Zaradi njegove visoke afinitete do hemoglobina, ki je 245-krat večja od kisika, pride pri zastrupitvi s CO do kompetitivne vezave CO na hemoglobin. Posledično se zmanjša vezava kisika, kar pripelje do hipoksije tkiv.

CO nastaja tudi endogeno, in sicer pri razgradnji hema. Encim hem-oksidaza (HO) odpre obroč hema in sprosti ekvimolarne koli-



Slika 2. Nevrohormonski posredniki, ki povzročajo sproščanje iz endotelija sproščenega relaksirajočega faktorja (EDRF), prek aktivacije specifičnih endoteljskih receptorjev (obkroženi). A – adrenalin, AA – arahidonska kislina, Ach – acetilholin, ADP – adenzozin-difosfat, α – alfaadrenergični receptor, AVP – arginin-vazopresin, B – kininski receptor, ET – endotelinski receptor, H – histaminski receptor, 5-HT – serotonin, serotoninski receptor, M – muskarinski receptor, NA – noradrenalin, P – purinski receptor, T – trombinski receptor, VP – vazopresinski receptor (3).

čine biliverdina, železa in CO. V manjši meri se CO sprošča tudi pri foto-okidaciji, peroksidaciji lipidov ter metabolizmu ksenobiotičnih snovi. Znani sta dve obliki encima HO, HO-1 in HO-2. Opisana je tudi HO-3, ki še ni popolnoma proučena. HO-2 se izraža konstitutivno, inducirajo jo lahko le glukokortikoidi. HO-1 je ubikvitarna, lahko jo inducira mnogo različnih stimulusov, katerim skupni imenovalc je oksidativni stres. Do razlik v uravnavanju HO-1 in HO-2 prihaja predvsem zaradi različnih regulatornih elementov v promotorski regiji. Kljub razlikam med HO-1 in HO-2 sta oba encima ostala v evoluciji skoraj nespremenjena, kar kaže, da imata osrednjo vlogo pri normalnem delovanju organizma. Oba encima se nahajata v celicah endotelija ter v gladkomišičnih celicah žil (4).

CO je vključen v znotrajcelični prenos in živčno prevajanje, pred kratkim pa so ugotovili tudi njegov protivnetni učinek. Uravnava žilni napon in tako igra pomembno vlogo pri uravnavanju krvnega tlaka. Uravnavanje zajema več nivojev in vključuje različne sisteme. Podobno kot NO lahko CO deluje neposredno na GMC žil, kjer aktivira topno GC in preko cGMP sproži znotrajcelični signal za sprostitvev

GMC. V manjših arterijah upora se vazodilatatorni učinek CO izraža preko spodbujanja s kalcijem aktiviranih kalijevih kanalčkov. Nekateri avtorji ugotavljajo, da lahko CO uravnava žilni napon tudi preko inhibicije tvorbe endotelina-1 ter preko inhibicije od citokroma P450 odvisnega nastajanja endogenih vazokonstriktornih snovi (9).

CO uravnava žilni napon tudi centralno, in sicer z inhibicijo simpatičnega živčnega sistema v *Nucleus tractus solitarius*. Poleg vazodilatatornega učinka deluje CO v nekaterih žilnih predelih tudi vazokonstriktorno, saj z vezavo na eNOS zavira delovanje encima in inhibira endoteljsko nastajanje NO (4).

Študije kažejo, da vpliva HO-1/CO sistem tudi na preoblikovanje žilne stene. CO igra zaščitno vlogo pri nastanku aterosklozičnih žilnih lezij ter zavira patološko preoblikovanje žilne stene, ki nastane po poškodbi le-te. Preko GC/cGMP sistema, kot tudi po drugih poteh celičnega prenosa, CO uravnava izražanje ključnih proteinov, ki nadzorujejo celični cikel, zavira rast GMC žil, ki so ključne pri nastanku neointime, in sodeluje pri preoblikovanju žilne stene. Protivnetni učinek CO se izraža z inhibicijo apoptoze GMC in celic

endotelija, z inhibicijo izražanja citokinov in vnetnih celic. Inhibira tudi združevanje in pritrjevanje trombocitov in tvorbo fibrina. Ugotovili so, da CO štiti pnevmoците pred škodljivimi vplivi visokih koncentracij kisika, po drugi strani pa preprečuje preoblikovanje pljučnih arterij in nastanek pljučne hipertenzije kot odgovor na kronično hipoksijo. Študije kažejo, da indukcija HO-1/CO sistema zmanjša poškodbo miokarda, ki nastane po ishemični reperfuziji (4).

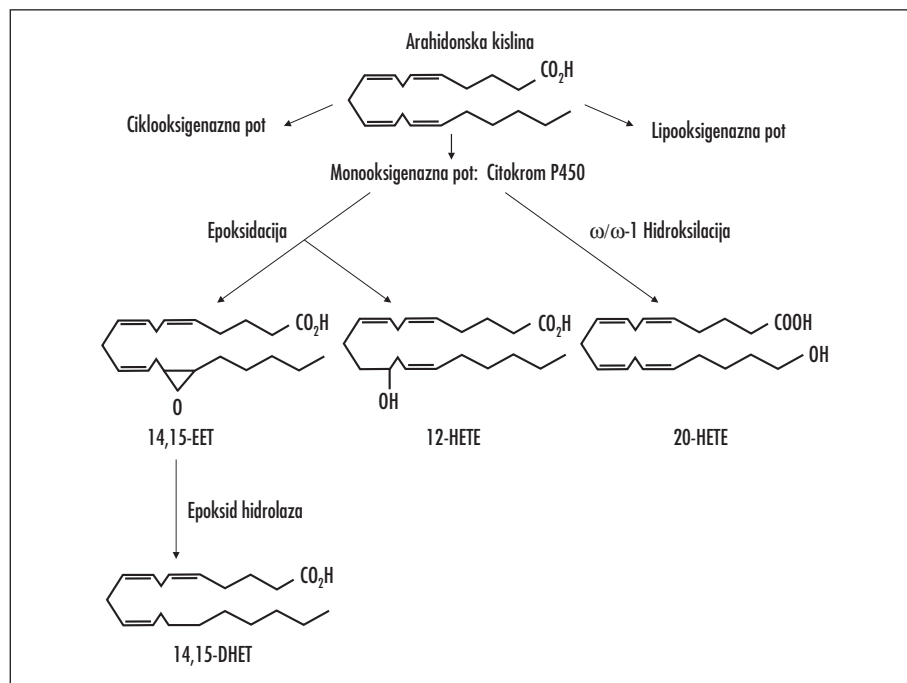
Iz endotelija sprošeni hiperpolarizirajoči faktor

Od endotelija odvisna sprostitvev GMC poteka tudi prek hiperpolarizacije GMC. Iz endotelija sprošeni hiperpolarizirajoči faktor (EDHF) je novo odkriti posrednik, ki ga izloča endotelij in vpliva na sprostitvev gladkomišične celice, ki ni odvisna od prostaciklina in NO. Kateri je ta posrednik, še ni jasno, potencialnih kandidatov je več. Mednje štejem

nekatero presnovke arahidonske kisline, endokanabinoide, pomembno vlogo imajo tudi mioendotelijski presledkovni stiki. Skupno jim je to, da preko povečanega izločanja kalija iz celice hiperpolarizirajo celično membrano in tako celico oddaljijo od praga, potrebnega za sproženje akcijskega potenciala (10).

Presnovki arahidonske kisline

Nekateri raziskovalci verjamejo, da igrajo pri hiperpolarizaciji gladkomišične celice pomembno vlogo presnovki arahidonske kisline. Arahidonska kislina je polinenasičena maščobna kislina, ki se nahaja v fosfolipidih celičnih membran. Ko fosfolipaza A2 sprosti arahidonsko kislino iz fosfolipidov, lahko poteka njena presnova preko ciklooksigenazne poti, lipooksigenazne poti ali preko citokrom P-450 (CYP) monooksigenaznega sistema. Nastanejo eikozanoidi, derivati maščobnih kislin, ki so med drugim močno vazoaktivni.



Slika 3. Presnova arahidonske kisline. Endogena presnova arahidonske kisline lahko poteka preko ciklooksigenazne poti, lipooksigenazne poti ali preko citokrom P-450 (CYP) monooksigenaznega sistema. Po monooksigenazni poti nastajajo 14, 15 epoksieikozatrienoična kislina (14, 15-EET); 14, 15 dihidroksieikozatrienoična kislina (14, 15-DHET); 12 hidroksieikozatrienoična kislina (12-HETE); 20 hidroksieikozatrienoična kislina (20-HETE) ter drugi presnovki arahidonske kisline (11).

Po monoooksigenazni poti nastajata dve skupini vazoaktivnih spojin: epoksieikozatrienočne kisline (EETs) ter hidroksieikozatrienočne kisline (HETEs) (slika 3) (11). 20-HETE deluje neposredno na gladkomišično celico in povzroča od endotelija neodvisno vazokonstrikcijo, zato ga ne moremo šteti med kandidate EDHF. EETs pa aktivirajo od kalcija odvisne kalijeve kanalčke (K^+_{Ca}) in hiperpolarizirajo gladkomišično celico, zato jih nekateri avtorji enačijo z EDHF (11).

Mioendotelijski presledkovni stiki

Mioendotelijski presledkovni stiki igrajo pomembno vlogo pri izmenjavi sporočil med endotelijsko celico in GMC. Njihov učinek pri uravnavanju žilnega napona še ni povsem jasen. Znano je, da lahko nekatere snovi prosto prehajajo iz endotelija v gladkomišično celico in obratno. Po mnenju nekaterih avtorjev so mioendotelijski presledkovni stiki odgovorni za hiperpolarizacijo GMC, saj omogočajo neposreden prenos hiperpolarizacije od endotelija na bližnjo gladkomišično celico. Mehanizem je bil opisan predvsem pri manjših žilah, kjer je večja gostota presledkovnih stikov (10).

Endokanabinoidi

Kanabinoidov ne najdemo le v dimu tleče indijske konoplje, saj poteka njihova sinteza tudi endogeno. Čeprav delovanje kanabinoidov še ni povsem jasno, študije kažejo, da aktivirajo kanabinoidne receptorje v perifernih tkivih in živčevju (12, 13) ter igrajo v organizmu vlogo vazodilatatorjev. Endokanabinoidi (anandamidi) naj bi preko aktivacije kanabinoidnih receptorjev CB1, ki se nahajajo na GMC, hiperpolarizirali celico, zato jih nekateri prištejajo med kandidate EDHF (14, 15).

Prostaciklin

Prostaciklin (PGI_2), eden od glavnih predstavnikov prostaglandinov, nastaja z razgradnjo arahidonske kisline preko ciklooksigenazne poti. Arahidonsko kislino sprva encim ciklooksigenaza (COX) pretvori v PGH_2 , nato pa encim PGI_2 -sintetaza (PGIS) pretvori PGH_2 v PGI_2 . Znani sta dve obliki encima COX, COX-1 in COX-2. Od tipa celice je odvisno,

katera oblika bo odgovorna za tvorbo PGI_2 (16). V žilni steni poteka tvorba prostaciklinov predvsem v endoteliju, v manjši meri tudi v GMC. PGI_2 se veže na od G proteina odvisni receptor.

Receptor, ki se nahaja na GMC, aktivira adenilat-ciklazo (AC). V celici pride do nastanka sekundarnega obveščevalca cikličnega adenzin-monofosfata (cAMP), ki preko protein-kinaze A (PKA) zavira vstop kalcija v GMC ter stimulira kopičenje kalcija v sarkoplazmatskem retikulumu. Aktivirajo se tudi kalijeve kanalčki, ki povzročijo hiperpolarizacijo celične membrane. Končni rezultat je sprostitvev GMC. Poleg vazorelaksacije inhibira PGI_2 združevanje trombocitov ter sodeluje v združevanju (3). Zadnje študije kažejo, da so IP receptorji najverjetneje le ena od poti, preko katerih delujejo PGI_2 . Dokazano je bilo, da vežejo PGI_2 tudi receptorje celičnega jedra PPAR δ (angl. *peroxisomal proliferator-activated receptors*). PPAR δ so jedrni hormonski receptorji, ki sodijo v družino od liganda odvisnih transkriptorskih faktorjev. Ob vezavi na določen ligand sprožijo ali zavrejo transkripcijo tarčnih genov. Učinek vezave s PGI_2 je še neznan (16).

OD ENDOTELIJA ODVISNO KRČENJE GLADKIH MIŠIČ ŽIL

Krčenje žil lahko sprožijo acetilholin, arahidonska kislina, ADP, serotonin, hipoksija, mehanski nateg žile in drugi faktorji. Znani vazokonstriktorski posredniki, ki jih endotelij samostojno ali kot odgovor na različne nevrohormone sprošča, pa so endotelin-1 in metaboliti arahidonske kisline (3).

Endotelin

Endotelini (ET) so družina vazoaktivnih peptidov, ki vključuje tri 21-aminokislinske izoformne oligopeptide endotelin-1 (ET-1), endotelin-2 (ET-2), endotelin-3 (ET-3) ter novo odkriti endotelin-4 (ET-4) (17, 18).

ET-1, ET-2 in ET-3 kodirajo trije različni geni. Tvorba ET se začne s prepisom preproET gena v preproET mRNA. Po prevajanju mRNA nastane 203 aminokislinski preproET, zreli ET pa nastane v procesu potranskripcijskega zorenja po dveh encimskih cepitvah (19, 20).

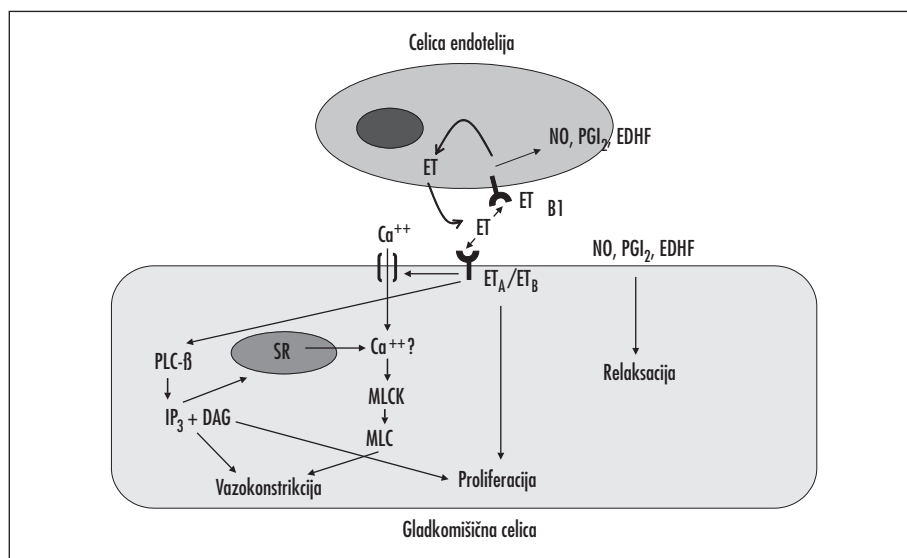
ET-1 je glavna oblika ET v žilah. Za njegovo tvorbo je odgovoren predvsem endotelij, pa tudi celice epitela dihal, makrofagi, fibroblasti, kardiomiociti in nevroni. Številni faktorji vplivajo na tvorbo in sproščanje ET-1. Natančen mehanizem še ni popolnoma pojasnjen, pomembno vlogo naj bi imelo uravnavanje prepisovanja mRNA. Tvorbo mRNA in sproščanje ET-1 spodbujajo trombin, vazopresin, angiotenzin-II, adrenalin, hipoksija, kalcijeva ionofora A23187, forbolni estri in citokini, kot so transformirajoči rastni dejavnik beta (TGF-beta), dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF-alfa), interleukini (20, 21, 23). Dejavniki delujejo v večini primerov preko fosfatidilinozitolne poti in povišanja koncentracije znotrajceličnega kalcija. Na zmanjšano izločanje ET-1 vplivajo strižne sile in mehanski nateg žile, ki povzročita začetni porast, nato pa padec koncentracije mRNA v celicah endotelija. Tvorbo ET-1 nenehno zavirajo NO, PGI₂ in atrijski natriuretični peptid (ANP) (23).

V človeškem genomu so identificirali tri receptorske podtipе s specifično afiniteto do endotelinov, in sicer receptorje tipa A (ET_A), tipa B (ET_B) in tipa C (ET_C) (22, 23). ET_B lahko po občutljivosti za blokatorje in mestu nahajanja razdelimo na dva podtipa, ET_{B1} in

ET_{B2}. ET_A ima s farmakološkega stališča visoko afiniteto do ET-1 in ET-2 in nizko afiniteto do ET-3, medtem ko ima ET_B receptor visoko afiniteto do vseh treh izopeptidov. ET_A in ET_B sta prisotna v stenah žil. ET_A se nahaja predvsem v GMC, ET_B pa v celicah endotelija ter v manjši meri tudi v GMC nekaterih žil. Oba sta prisotna tudi v drugih tkivih in v centralnem živčnem sistemu.

Endotelini lahko sproščajo ali krčijo GMC, njihov končni učinek je odvisen od receptorja, na katerega se vežejo. Z vezavo na ET_A, ki se nahaja na GMC, delujejo ET neodvisno od endotelija. Preko aktivacije fosfolipaze C-β (PLC-β) in nastanka IP₃ in DAG povzroči premik znotrajceličnega kalcija. Aktivirajo se tudi kalcijevi kanalčki celične membrane, ki omogočijo vdor zunajceličnega kalcija. Porast kalcija v gladkomišični celici vodi v končno, od endotelija neodvisno vazokonstrikcijo. Po isti poti deluje tudi ET_{B2}, ki je prav tako odgovoren za krčenje GMC. Poleg vazokonstrikcije sproži aktivirani ET_A verižni znotrajcelični signal in končni nastanek posrednikov, ki spodbudijo rast in razmnoževanje GMC (23).

Povsem drugačen učinek imajo ET_{B1} receptorji. Nahajajo se na celicah endotelija in so soudeleženi pri sproščanju vazodilatatornih



Slika 4. Delovanje endotelinov. Končni učinek endotelinov je odvisen od receptorja, na katerega se vežejo. Vezava ET na ET_A ali ET_B receptor na GMC vodi v končno vazokonstrikcijo in rast ter razmnoževanje GMC. Z vezavo na ET_{B1} receptor pa preko sproščanja NO, PGI₂ in EDHF relaksirajo GMC.

snovi, kot so NO, PGI₂ in EDHF, ki so odgovorne za končno, od endotelija odvisno sproščanje GMC. ET_{B1} sodeluje tudi pri ponovnem prevzemu in očistku endotelinov (slika 4). O ET_C se malo ve, v bodoče pa bodo študije pojasnile njihovo vlogo (23).

Epoksieikozanoidi (metaboliti arahidonske kisline)

Vazodilatatorne učinke prostaglandina in EETs smo že opisali. Nekateri derivati arahidonske kisline pa delujejo tudi vazokonstriktorno. Končni produkt razgradnje 14, 15-EET z epoksid-hidroksilazo je 14, 15-DHET, ki naj bi imel vazokonstriktorske lastnosti (11). Vazokonstriktorno deluje tudi PGH2.

Urotenzin-II

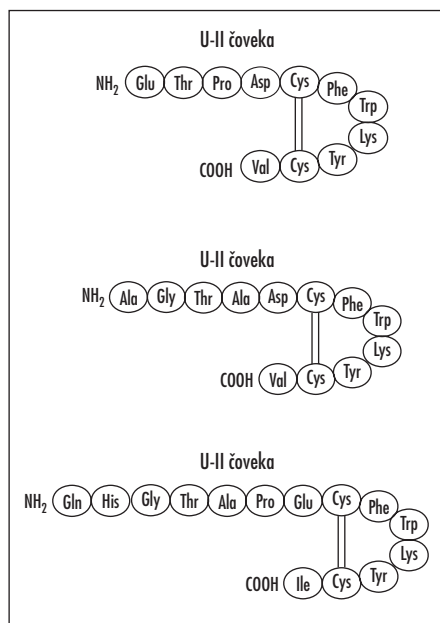
Urotenzin-II (U-II) je ciklični peptid, ki je bil prvič osamljen iz urofize ribe *Gillichthys mirabilis* (24). Urofiza je nevrosekretorni organ, ki se nahaja v kavdalnem delu hrbtnjače rib. Kasneje je bil U-II izoliran tako pri človeku

kot pri drugih sesalcih. Pri različnih živalskih vrstah so bile osamljene različne oblike 11–17 aminokislinskega izopeptida. N-terminalni del peptida je med različnimi živalskimi vrstami različen, medtem ko je ciklični C-terminalni heksapeptid (CFWKYC) ohranjen pri vseh opisanih oblikah in predstavlja biološko aktivni del molekule (slika 5). Človeški U-II je ciklični peptid, sestavljen iz 11 aminokislin, ki nastane po razgradnji prekursorja pre-pro U-II. Gen, ki ga kodira, se imenuje UTS2 in se nahaja na kromosomu 1p36.

U-II se veže na od proteina G odvisni receptor, UT-receptor. Tako U-II kot njegov receptor se nahajata v različnih organih, z različno razporeditvijo med živalskimi vrstami. Pri človeku najdemo U-II v stenah žil, v srčno-mišičnih celicah, v tubulih in glomerulih ledvic, v možganih ter hrbtnjači, v pljuči, nadledvični žlezi, vranici in drugih tkivih. Prisoten je tako v serumu kot v urinu. Z uporabo imunohistokemičnih metod so pri človeku dokazali prisotnost U-II v celicah endotelija žil različnih organov, medtem ko v stenah ven U-II ni bil dokazan. UT receptor se nahaja v človeških celicah endotelija kot tudi v GMC. Pri ribah je U-II udeležen pri uravnavanju ozmotskega tlaka, pri drugih živalskih vrstah in nenazadnje pri sesalcih pa je njegovo delovanje še precej neraziskano.

Različne študije, ki so skušale opredeliti delovanje U-II na žilni napon, so pokazale, da je odgovor na U-II bodisi vazokonstriktoren bodisi vazodilatatoren, odvisno od živalske vrste in od žilnega predela. Na istem žilnem predelu se je razlikoval celo med posameznimi predstavniki iste živalske vrste. Pri sesalcih je na nekaterih predelih U-II najmočnejši do sedaj opisani vazokonstriktor, celo močnejši od endotelina-1 (26). Največ študij je bilo narejenih na podganah, kjer na izoliranih arterijah podgan U-II najpogosteje povzroči od endotelija neodvisno vazokonstrikcijo. Aorta podgan je med osamljenimi arterijami najbolj občutljiva na U-II. Vazokonstrikcija je povezana s porastom koncentracije kalcija v GMC, prepreči pa jo blokator kalcijevih kanalčkov nifedipin. Druge študije so pokazale, da v malih arterijah podgan U-II povzroči od endotelija odvisno vazodilatacijo.

Pri prvih poizkusih, opravljenih na osamljenih žilah sesalcev, je U-II povzročil močno,



Slika 5. Oblike urotenzina-II (U-II). Pri različnih živalskih vrstah najdemo različne oblike U-II. N-terminalni del peptida kodirajo pri različnih živalskih vrstah različni geni, medtem ko je ciklični C-terminalni heksapeptid ohranjen pri vseh opisanih oblikah in predstavlja biološko aktivni del molekule.

dolgotrajno vazokonstrikcijo, zato so U-II poimenovali »novi endotelin«. Kasnejše študije so pokazale, da na žilah drugih živalskih vrst U-II nima vazokonstriktornega učinka, kar so avtorji pripisovali odsotnosti UT receptorjev v nekaterih žilnih predelih (27).

Opisanih je zelo malo *in vivo* študij na človeku, rezultati le-teh pa si nasprotujejo. Pri zdravih prostovoljcih, kjer so U-II aplicirali intravensko, ni prišlo do sprememb v vrednostih krvnega tlaka, srčne frekvence ter srčnega indeksa (26). V drugi študiji na zdravih prostovoljcih pa je prepajanje z U-II povzročilo upad krvnega pretoka podlahti, ki je bil odvisen od odmerka. V nekaterih raziskavah na prostovoljcih je intradermalen vnos U-II povzročil vazokonstriktorni odgovor žil kože (26).

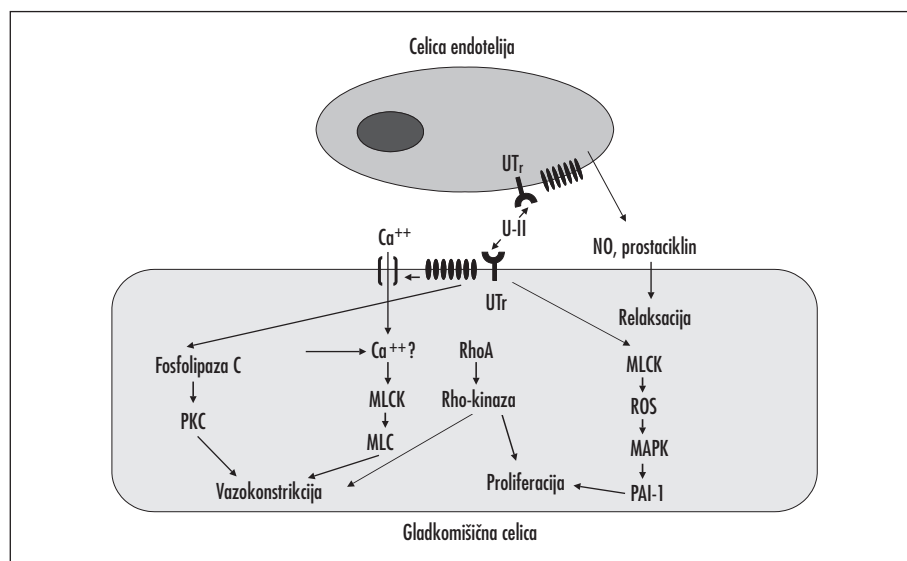
Če povzamemo, je vazoaktivni odgovor na U-II odvisen od tega, kam se prevesi ravnotežje med z U-II spodbujenim krčenjem in sproščanjem GMC. Na to najverjetneje vplivajo velikost žile, različna gostota receptorjev na različnih žilnih predelih, encimska razgradnja peptida v aktivno obliko ter aktivnosti

endotelijskih sprostitvenih dejavnikov. Nekateri so celo mnenja, da obstajata dva različna U-II receptorja, kjer vezava U-II povzroči dva nasprotujoča si odgovora (28).

Čeprav znotrajcelični mehanizmi prenosa signala kot tudi interakcija z drugimi vazoaktivnimi dejavniki še niso popolnoma raziskani, lahko na podlagi dosedanjega eksperimentalnega dela sklepamo, da je vazodilatatorni odgovor na U-II odvisen od endotelija, medtem ko je krčenje od endotelija neodvisno (slika 6).

Zdi se, da U-II ne deluje le neposredno na žilno steno ali na samo srčno mišico. U-II ima namreč tudi centralni učinek v vlogi nevromodulatorja in/ali nevrotransmitorja srčno-žilnih, endokrinih in presnovnih funkcij (28–31).

Pri bolnikih s hipertenzijo so vrednosti U-II povečane tako v možganskem likorju kot tudi v serumu. Intracerebroventrikularni vnos U-II pri ovci (29) in podgani (30) povzročita od odmerka odvisen porast krvnega tlaka, tahikardijo, povečano sposobnost krče-



Slika 6. Delovanje urotenzina-II (U-II). Vežava U-II na urotenzinski receptor (UTr) gladkomišične celice povzroči od endotelija neodvisno vazokonstrikcijo ter rast in razmnoževanje GMC, medtem ko vežava na UTr, ki se nahaja na endoteliju žile, privede do od endotelija odvisne vazodilatacije. UTr gladkomišične celice aktivira PLC (fosfolipazo C), ki preko nastanka IP₃ ter DAG povzroči porast znotrajceličnega kalcija ter fosforilacijo miozinskih lahkih verig. Preko kinaze ERK pride do fosforilacije proteina, ki veže aktin. Vse to vodi v krčenje GMC, ki je od endotelija neodvisno. Vežava U-II na UTr endotelijske celice pa spodbuja sproščanje NO in prostaglicina (PGI₂) s končnim vazodilatatornim odgovorom. Poleg uravnavanja žilnega napona preko aktivacije PKC, protein-kinaze ERK (angl. extracellular signal-regulated kinase), RhoA, U-II spodbuja tudi rast in razmnoževanje ter hipertrofijo celic.

nja miokarda. Porast krvnega tlaka pri podganah z arterijsko hipertenzijo (SHR) je bil večji kot pri kontrolni skupini podgan z normalnimi vrednostmi krvnega tlaka (30). Blokator β -receptor je pri ovcah zavrl tahikardni odgovor. Poleg tega je Watson opazil pri ovcah povišane koncentracije adrenalina, adrenokortikotropnega hormona (ACTH) ter krvnega sladkorja v plazmi, iz česar lahko predvidevamo, da U-II sodeluje pri uravnavanju simpatiko-adrenalnih poti (28, 31).

ZAKLJUČEK

Endotelij žil je ves čas v neposrednem stiku s krvnim obtokom in prek njega sprejema raz-

lične vazokonstriktorne ali vazodilatatorne nevrohormonalne signale kot tudi mehanske signale. Na vplive nevrohormonov se odziva tako, da sprošča v špranjo med endoteljsko celico in gladkomišično celico žilne stene vazoaktivne snovi. Kam se bo prevesilo ravnotežje med vazokonstikcijo in vazodilatacijo, je odvisno od koncentracije in učinkovitosti teh snovi v določenem trenutku. Skupni učinek vazoaktivnih snovi, ki delujejo lahko neposredno na samo GMC, in tistih, ki so odvisne od endotelija, bo določal končni žilni napon. Vazoaktivne snovi imajo tudi pomemben učinek na presnovo, prehranjenost ter rast in razmnoževanje celic v žilni steni.

LITERATURA

1. Murphy RA. Calcium and Crossbridge Regulation. In: Berne RM, Levy MN. Physiology. St. Louis: Mosby Year Book; 1993; 316–20.
2. Brenner BM, Troy JL, Ballermann BJ. Endothelium-dependent vascular responses. Mediators and mechanisms. J Clin Invest. 1989 November; (84): 1373–8.
3. Pearson PJ, Vanhoutte PM. Vasodilator and Vasoconstrictor Substances Produced by the endothelium. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1993; 122: 1–76.
4. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Role of carbon monoxide in cardiovascular function. J Cell Mol Med. 2006 Jul–Sep; 10 (3): 672–86.
5. Atlas S. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. J Manag Care Pharm. 2007; 13 (8) (suppl S-b): 9–20.
6. Paul M, Poyan Mehr A and Kreutz R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. Physiol Rev. 2006, 86: 747–803.
7. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. Hypertension. 1994; 23: 1121–31.
8. Naseem KM, Riba R. Unresolved roles of platelet nitric oxide synthase. J Thromb Haemost. 2008 Jan; 6 (1): 10–9.
9. Morse D, Sethi J, Choi AM. Carbon monoxide-dependent signaling. Crit Care Med. 2002 Jan; 30 (1 Suppl): 12–7.
10. Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. Trends Pharmacol Sci. 1997 Jul; 18 (7): 252–6.
11. Fleming I. Cytochrome P450 and Vascular Homeostasis. Circ. Res. 2001; 89: 753–62.
12. Burstein SH, Young JK, Wright GE. Relationships between eicosanoids and cannabinoids. Are eicosanoids cannabinomimetic agents? Biochem Pharmacol. 1995 Nov 27; 50 (11): 1735–42.
13. Howlett AC. Pharmacology of cannabinoid receptors. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1995; 35: 607–34.
14. Randall MD, Alexander SP, Bennett T, et al. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. Biochem Biophys Res Commun. 1996; 229 (1): 114–20.
15. Randall MD, Kendall DA, O'Sullivan S. The complexities of the cardiovascular actions of cannabinoids. Br J Pharmacol. 2004; 142: 20–6.
16. Lim H, Dey SK. A novel pathway of prostacyclin signaling-hanging out with nuclear receptors. Endocrinology. 2002 Sep; 143 (9): 3207–10.
17. Ishida N, Tsujioka K, Tomoi M, et al. Differential activities of two distinct endothelin family peptides on ileum and coronary artery. FEBS Lett 1989; 247 (2): 337–40.
18. Cunningham ME, Huribal M, Bala RJ, et al. Endothelin-1 and endothelin-4 stimulate monocyte production of cytokines. Crit Care Med. 1997; 25 (6): 958–64.
19. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, et al. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. J Biol Chem. 1989; 264 (25): 14954–9.
20. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature. 1988; 332 (6163): 411–5.
21. Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, et al. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 1989; 159: 1435–40.

22. Kedziński RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001; 41: 851–76.
23. Hynynen MM, Khalil RA. The vascular endothelin system in hypertension – recent patents and discoveries. *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov.* 2006 Jan; 1 (1): 95–108.
24. Bern HA, Pearson D, Larson BA, et al. Neurohormones from fish tails: the caudal neurosecretory system. I. »Urophysiology« and the caudal neurosecretory system of fishes. *Recent Prog Horm Res.* 1985; 41: 533–52.
25. Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, et al. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature.* 1999; 401: 282–6.
26. Affolter JT, Newby DE, Wilkinson IB. No effect on central or peripheral blood pressure of systemic urotensin II infusion in humans. *Br J Clin Pharmacol.* 2002 Dec; 54 (6): 617–21.
27. Maguire JJ, Davenport AP. Is urotensin-II the new endothelin? *Br J Pharmacol.* 2002; 137: 579–88.
28. Ong KL, Lam KS, Cheung BM. Urotensin II: its function in health and its role in disease. *Drugs Ther.* 2005; 19 (1): 65–75.
29. Watson A, Lambert GW, Smith KJ, et al. Urotensin II acts centrally to increase epinephrine and ACTH release and cause potent inotropic and chronotropic actions. *Hypertension.* 2003 Sept; 42 (3): 373–9.
30. Lin Y, Tsuchihashi T, Matsumura K., et al. Central cardiovascular action of urotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2003 Oct; 26 (10): 839–45.
31. Watanabe T, Kanome T, Miyazaki A, et al. Human Urotensin II as a link between hypertension and coronary artery disease. *Hypertens Res.* 2006 Jun; 29 (6): 375–87.

Prispelo 5. 11. 2007