

# Активиране на РААС В патогенезата на сърдечната недостатъчност

Доц. Борислав Георгиев

Национална кардиологична болница

## Ангиотензин II-медирувани сигнални пътища при сърдечна недостатъчност

### Рецептори за ангиотензин II

Ангиотензин II (Ang II) – основен биоактивен пептид на ренин-ангиотензин-алдостероновата система (РААС), играе критична роля в контрола на сърдечно-съдовата хомеостаза. Той има ключова роля в генезата на много сърдечно-съдови болести като хипертония, атеросклероза, рестеноза след ангиопластика и застойна сърдечна недостатъчност (СН). Многобройните ефекти на Ang II се медируват чрез специфични и сложни вътреклетъчни сигнални пътища. В клетките на бозайниците Ang II медирува ефектите си чрез поне два вида мембранни рецептори – AT1 и AT2. Човешкият ген за AT1 се намира в хромозома 3<sup>1</sup>. AT1 рецепторът е гликопротеин, съдържащ екстрацелуларни места за гликозилиране откъм аминокрая си (Asn4) и втора екстрацелуларна бримка (Asp176 и Asn188). Трансмембраният домен откъм аминокрая и сегментите в първата и третата екстрацелуларна бримка са отговорни за взаимодействията на G-протеина с рецептора<sup>2</sup>. AT1 рецепторът взаимодейства с множество хетеротримерни G-протеини, включително Gq/11, Gi/o, Gα12 и Gα13, и активира множество сигнални пътища. Същият активира растежни сигнални пътища и медирува основните ефекти на Ang II като вазоконстрикция, секреция на алдостерон, повишен сърдечен контрактилитет, натриева реабсорбция в бъбречните каналчета, клетъчна пролиферация, съдова и сърдечна

хипертрофия, възпалителни отговори и оксидативен стрес<sup>3</sup>. Както повечето G-протеини, AT1 рецепторът се интернализира след стимулация с Ang II – процес, зависим от специфичните остатъци, локализовани в цитоплазмената област. Интернализирането на G-протеина включва фосфорилиране на рецептора, което вероятно се извършва чрез кавеола. Проучвания показваха, че карбоксилният сегмент, богат на серин/треонин, е необходим за фосфорилирането и интернализирането на рецептора и сериновото фосфорилиране на AT1 рецептора, медирувано чрез G-протеин-рецепторна киназа (GRK), играе важна роля в десенситизацията на заетия от агонист рецептор<sup>4</sup>.

За разлика от AT1 рецептора, физиологичната роля на AT2 рецептора е по-слабо проучена. AT2 рецепторът се различава от AT1 по геномната си организация, тъканната си експресия и сигналните си механизми. Същият се характеризира с висок афинитет към непептидните рецепторни антагонисти PD123319, PD123177 и CGP42112 и с много нисък афинитет към лосартан и кандесартан (селективни AT1-рецепторни антагонисти, ангиотензин-рецепторни блокери)<sup>3</sup>. Ang II се свързва с AT2 рецептора по сходен начин, както и с AT1 рецептора. AT2 рецепторът е проучен при много видове, включително при хора, плъхове и мишки. Той представлява трансмембранен рецептор със седем домена, изграден от 363 аминокиселинни остатъка, с молекулна маса 41 kDa. Молекулната му идентичност с AT1 рецептора е само 34%<sup>5</sup>. Интересен е фактът, че генът, кодиращ AT2 рецептора, е разположен на хромозома X. Стимулацията на AT2 рецептора от Ang II, за разлика от AT1 рецептора, не се последва от взаимодействие на активирания рецеп-

тор с бета-арестини и последваща интернализация<sup>6</sup>, което показва, че класическите бета-арестин-медирувани механизми не участват в хомоложната десенситизация на AT2 и че регулацията на AT2 се различава от регулацията на AT1 и повечето други G-протеини. AT2 рецепторите се експресират във високо количество във феталните тъкани, експресията им се понижава значително след раждането и се ограничава само до няколко органа, включително сърдечно-съдовата система. AT2 рецепторите се реекспресират при възрастните животни след сърдечно или съдово увреждане и по време на оздравителни процеси, което показва ролята на тези рецептори за тъканното ремоделиране, растежа и/или развитието. Същите често индуцират противоположни на AT1 реакции – вазодилатация, антирастежни, антихипертрофични и кардиопротективни ефекти. AT2 рецепторите имат антипролиферативни и апоптотични ефекти в гладкосодовата мускулна тъкан и редуцират неоптималната пролиферация в отговор на увреждане чрез противодействие на ефектите на Ang II, медирувани чрез AT1 рецепторите<sup>7</sup>. В сърцето експресията на AT2 се активира при патологични състояния и води до инхибиция на растежа и ремоделирането и до засилен вазодилатация<sup>8</sup>.

След миокарден инфаркт свръхекспресията на AT2 рецепторите подпомага запазването на левокамерната функция, което говори за благоприятната роля на тези рецептори по отношение на ремоделирането на миокарда след инфаркт<sup>9</sup>. Свръхекспресията на AT2 рецепторите в лявата камера на пресионно-обременени плъхове редуцира миокардната фиброза и понижава диаметъра на миоцитите. AT2 рецепторите медируват антипролиферативни и антифибротични ефекти при плъхове с индуцирана хипертония<sup>10</sup> и играят значима роля в протекцията срещу ранно развитие на левокамерна дилатация и понижение на ранната смъртност след миокарден инфаркт. Кардиопротективните ефекти на AT1 рецепторите в постинфарктното ремоделиране вероятно са свързани с Ang II-медиуваните реакции чрез AT2.

Описани са още два рецептора за Ang II – AT3 и AT4. AT3 рецепторът е пептид, свързващ се основно с Ang II. Този рецептор не се свързва с непептидни лиганди като лосартан или PD123319 (селективен AT2-рецепторен антагонист) и е наблюдаван само в някои клетъчни линии. AT4 рецепторът се експресира в сърцето, белия дроб, бъбрека, мозъка и черния дроб, свързва се с ангиотензин IV<sup>11</sup>, но не и с лосартан или PD123319. AT4 рецепторът има висок афинитет към ангиотензин IV<sup>12</sup>. AT4 и AT1/AT2 рецепторите се различават по отношение на специфичните си лиганди и тъканното си разпределение<sup>11</sup>. Ангиотензин

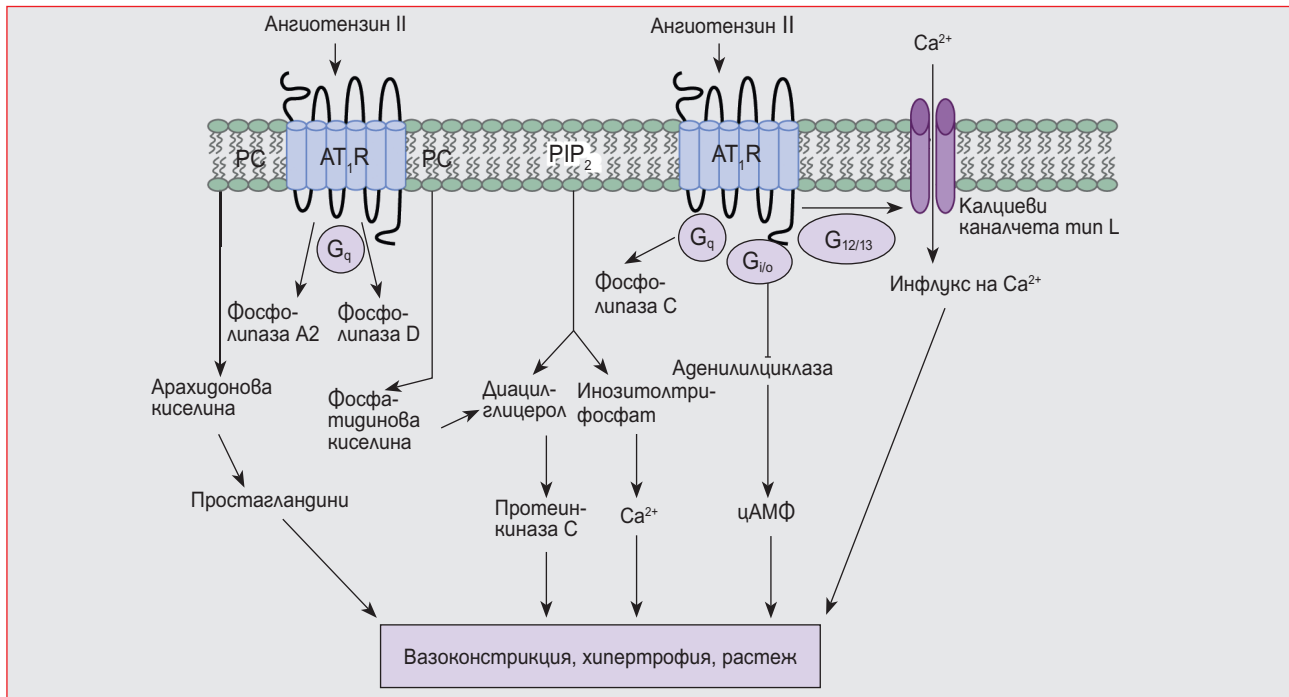
IV индуцира вазорелаксация в различни съдови мрежи, подобрява освобождаването на калций в ендотелните клетки и повишава активността на ендотелната синтаза на азотен оксид (eNOS).

Ангиотензин IV стимулира фосфатидил-инозитол-3-киназата (PI3K) и фосфатидил-инозитол-зависимата киназа 1 (PDK1) и индуцира фосфорилирането на протеинкиназа B и ERK1/2<sup>13</sup>. Тези киназни пътища регулират пролиферативните клетъчни ефекти на пептида. Ангиотензин IV индуцира експресията на инхибитора на плазминогеновия активатор 1 в ендотелните клетки, което показва ролята на ангиотензин IV за фибринолизата<sup>14</sup>. Ангиотензин IV активира и пътя на NF-κB и повишава активността на проинфламаторните гени в съдовата гладка мускулатура. AT4 рецепторите са открити и в сърцето, където ангиотензин IV стимулира синтеза на протеини в сърдечните фибробласти<sup>15</sup> и редуцира левокамерното налягане и фракцията на изтласкване, а така също и експресията на ранните гени c-fos и egr-1 в изолирано сърце. Тези данни показват, че разграждането на Ang II може да играе роля в патогенезата на сърдечно-съдовата болест. Цялостното значение на AT4-медиувания сигнални път обаче предстои да бъде изяснено.

## AT1-медирувани вътреклетъчни сигнални пътища

### Класически G-протеин-зависими сигнални пътища

Свързването на AT1 рецептора с негов агонист иницира каскада от вътреклетъчни събития. AT1 рецепторът се куплира с протеина Gq/11, който стимулира фосфолипаза C, при което се образуват вторичният посредник диацилглицерол и инозитолтрифосфат. Диацилглицеролът активира протеинкиназа C, а инозитолтрифосфатът се свързва с рецептора си върху саркоплазмения ретикулум, което води до отваряне на йонно каналче, позволяващо излизане на калциеви йони в цитоплазмата. Активираната от Ang II фосфолипаза C хидролизира фосфатидилхолин до холин и фосфатидинова киселина, която от своя страна бързо се превръща в диацилглицерол – причина за поддържане на активното състояние на протеинкиназа C. И протеинкиназа C, и калций-медиуваните сигнални пътища участват във вазоконстрикцията и сърдечната хипертрофия. Ang II фосфорилира и активира фосфолипаза A2, която продуцира арахидонова киселина – прекурсор на простагландините, и която участва в Ang II-индуцирания растеж на съдовата гладка мускулатура и сърдечната хипертрофия<sup>16</sup>. AT1 рецепторът също се куплира с Gi/o, инхибирайки аденилилциклазата в някои тъкани и атенюирай-



**Фиг. 1.** Класически сигнални път на AT<sub>1</sub> рецепторите. Свързването на ангиотензин II с AT<sub>1</sub> рецепторите води до G-протеин-куплирана активация на фосфолипаза C чрез G<sub>q</sub>, което води до хидролиза на фосфатидинозитол, образуване на инозитолтрифосфат и натрупване на диацилглицерол. Инозитолтрифосфатът мобилизира калциевите йони от саркоплазмения ретикулум, а диацилглицеролът активира протеинкиназа C. И сигналният път на протеинкиназа C, и калциевият сигнални път участват в процесите на вазоконстрикция и сърдечна хипертрофия. AT<sub>1</sub> рецепторите се куплират с G<sub>i/o</sub>, което води до инхибиция на аденилилциклазата и до понижаване на продукцията на цАМФ, което води до вазоконстрикция. Активацията на фосфолипаза A2 води до продукция на арахидонова киселина и продукция на простагландини. AT<sub>1</sub> рецепторите се свързват с G<sub>12/13</sub>, което води до отваряне на калциевите каналчета тип L и повишение на инфлукса на калциевите йони

ки продукцията на вторичния посредник – цикличен аденозинмонофосфат (цАМФ). При активация на AT<sub>1</sub> рецепторите продукцията на този вазодилатор се понижава, което води до вазоконстрикция. AT<sub>1</sub> рецепторите играят роля и в отварянето на калциевите каналчета и навлизането на екстрацелуларни калциеве йони в клетката. Активацията на калциевите каналчета тип L е медирана от AT<sub>1</sub> рецепторите, куплирани с G<sub>12/13</sub> протеини (фиг. 1)<sup>17</sup>.

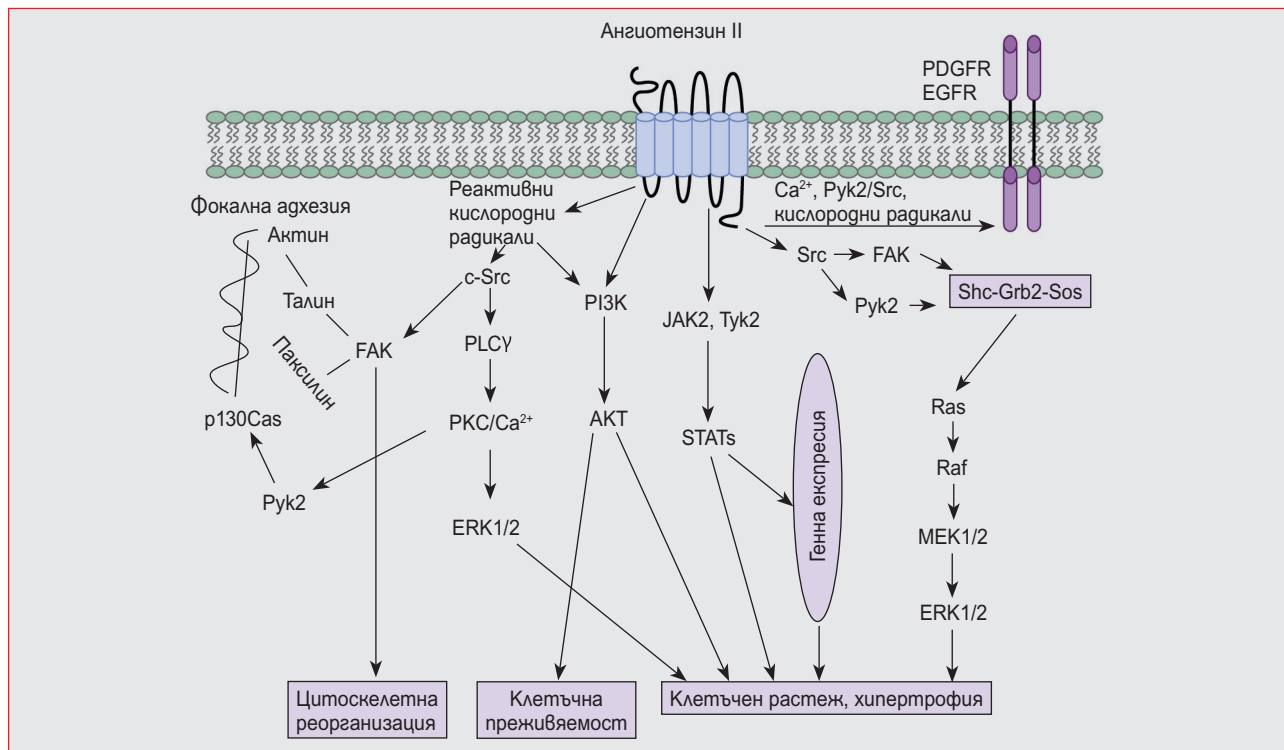
### AT<sub>1</sub>-медирано тирозиново фосфорилиране

Ang II индуцира ефектите си чрез активация на тирозинкинази, които от своя страна фосфорилират много целеви молекули, асоциирани с клетъчния растеж и апоптозата, диференциацията, трансформацията и вазоконстрикцията. Към тирозинкиназите, активирани от Ang II и AT<sub>1</sub> рецепторите, се отнасят много рецепторни тирозинкинази – рецептор за епидермален растежен фактор (EGFR), рецептор за тромбоцитен растежен фактор (PDGFR) и рецептор за инсулин-подобен растежен фактор (IGFR), и нерецепторни тирозинкинази – фамилията Src кинази, киназите Janus (JAK), фокална адхезионна киназа

(FAK), калций-зависими тирозинкинази p130Cas и PI3K (фиг. 2)<sup>16, 18</sup>. Стимулацията на клетъчния растеж от Ang II е описана при кардиомиоцити и съдови гладкомускулни клетки. Тези ефекти са асоциирани с активация на тирозиновото фосфорилиране и активация на MAPK и свързаните пътища, което води до повишена експресия на ранните гени, като c-fos, c-jun и c-myc, които контролират клетъчната пролиферация и растеж. Тези ефекти са свързани с развитие на сърдечно-съдови заболявания – хипертония, миокардна хипертрофия, СН и атеросклероза.

### Рецепторни тирозинкинази

През последните години стана ясно, че трансактивацията на рецепторните тирозинкинази от G-протеин-куплирани агонисти е общ феномен. Митогенните ефекти на Ang II вероятно са медираны чрез активация на рецепторни тирозинкинази. AT<sub>1</sub>-медирана активация е доказана за EGFR, PDGFR и IGFR<sup>19</sup>. EGFR се експресира в много клетъчни типове и е важен рецептор, участващ в контрола на много фундаментални клетъчни процеси. Трансактивацията му е медирана от няколко вторични посредника – калциеве йони, протеинкиназа C, Puk2, Src, реактивни кислород-



**Фиг. 2.** Ang II активира тирозинкиназите чрез AT1 рецепторите. Ang II повлиява активността на рецепторните тирозинкинази, като рецептор за епидермален растежен фактор (EGFR) и рецептор за тромбоцитен растежен фактор (PDGFR), чрез няколко вторични посредника – Ca<sup>2+</sup>, протеинкиназа C, Pyk2, Src и реактивни кислородни радикали. Активацията на EGFR води до активиране на поредица от молекули и до активация на MAP киназите. Ang II фосфорилира и множество нерецепторни тирозинкинази, като JAK-STAT, FAK, Pyk2, p130Cas и PI3K. Активираните тирозинкинази фосфорилират и много други молекули, които регулират клетъчните ефекти на Ang II

ни радикали, металопроотеинази, които образуват EGF-подобни лиганди<sup>19, 20</sup>. Блокирането на киназната активност на EGFR спира Ang II-активирания сигналния път – напр. предотвратява активацията на ERK1/2 в съдовите гладкомускулни клетки и кардиомиоцитите<sup>19, 21</sup>, което показва, че трансактивацията на EGFR е отговорна за повечето растежни ефекти на Ang II. Проучванията показват, че активацията на EGFR има отношение към Ang II-индуцираната вазоконстрикция, клетъчен растеж, миокардна хипертрофия и хипертония<sup>22</sup>. Бе доказано, че индуцираната от Ang II трансактивация на рецептора за IGF-1 е ключов медиатор на активацията на фосфоинозитол-3-киназата. За разлика от трансактивацията на EGFR, Ang II-индуцираната активация на PDGFR вероятно е лиганд-зависима, изискваща киназа, чувствителна към кислородните радикали, различна от Src и JAK2<sup>23</sup>. Ang II-индуцираната активация на PDGFR води до развитие на миокардна хипертрофия и съдово ремоделиране<sup>24, 25</sup>.

## Нерецепторни тирозинкинази

### Кинази от фамилията Src

Проучванията показват, че киназите от фамилията Src, като c-Src, играят важна роля в регулацията

на растежния отговор, индуциран от Ang II<sup>26</sup>. Фамилията Src кинази се състои от поне 14 членове, от които c-Src е прототип на клетъчните членове на Src фамилията (Src, Fyn, Yes, Fgr, Lck, Lyn, Hck, Vlk и Yrk). Всички членове на Src фамилията имат сходни общи домени, включително една N-терминална последователност, която участва в сигнални взаимодействия. c-Src се експресира широко в съдовите гладкомускулни клетки и кардиомиоцитите и бързо активира Ang II<sup>27</sup>. c-Src се активира от Gβγ в процес, зависим от кислород-съдържащите радикали, и активира много други пътища. Src-индуцираната активация на PLCγ, който е субстрат на членове от фамилията Src кинази, стимулира освобождаването на калциеви йони от интрацелуларните депозита. Src е необходима и за Ang II-индуцираната активация на ERK1/2, Pyk2 и няколко други протеини, като FAK, паксилин, JAK2, STAT1, кавеолин и адапторния протеин Shc<sup>28</sup>, което показва, че активацията на Src играе ключова роля в Ang II-медираната цитоскелетна реорганизация, фокалната адхезия, клетъчната миграция и растежа. Активирането на Src от Ang II вероятно е важен медиатор на сърдечната хипертрофия и съдовото ремоделиране.

### Активация на FAK и PYK2

FAK и PYK2 се означават още като клетъчни адхезионни кинази, тирозинкинази, асоциирани с фокалната адхезия, или калций-зависими тирозинкинази<sup>29</sup> и играят роля в сигналните пътища на клетъчните регулаторни процеси, медиранни от взаимодействието на интегрин с екстрацелуларния матрикс. Ранни проучвания показаха, че активацията на FAK и PYK2 има отношение към хипертрофията на кардиомиоцитите и играе важна роля за реализацията на Ang II-медираните клетъчни ефекти. FAK се подлага на фосфорилиране, което води до свързване на FAK с Grb2, Sos и Ras и последваща активация на ERK1/2<sup>29</sup>. Ang II бързо индуцира фосфорилиране на тирозинов остатък на FAK, което позволява клетъчната адхезия към екстрацелуларния матрикс и активацията на цитоскелетни протеини, включително p130Cas, Pyk2, паксилин и талин; всички те регулират формата и двигателните процеси в клетката. Бе доказано, че взаимодействието между p130Cas, Pyk2 и фосфатидилинозитол-3-киназата активира рибозомната p70S6 киназа, която играе важна роля в ангиотензин-медирания протеинов синтез. Pyk2 – хомолог на FAK, се активира от AT1 рецептора и е зависим от повишената вътреклетъчна концентрация на калциеви йони и протеинкиназа C<sup>30, 31</sup>. Тъй като Pyk2 регулира c-Src и свързва G-протеин-куплираните вазоконстрикторни рецептори с медираните от тирозинкиназите контрактилни, миграторни и растежни отговори, той може да представлява свързващия елемент между калций-зависимите пътища и тирозинкиназните пътища в сърдечно-съдовите клетки.

### p130Cas

p130Cas първоначално е смятан за фосфотирозин свързващ протеин във v-Crk- и v-Src-трансформираните клетки и служи като адапторна молекула – молекулна последователност, богата на поролин, а доменът SH3 позволява взаимодействието с PYK2 в присъствие на Ang II и свързването с домена SH2 на Crk и Src<sup>32</sup>. p130Cas е важен фактор за интегрин-медираната клетъчна адхезия чрез натрупване на цитоскелетни сигнални молекули като FAK, хаксилин и тензин в местата на адхезия. Фосфорилирането на p130Cas е зависимо от калциеви йони, c-Src и PKC и изисква интактен цитоскелет. Други проучвания показаха, че Ang II-индуцираната активация на p130Cas е независима от калциеви йони и PKC. Ang II-индуцираната фосфорилация на тирозина на Src и p130Cas е от основно значение за ангиотензин-стимулираната миграция на съдовите гладкомускулни клетки чрез активация на ERK1/2 и JNK<sup>33</sup>. Въпреки че точното функционално значение на Ang II-индуцираната активация на p130Cas не е изяснено, вероятно има значение за регулацията на експресията

на  $\alpha$ -актин, клетъчната пролиферация, миграция и клетъчната адхезия.

### Активация на JAK/STAT

Сигналният посредник и активатор на транскрипцията на Janus киназата (STAT) участва в множество разнообразни клетъчни процеси – възпаление, апоптоза, регулация на клетъчния цикъл и развитие<sup>34</sup>. Открити са четири Janus протеина – JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2<sup>35</sup>, наречени така на името на римския двулик бог Янус и функциониращи като цитозолни тирозинкинази, които индуцират каскада от реакции на фосфорилиране, водещи до активация на STAT. Фосфорилирането на тирозинов остатък на STAT води до хомодимеризиране и хетеродимеризиране на STAT. STAT димерите бързо се транспортират от цитоплазмата в ядрото, където активират генната транскрипция. AT1 активира JAK2 и Tyk2 в сърдечно-съдовата система. В съдовите гладкомускулни клетки JAK фосфорилира STAT протеините p91/84 (STAT1 $\alpha/\beta$ ), p113 (STAT2) и p92 (STAT3) в отговор на Ang II, което показва ролята на този път за активацията на ранните растежни гени от Ang II. Сигналният път JAK-STAT активира ранните гени на растежа, което вероятно е механизъм за Ang II-медирания съдов и сърдечен растеж, ремоделиране и регенерация<sup>36</sup>. Бе доказано, че STAT има важна роля в експресията на ангиотензиновите гени в сърцето. Активацията на STAT5A и STAT6, индуцирана от исхемия-реперфузия или миокарден инфаркт, стимулира свързването на STAT с St-гомена на ангиотензиноген, което води до повишение на генната експресия на ангиотензиноген<sup>37</sup>. Блоката на AT1-рецепторния сигнален път или инхибицията на активацията на JAK2 потиска образуването на комплекса STAT/St-гомен и регулира генната експресия на ангиотензиноген. Тези проучвания потвърждават ролята на ангиотензиноген за сигналния път JAK-STAT и сърдечното увреждане. Ang II-индуцираната активация на JAK2 също е важна стъпка за развитието на съдовите усложнения на диабета.

### Фосфоинозитол-3-киназа

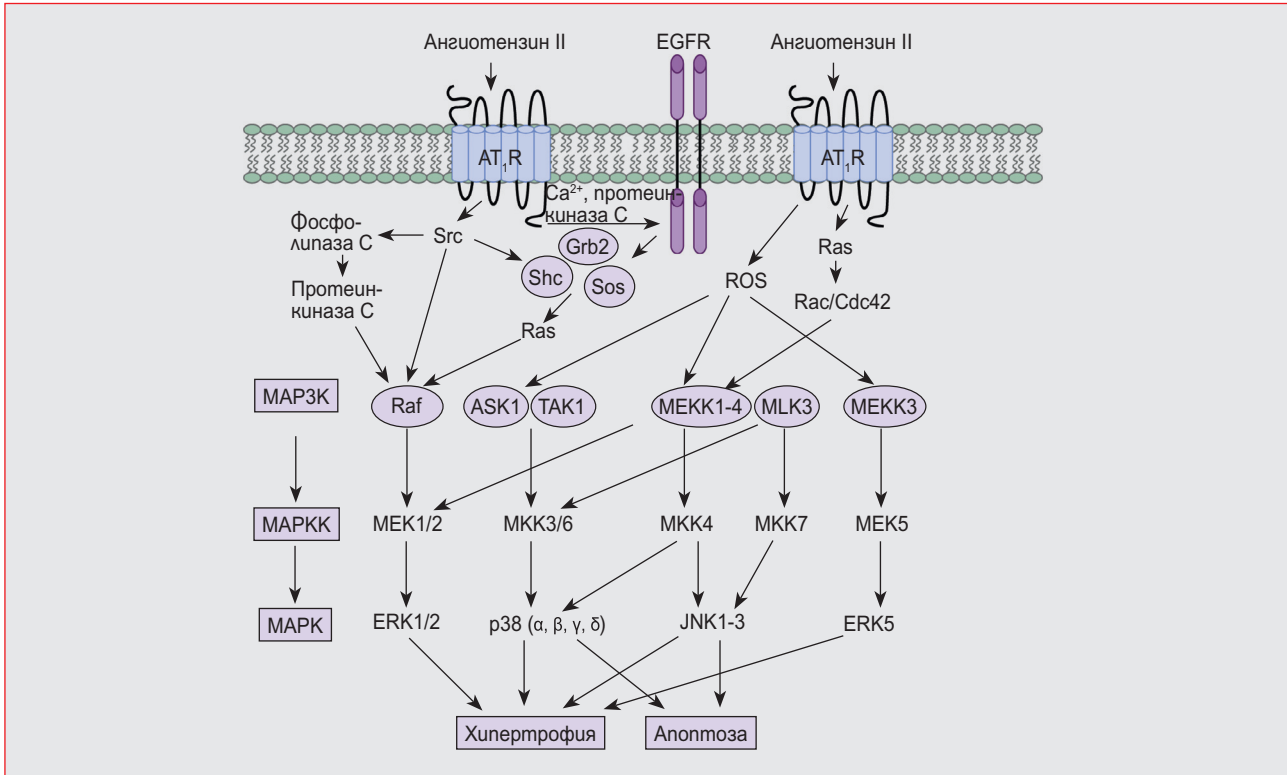
Фосфоинозитол-3-киназите са фамилия от липидни и протеинни кинази, отговорни за фосфорилирането на PtdIns на D3 позиция в инозитоловия пръстен. Тези молекули действат като вторични посредници и повлияват множество клетъчни процеси – фосфорилиране, преживяване, цитоскелетно ремоделиране, и играят важна роля в регулацията на растежа на кардиомиоцитите и гладкомускулните съдови клетки. Фосфоинозитол-3-киназите се класифицират според субстратната специфичност и организацията на субединиците си. Ензимите от клас I продуцират PtdIns (3, 4, 5)P3 *in vivo*. Ензимите от клас IA са хетероду-

мерни протеини, всеки от които се състои от каталитична субединица с тегло 110–120 kDa (p110 $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\delta$ ) и асоциирани регулаторни субединици (p85 $\alpha$  и  $\beta$ ), отговорни за взаимодействието на тези кинази с рецепторни тирозинкинази. Фосфоинозитол-3-киназите от клас IB (PI3K $\gamma$ ) се активират от хетеротримерни G-протеинови субединици и са асоциирани с адапторната молекула p101, необходима за регулацията на G $\beta\gamma$  хетеродимерите. Фосфоинозитол-3-киназите от клас II не продуцират PtdIns(3, 4, 5)P $_3$ , но продуцират PtdIns(3, 4)P $_2$  и PtdIns3P *in vivo*. Фосфоинозитол-3-киназите от клас II се характеризират с C2-гомен в C-терминалния си край, който не се откъсва при групи фосфоинозитол-3-кинази. Фосфоинозитол-3-киназата от клас III – Vps34, продуцира само PtdIns3P. Фосфоинозитол-3-киназа  $\alpha$ , която се активира само от рецепторни тирозинкинази, играе критично важна роля в индукцията на физиологичните растежни процеси в сърцето, но не и в патологичния растеж и е от ключово значение за поддържане на контрактилната функция в отговор на патологични стимули<sup>38</sup>. Фосфоинозитол-3-киназа  $\gamma$  повлиява негативно контрактилността на сърцето чрез различни сигнални механизми и като ключов медиатор на активацията на НАДФ.Н в отговор на Ang II<sup>39</sup>. Индуцираната от Ang II активация на ERK1/2 чрез фосфорилиране се повишава от фосфоинозитолкиназите в съдовите гладкомускулни клетки на спонтанно хипертензивни плъхове, което показва ролята им в процеса на Ang II-индуцираното съдово ремоделиране. Akt/PKB е важна целева молекула на фосфоинозитол-3-киназите при активирани от Ang II кардиомиоцити и съдови гладкомускулни клетки<sup>40</sup>. Тя регулира синтеза на протеини чрез активация на p70 S6 киназата и модулира Ang II-медиацията калциев отговор чрез стимулацията на калциевите йонни потоци. Akt/PKB участва в регулацията на клетъчната преживяемост чрез повлияване на експресията на Bcl-2 и c-тус и инхибицията на каспазите. Въпреки че точната роля на фосфоинозитол-3-киназите в сигналните пътища на Ang II не е установена, възможно е този механизъм да контролира баланса между митогенезата и апоптозата.

### Митоген-активирани протеинкинази

Митоген-активирани протеинкинази (МАРК) представляват поредица от последователно действащи кинази, които участват в централната регулация на клетъчния растеж, диференциация и трансформация. Всички МАРК са каталитично неактивни при клетки в покой и се активират в отговор на адекватни стимули чрез фосфорилиране на треонинови и тирозинови остатъци в близост до активното място. Фосфорилирането се регулира чрез двойно-специфични кинази на МАРК (МАРКК), които на свой ред се активират чрез фосфорилиране от киназа на

МАРКК (МАРККК)<sup>41</sup>. Веднъж активирани, тези терминални ефекторни кинази директно фосфорилират множество цитоплазмени, ядрени и митохондриални протеини за модулиране на генната експресия, клетъчния метаболизъм, клетъчните физиологични процеси и клетъчната смърт. Поне четири групи МАРК с разлика в регулацията се експресират при заболявания – екстрацелуларни сигнал-регулирани кинази (ERK)-1/2, c-Jun N-терминални кинази (JNK1/2/3), p38 протеини (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ ) и ERK5; всички те се активират от специфични кинази (ММК): MEK1/2 за ERK1/2, MKK3/6 за p38, MKK4/7 за JNK, MEK5 за ERK5 (фиг. 3). Всяка ММК може да бъде активирана от повече от една MEKK, което усложнява организацията на МАРК сигналните пътища<sup>42</sup>. Ang II индуцира фосфорилирането на Raf и Shc, което води до активацията на MEKK и MEK, което от своя страна пък води до фосфорилиране на тирозин и треонин в молекулите на ERK1/2, JNK2 и p38. Ang II индуцира фосфорилирането на Ras, а Ang II-индуцираната активация на ERK1/2 е асоциирана с повишена експресия на гените на ранния отговор c-fos, c-myc и c-jun, със синтез на ДНК и протеини, с клетъчен растеж и диференциация, с цитоскелетна организация на сърдечно-съдовите клетки. Някои данни показваха, че сигналният път на ERK1/2 играе важна роля в медиацията на ефектите на мозъчната РААС върху симпатиковата нервна активност при СН, което показва, че модуляцията на сигналния път на ERK1/2 в мозъка може да подобри нежеланите ефекти на мозъчната РААС по отношение на сърдечно-съдовата и бъбречната функция в процеса на прогресия на СН<sup>43</sup>. Освен ERK Ang II активира киназата JNK, която регулира растежа на кардиомиоцитите и съдовите гладкомускулни клетки. Ang II индуцира активацията на JNK чрез p21-активираната киназа (ПАК), която е зависима от мобилизацията на вътреклетъчните калциеви йони и от активацията на PKC. В сърцето активацията на p38 МАРК е наблюдавана при модел на пресионно свръхобременяване или индуцирана от миокарден инфаркт сърдечна хипертрофия и СН при хора и животни<sup>44, 45</sup>. Специфичната за сърцето активация на p38 МАРК значимо потиска сърдечния контрактилитет. Инхибицията на p38 МАРК предпазва сърцето по отношение на исхемично увреждане, атенюира сърдечното ремоделиране и подобрява сърдечната функция при мишки със СН след миокарден инфаркт. Проучванията показаха, че активацията на p38 е асоциирана с директни ефекти на Ang II върху сърдечните клетки, докато стимулацията на ERK и JNK настъпва в асоциация с индуцирания от Ang II механичен стрес<sup>46</sup>. Тези резултати показват, че МАРК може да осигури нов терапевтичен подход по отношение на зависимите от Ang II патофизиологични процеси, които съпътстват прогресията на СН.



**Фиг. 3.** Схематично представяне на основните MAP каскади, активирани от AT1 рецепторите. Пътят на MAPK е триетапна каскада, в която участват три кинази. Този път се състои от няколко подфамилии, сред които пътищата на ERK, JNK и p38 MAPK. Всяка от тях се активира от хетеротримерен G-протеин, куплиран с AT1 рецептор; от активиране на рецептора за епидермален растежен фактор (EGFR), медирано от Ang II; от малки G-протеини, като Ras, cdc42, Rac; от протеинкинази, като Src; от протеинкиназа C чрез активация на фосфолипаза C и от реактивни кислородни радикали

### Малки ГТФ-свързани протеини

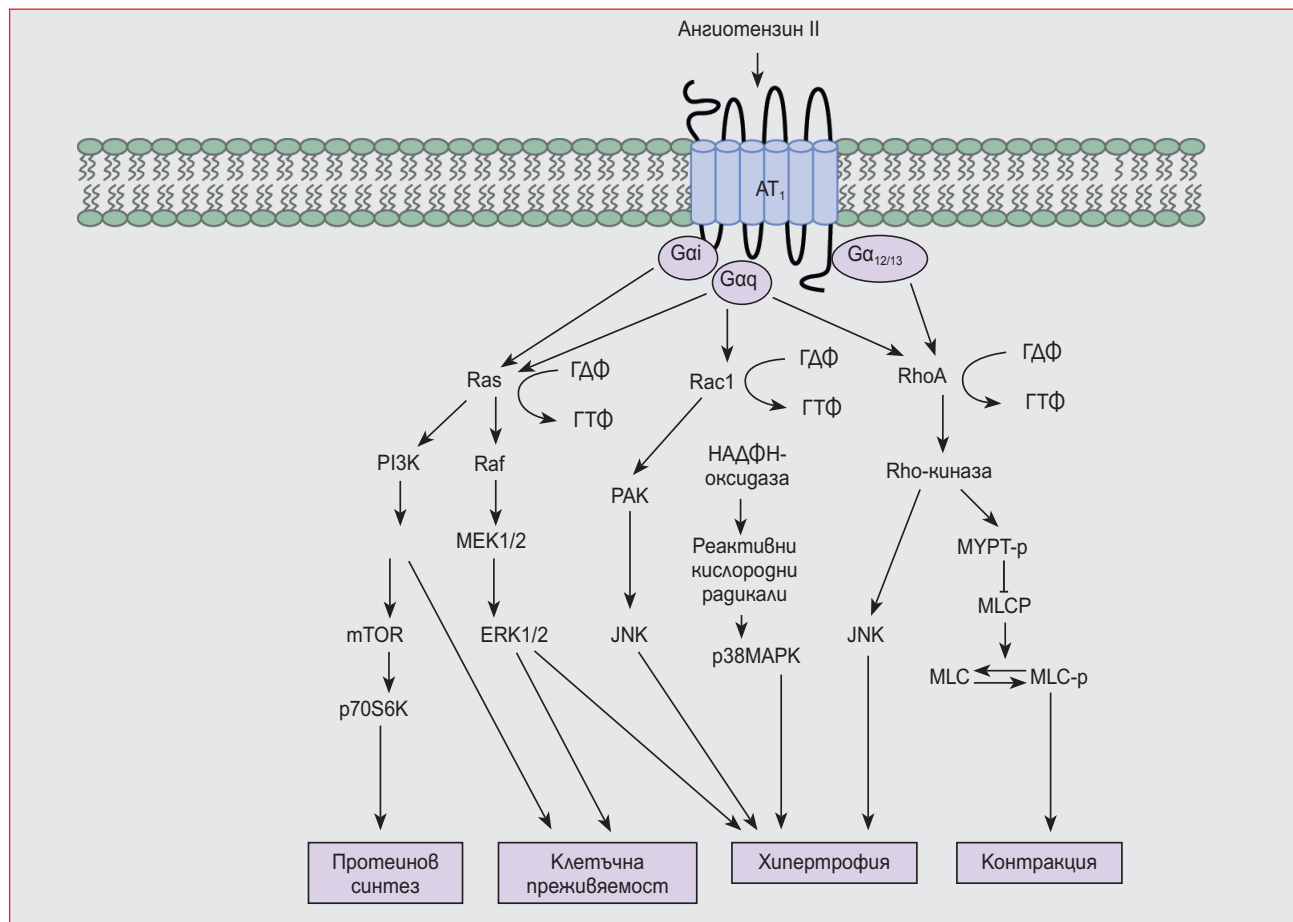
Малките ГТФ-свързани протеини (малки G-протеини) са суперфамилия мономерни протеини (при човека са открити повече от 150 члена на фамилията) с относителна молекулна маса 21 kDa, които регулират множество клетъчни процеси – делене, миграция и диференциация. Те се диференцират в пет фамилии – Ras (e.g., Ras, Rap и Ral); Rho (RhoA, Rac1 и cdc42); Rab; Sar1/Arf и Ran<sup>47</sup>. Малките G-протеини участват в цикъл между ГДФ-свързана неактивна форма и ГТФ-свързана активна форма под регулацията на гуанин-пренасящи фактори, които катализират замяната на ГДФ с ГТФ; ГТФ-аза-активиращите протеини, които стимулират хидролизата на ГТФ до ГДФ, и инхибиторите на гуаниновата дисоциация, които инхибират дисоциацията на ГДФ и поддържат малките G-протеини в неактивно състояние (фиг. 4)<sup>48</sup>. Активираният Ras протеини взаимодействат с множество ефектори (Raf/MEK1/2/ERK1/2 и PI3K)<sup>47</sup> в регулаторните процеси на генната експресия, клетъчната пролиферация, диференциация и преживяемост; Rho ГТФ-азите (RhoA/Rac1/cdc42) регулират цитоскелетната реорганизация и генната експресия; Rab и Sar1/Arf фамилията регулират везикуларния транспорт, Ran фамилията регулира транспорта между цитоп-

лазмата и ядрото и микротубулната организация. Бе доказано, че малки G-протеини (Ras, RhoA и Rac1) имат важна роля в сърдечната хипертрофия и СН<sup>47</sup>. Трансгенни мишки с временно регулирана индукция на V12Ras развиват камерна хипертрофия и аритмии, които се съпровождат от електрофизиологично ремоделиране. Ang II-индуцираната активация на p21 Ras се регулира чрез активацията на фамилията Src кинази и тирозиновото фосфорилиране на адапторния протеин Shc с последващо присъединяване на комплекса Grb2-Sos1 към мембранната фракция (фиг. 4)<sup>49</sup>. Бе доказано, че Rho/Rho-киназа-медирият сигнална пътя участва в стимулацията на AT1-рецепторните пътища на клетъчен растеж, ремоделиране и атеросклероза в сърцето и съдовете и съдовата контракция. Инхибицията на Rho/Rho-киназата атенюира Ang II-индуцираната хипертрофия на кардиомиоцитите и съдовите гладкомускулни клетки и експресията на инхибитор 1 на плазминогеновия активатор. Rho A участва и в Ang II-индуцираната активация на ядрен фактор κB, който контролира експресията на индуцибилни цитокини, хемокини, клетъчни адхезионни молекули и вазоактивни и антиапоптозни протеини от важно значение за стресовия отговор на клетката. Ang II активира и Rac1 – груза Rho

ГТФ-аза, която регулира p21-активираната киназа (PAK) и JNK. Rac1 участва в цитоскелетната организация, клетъчния растеж, възпалението и сърдечната хипертрофия. Нови данни показваха, че пътят Ang II/Rac1/STAT3 има важно значение в предсърдния миокард, където медира структурното ремоделиране и предсърдно мъждене. Бе доказано, че Rac-зависимите супероксиди в сърдечно-съдовата система имат множество функции. Rac1 контролира интрацелуларната продукция на супероксиди чрез регулацията на активността на НАДФ.Н оксигазата. НАДФ.Н оксигазата продуцира купероксиди, които са ключов медиатор на хипертоничния и хипертрофичния отговор към Ang II<sup>50, 51</sup>. Тези резултати показват, че Rac1 е критичен фактор за прогресията на сърдечното ремоделиране и че терапията, която повлиява миокардния Rac1, може да има благоприятен ефект в терапията на сърдечната хипертрофия и СН.

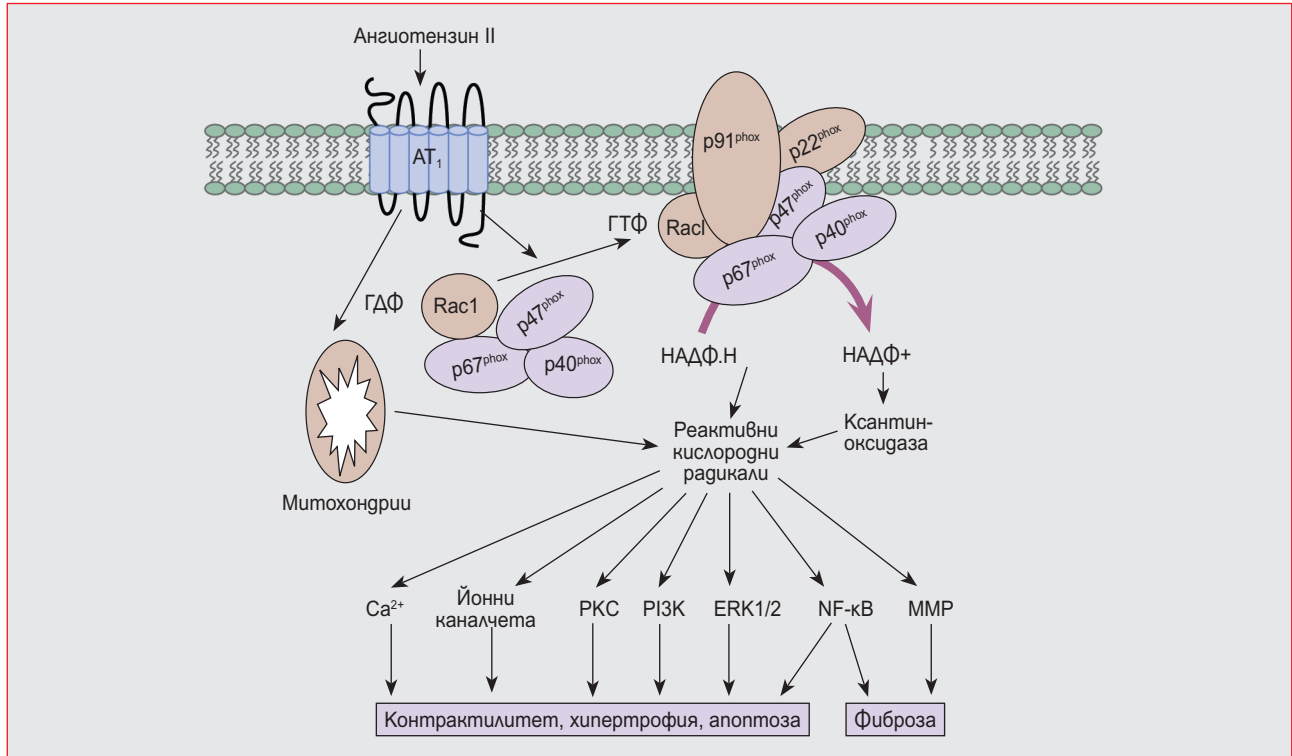
### Реактивни кислородни радикали

Много данни показват, че продукцията на реактивни кислородни радикали и активацията на редокси-зависимите сигнални каскади са от ключово значение за Ang II-индуцираните ефекти и имат важна роля в развитието и прогресията на СН, независимо от причината<sup>52, 53</sup>. Реактивните кислородни радикали функционират като вътреклетъчни и междуклетъчни вторични посредници (фиг. 5), като протеинови тирозинфосфатази и тирозинкинази, транскрипционни фактори, MAPK и йонни каналчета, и регулират съдовия тонус, клетъчния растеж, възпалението, исхемията/реперфузията, хипертонията и атеросклерозата<sup>54, 55</sup>. Всички сърдечно-съдови клетъчни типове продуцират реактивни кислородни радикали; основните източници на радикали при СН са митохондриите, ксантиноксигазите и нефагоцитните НАДФ.Н-оксигазы (Noxs).



**Фиг. 4.** Регулация на Ang II-медираните клетъчни отговори чрез активация на малки ГТФ-ази. Ang II активира Ras, RhoA и Rac1 в процес, зависим от активация на G-протеин-куплиран рецептор в плазмената мембрана. Малките ГТФ-ази циркулират между свързана с ГТФ неактивна форма и свързана с ГТФ активна форма. Активацията на Ras, медирана от Gq и Gi, регулира активацията на фосфоинозитол-3-киназата и Raf. Raf е един от първите компоненти на каскадата ERK MAPK, която регулира клетъчната преживяемост и сърдечната хипертрофия. Фосфоинозитол-3-киназата модулира клетъчната преживяемост и синтеза на протеин чрез Akt и p70S6K. Rac1 активира НАДФ.Н-оксигазата, която от своя страна регулира продукцията на реактивни кислородни радикали. Rac1 индуцира и активацията на пътя на JNK чрез PAK. RhoA регулира експресията на гени, свързани с цитоскелета и хипертрофията чрез Rho-киназата





**Фиг. 5.** Сигнален път, медиран от реактивни кислородни радикали, в сърдечното ремоделиране, индуцирано от Ang II. Основен ензимен източник на интрацелуларни реактивни кислородни радикали в отговор на Ang II са митохондриите, ксантин-оксидазите и нефагоцитните НАДФН-оксидази. НАДФН-оксидазата е ензим, състоящ се от няколко субединици, включително p91phox, p22phox, p47phox, p67phox и p40phox, който се регулира от Rac1 чрез AT1 рецепторите. Интрацелуларните реактивни кислородни радикали модулират активността на протеин-тирозинкиназите, като Src, Ras, JAK2, Pyk2, PI3K и EGFR, и MAP-киназите. Кислородните радикали повлияват и генната и протеинната експресия на активирани транскрипционни фактори, като ядрен фактор κB и активаторен протеин 1. Реактивните кислородни радикали стимулират калциеви и натриеви йонни каналчета на плазмената мембрана, което води до промени в концентрациите на катионите. Активацията на тези редокс-чувствителни пътища води до множество клетъчни отговори, които са неконтролирани и могат да доведат до сърдечно-съдово ремоделиране, включително сърдечна хипертрофия, фиброза, апоптоза и сърдечна дисфункция, индуцирани от Ang II

Значително повишение на миокардната активност на НАДФН-оксидазата е наблюдавано при СН при хора в сравнение със здрави сърца, което показва важността на тази ензимна система за левокамерното ремоделиране и дисфункцията след миокарден инфаркт<sup>56</sup>. Дефицитът на НАДФН-оксидазната субединица p47phox предотвратява левокамерното ремоделиране и дисфункцията след миокарден инфаркт и редуцията на кардиомиоцитната хипертрофия, апоптозата и интестичиалната фиброза и е асоцииран с подобрение на преживяемостта. Активността на НАДФН-оксидазата е сигнификантно повишена при Ang II-индуцираното сърдечно и съдово ремоделиране. Проучванията показват, че митохондриите са основен източник на реактивни кислородни радикали при СН. Хроничното повишение на производството на реактивни кислородни радикали в митохондриите може да доведе до увреждане на митохондриалната ДНК и функционални нарушения, което води до продукция на кислородни радикали и клетъчно увреж-

дане. Инхибицията на митохондриалния оксидативен стрес и увреждането на ДНК може да се окаже ефективна терапевтична стратегия при СН. Ang II-индуцираното митохондриално оксидативно увреждане води до дисфункция на ендотелните клетки и съдовите гладкомускулни клетки. Повишена експресия и активност на ксантин-оксидазата са установени при терминална СН при човек. Дългосрочната терапия с алопуринол (ксантиноксидазен инхибитор) сигнификантно редуцира левокамерното ремоделиране при експериментален миокарден инфаркт, което доказва участието на ксантин-оксидазата в този процес. Активацията на ксантин-оксидазата има отношение и към Ang II-индуцирания оксидативен стрес в ендотела. По-детайлното познаване на специфичната роля на различните източници на реактивни кислородни радикали в окислително-редукционните сигнални процеси, водещи до развитие на СН, може да подпомогне и разработването на нови терапевтични стратегии.

## AT2-медиирани Витреклеетъчни сигнални пътища

Макар че структурно се отнасят към G-протеин-куплираните рецептори, AT2 рецепторите участват в сигналната трансдукция и G-протеин-куплирани механизми, които се различават от тези на AT1 рецепторите. Интрацелуларните сигнални пътища на AT2 рецепторите са широко проучвани, но само няколко от тях са подробно описани. Подробно проучени са седем сигнални пътища, в които AT2 рецепторите медируют сърдечно-съдови ефекти (фиг. 6).

### G-протеини

Проучванията показват, че AT2 рецепторите се куплират с интрацелуларни сигнални пътища чрез G-протеина Gi, който е чувствителен към пертусис токсина. Gi-протеинът участва в трансдукцията на AT2-медираните сигнали чрез взаимодействие с Giα2 и Giα3 във фетални тъкани на плъх и в AT2-медираната стимулация на Kv потоците в невроните. Gi-протеинът участва и в AT2-медираната стимулация на активността на серин/треониновата фосфатаза 2A и води до понижение на активността на ERK1/2<sup>57</sup>.

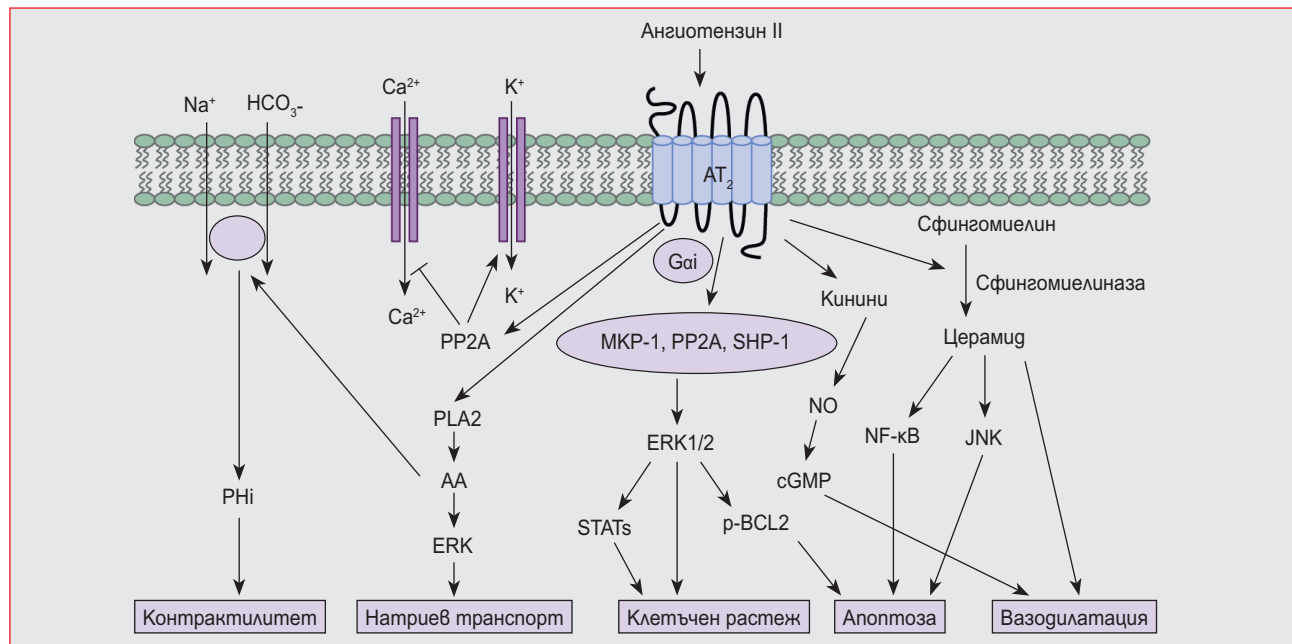
### Активация на протеин-фосфатазите и протеиново дефосфорилиране

Много проучвания показаха, че активацията на AT2 рецепторите индуцира бърза активация на протеин-

тирозин-фосфатазата и серин/треонин-фосфатазите, което води до дефосфорилиране и инактивация на съответните тирозин-кинази. AT2-рецепторната стимулация води до активация на MAPK-фосфатаза 1 (MKP-1), SH2-домен-съдържащата фосфатаза 1 (SHP1) и серин/треониновата фосфатаза 2A, което води до инхибиция на AT1-медираната активация на MAP-киназата. Проучванията *in vivo* и *in vitro* показаха, че деактивацията на ERK чрез AT2-рецепторите *in vivo* имат физиологична роля в процесите на сърдечния и съдовия растеж. Нови проучвания показаха, че MAP-киназите не са единствените протеини, чиято активност се модулира чрез активацията на AT2 рецепторите. Стимулацията на AT2 рецепторите в съдовите гладкомускулни клетки инхибира AT1-медираното тирозиново фосфорилиране на STAT1, STAT2 и STAT3 чрез активация на ERK1/2<sup>58</sup>. AT2-активираните тирозин- и серин/треонин-фосфатази имат контррегулаторни ефекти по отношение на клетъчната пролиферация и растеж, които се медируют посредством множество протеинкинази в отговор на AT1-рецепторната активация.

### Система на NO/цГМФ

Нови проучвания показаха, че активацията на AT2 рецепторите от Ang II води до брадикинин-зависима стимулация на освобождаването на азотен оксид в аортата с последваща продукция на цГМФ. Зависимостта между AT2 рецепторите и цГМФ/NO бе потвърдена в сърдечно-съдовите тъкани от много



**Фиг. 6.** Сигнални пътища и физиологични ефекти на AT2 рецепторите. AT2-рецепторните сигнали включват активация на протеинфосфатазите, като MKP-1, PP2A и SHP1, което води до дефосфорилиране и инактивация на ERK1/2 и STAT, системата на NO/цГМФ и активация на фосфолипаза A2, която медира освобождаването на арахидонова киселина и води до активация на системата Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> и регулация на интрацелуларното киселинно-алкално равновесие. Активацията на серин/треонин-фосфатазата 2A води и до отваряне на калиевите каналчета и до инхибиция на калциевите каналчета тип T. AT2-медираната апоптоза се регулира от сигналния път на церамид

проучвания *in vivo*. Инхибицията на AT2 рецепторите в хипертрофирано сърце води до активация на AT1-медицирания растежен отговор на лявата камера чрез супресия на цГМФ<sup>59</sup>. При спонтанно хипертензивни плъхове със склонност към инсулт AT2-медицираното повишение на нивото на цГМФ в аортата се дължи на активация на брадикининовите рецептори BK2, които на свой ред активират NO-синтазата, която продуцира азотен оксид. Тези проучвания показват, че AT2 рецепторите стимулират продукцията на азотен оксид, което води до повишена продукция на вторичния посредник цГМФ. цГМФ на свой ред медицира много биологични ефекти на азотния оксид – вазодилатация, натриуреза и инхибиране на растежа, чрез активация на цГМФ-зависима протеинкиназа. Тези ефекти са свързани с благоприятното действие на ангиотензин-рецепторните блокери (АРБ) в терапията на хипертонията<sup>60</sup>.

### Стимулация на фосфолипаза А2 и освобождаване на арахидонова киселина

Има съобщения, че активацията на AT2 рецепторите е свързана с натриевия транспорт чрез активация на фосфолипаза А2 и освобождаване на арахидонова киселина и цитохром P450-зависими метаболити в епителните клетки на бъбречните проксимални тубули. Този път води до активация на MAP и p21 ras по пътя на тирозинкиназа-Shc-Grb2-Sos. AT2 рецепторите медицират и освобождаването на арахидонова киселина в кардиомиоцитите, което води до активация на системата  $\text{Na}^+/\text{HCO}^-$  и регулиране на вътреклетъчната киселинно-алкална хомеостаза; това показва, че AT2 рецепторите са важни за регулацията на интрацелуларната ацидоза след увреждане<sup>61</sup>.

### Церамид

Церамид принадлежи към фамилия липиди – сфинголипиди, които притежават сфингоидна обща структура и различни активни групи. AT2-медицираният сигнален път, асоцииран с апоптозата, включва участието на церамид. Церамид индуцира апоптозата чрез активация на стресовите кинази или каспазите. Освен това той се продуцира при разграждането на сфингомиелин, медицирано от TNF- $\alpha$  и ядрен фактор KB.

Преглед на факта, че AT2 рецепторите индуцират активацията на ядрен фактор KB, церамид може да играе ролята на медиатор в сигнала на AT2/ядрен фактор KB. Проучванията показват също, че церамид играе роля и на вторичен посредник в процеса на вазодилатация<sup>62</sup>. Проучванията *in vivo* и *in vitro* потвърдиха, че церамид инхибира пролиферацията на съдовите гладкомускулни клетки. Тези проучвания предоставиха данни, въз основа на които може да бъде разработена терапевтична стратегия за лечение на сърдечно-съдовата болест, повлияваща сигнала на церамид.

Въпреки че AT2 рецепторите могат да се куплират с множество сигнални молекули подобно на други рецептори за хормони и невромедиатори, куплирани с G-протеин, са необходими допълнителни проучвания на отделните интрацелуларни пътища, куплирани с AT2 рецептори.

## Заклучение

РААС е хормонална система, която регулира сърдечно-съдовата, бъбречната и надбъбречната функция. Циркулаторната РААС има важно значение за регулацията на водната и електролитната хомеостаза и артериалното налягане и играе важна роля в развитието и прогресията на СН. Наскоро бе открита и локална – паракринна, автокринна и интракринна РААС. Тъканната РААС играе важна роля в нормалните физиологични процеси, както и при някои патологични състояния – хипертония, сърдечна хипертрофия, застойна СН и ремоделиране след миокарден инфаркт.

Интрацелуларната РААС вероятно не е независимо действаща система, а част от локалната РААС, която се проявява само при определени патофизиологични условия. Няколко наскоро открити компоненти на РААС, като ACE2, ангиотензин (1–7), ангиотензин IV и прорениновите/рениновите рецептори, играят важна роля в сърдечно-съдовата патофизиология. Въпреки големия напредък в разбирането на физиологията и патофизиологията на циркулаторната РААС, важно е да бъде проучена и ролята на тъканната РААС при нормални физиологични условия и при сърдечно-съдова болест.

### Книгопис

1. Guo, D. F., Furuta, H., Mizukoshi, M., et al. The genomic organization of human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;200:313-319.
2. Hjorth, S. A., Schambye, H. T., Greenlee, W. J., et al. Identification of peptide binding residues in the extracellular domains of the AT1 receptor. *J Biol Chem*. 1994;269:30953-30959.
3. Timmermans, P. B., Wong, P. C., Chiu, A. T., et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev*. 1993;45:205-251.

Пълната библиографска справка е на разположение в издателството и може да бъде представена при поискване.