

НОВИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ ЕНДОТЕЛИНИ И ТЕХНИ РЕЦЕПТОРИ

Г. БОГДАНОВ, Р. МЕТОДИЕВ И Н. БОЯДЖИЕВА

Катедра по фармакология и токсикология, Медицински факултет, Медицински университет – София

NEW RESEARCH ON ENDOTHELINS AND THEIR RECEPTORS

G. BOGDANOV, R. METODIEVA AND N. BOYADJIEVA

Department of Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty, Medical University – Sofia

Резюме. От откриването на ET-1 през 1988 г. се натрупаха значими експериментални и клинични изследвания върху механизмите на действие и фармакологията на ендотелини, изолираха се техни рецептори и се създадоха лекарства за лечение на белодробна артериална хипертония (БАХ). Убедителни данни в литературата документират ролята на ET1 като пептид и вазоконстриктор в патогенезата на БАХ. Бяха създадени т.нар. двойни „рецепторни антагонисти“ (ET_A/ET_B), които редуцират по-значимо вазоконстрикцията в различни кръвоносни съдове, включително и в белодробните артерии. През последните години се създават и се проучват експериментално нови генерации на ET антагонисти. Съществува риск от хепатотоксичност при тези лекарствени средства. Въпреки този факт не спират усилията да се намерят ефективни антагонисти на ендотелини с цел да се намали смъртността при пациентите от БАХ. Нови и оскъдни са изследванията за епигенетичната регулация на ендотелини. Документирани са промени в гена EDN1 чрез модификация на хистони и ДНК метилиране, които имат роля в регулацията на ET-1. Целта на настоящия обзор е да се посочат най-съвременните данни и прогресът в областта на ендотелините и тяхната роля в създаването на нови фармакологични средства.

Ключови думи: ендотелин, ендотелинови рецептори, белодробна артериална хипертония

Summary. Since the discovery of ET-1 in 1988, there has been substantial experimental and clinical research in the field of endothelins, their receptors and the development of new medications for the treatment of pulmonary hypertension. There is convincing evidence in the literature which demonstrates the role of ET-1 as a peptide and vasoconstrictor in the pathogenesis of pulmonary hypertension. New generations of ET-receptor antagonists were developed in the recent years for the treatment of pulmonary hypertension and despite their hepatotoxicity, the research continues. The research on the epigenetic regulation of endothelins is new and insufficient. The aim of the current review is to present the newest data about the research on endothelins and their role in the development of new medications.

Key words: endothelins, endothelin receptors, pulmonary hypertension

ВЪВЕДЕНИЕ

Ендотелиалната система се активира при белодробна артериална хипертония (БАХ) (R. P. Michel и др., 2003). При пациенти със заболяването и при експериментални модели са установени повишени нива на ендотелин 1 (ET-1) (T. Miyauchi и др., 1993; J. F. Jasmin и др., 2003). Убедителни данни в литературата документират ролята на ET1 като пептид и вазоконстриктор в пато-

генезата на БАХ. В допълнение са открити два различни подтипа на рецептори за ET-1 (ET_A и ET_B), които имат роля в механизмите му като вазоконстриктор, но и участват и обясняват неговата способност при дадени условия да предизвиква умерена вазодилатация (S. P. Alexander и др., 2008). Освен ET-1 в групата на ендотелините са изолирани и други ендотелини – ендотелин 2 (ET-2) и ендотелин-3 (ET-3).

Целта на обзора е да се посочат най-съвременните данни и прогресът в областта на ендотелините и тяхната роля в създаването на нови фармакологични средства. В допълнение ще приведем най-нови факти за епигенетичната регулация и създаването на нови моноклонални антитела като перспективно направление в изследванията и клиниката на ендотелините.

Ендотелин-подобен домен пептид (ENDOTHELIN-LIKE DOMAIN PEPTIDE; ELDP) – НОВ ПЕПТИД ОТ ГРУПАТА НА ЕНДОТЕЛИНИТЕ

ELDP е пептид, който е близък по генна секвенция до ET-1 (Yuzgulen J. et al., 2013). Пептидът се произвежда в ендотелните клетки на аортата заедно с ET-1 и се освобождава заедно с ET-1. Установено е, че нивата на ELDP се увеличават значимо при пациенти със сърдечна недостатъчност, което определя вниманието към бъдещи изследвания с цел разработка на ELDP като биомаркер. Въз основа на структурата на ELDP се създаде синтетичен пептид със същата секвенция и някои други агонисти и антагонисти на ET-1 (Cade и сътр., 1990).

Нови направления в изследванията върху ендотелин-2 (ET-2)

Генетичните изследвания върху ендотелините доведоха до определяне на гени за водещите ендотелини и техните рецептори. Новост в изследванията са резултатите, документиращи делеция на гена за ET-1. През последните години научните изследвания се фокусират върху този ендотелин не само заради различните му фармакологични ефекти, но и във връзка със създаването на антагонисти за неговото действие. През 2013 г. колективът на Chang и сътр. съобщи за създаване на порода мишки с делеция на ET-2 ген. Мишките показват тежко изоставане в своя растеж, хипогликемия, кетонемия и повишени нива на гените, свързани с гладуване. Дефицитът на ET-2 при тези мишки дава основание да се направи заключението, че пептидът участва във функцията на белите дробове, органите, регулиращи метаболизма, и чревния епителиум.

Документирана е голямата роля на ET-2 по време на раждане и след раждане за функцията на белия дроб и сърцето. Във връзка с разпределението на ET-2 в различни органи част от изследователите се обединяват около становището, че ET-2 е по-слабо представен в сравнение с ET-1 в много органи с изключение на сърце, бял дроб и черва (De la Monte et al., 1995; Takizawa et al., 2005; Plumpton et al., 1996; Marciniak 1992). Експресия на ET-2 е установена и в бъбреци и яйчници (Karet and Davenport, 1996; Palanisamy et al., 2006). Анализът на публикуваните резултати показва, че разпределението на ET-2 в различни тъкани е свързано с роля в регулацията на определени функции. Например: механизмите, регулиращи функцията на яйчниците, включват ET-2. Документирана е ролята на този ендотелин по време на овулация и високите му концентрации през този период в кръвта (Ko et al., 2006; Ko et al., 2012). В подкрепа на тези проучвания са доказателствата, че гонадотропините повлияват концентрациите на ET-2 в яйчниците по време на овулация (Ling et al., 2013). Ролята на ET-2 в механизмите на репродукция и овулация е новост и дава направление за търсене на антагонисти или агонисти за съответни клинични състояния в акушерство и гинекологията.

Други нови факти, демонстриращи роля на ET-2 в регулацията на функции, са изследванията върху развитието на ретината, където се установява повишена експресия на този пептид и се допуска ролята му в протектиране на фоторецептори от светлинни увреждания (Braunger et al., 2013).

ФАРМАКОЛОГИЧНИ ЕФЕКТИ И НОВИ ТЕРАПЕВТИЧНИ СТРАТЕГИИ ВЪРХУ ЕНДОТЕЛНИ РЕЦЕПТОРНИ АНТАГОНИСТИ: НОВОСТИ ЗА ET_B РЕЦЕПТОР

Създадени са различни фармакологично активни средства – агонисти и антагонисти, за двата водещи рецептора за ендотелини: ET_A и ET_B. Тяхната експресия е установена и публикувана от колектив на Stéphanie Sauvageau (2009). Изследванията са извършени в условия на определяне на артериалните нива на ET-1 и модел на пулмонална резистентност на плъхове. Се-

лективни ET_A рецепторни антагонисти и неселективни ET_A/ET_B рецепторни антагонисти са проучени и е доказан техният инхибиращ ефект върху пулмоналната артериална резистентност при плъхове с експериментален модел на БАХ. С помощта на новите фармакологични средства е установен нов факт, свързан с ET_B рецептори. Публикувано е статистически значимо понижение на регулацията на ET_B рецептори в белодробните резистентни артерии на плъхове с експериментална БАХ. Изследванията върху този модел доказват направление за изучаване ролята на ET_B рецептори при вазоконстрикция с помощта на антагонисти. Понижената експресия на ET_B рецептори в белодробно резистентните артерии моделира фармакологичните отговори към вещества, които са антагонисти на ендотелинови рецептори. По-значима активност е получена при т.нар. двойни „рецепторни антагонисти“ (ET_A/ET_B), които редуцират по-значимо вазоконстрикцията в различни кръвоносни съдове, включително и белодробни артерии (Angus, J. и C. Wright, 2002). Проучванията върху селективни рецепторни антагонисти за ендотелинови рецептори, съответно фармакологични средства – антагонисти на ET_A , и фармакологични средства – антагонисти на ET_B , самостоятелно довеждат до по-малка ефективност върху вазоконстрикцията, причинена от ендотелин-1 (Sauvageau S. et al., 2007). В допълнение е установена редуцирана експресия на рецептори ET_B , която може да модифицира отговора на ET-1 от ендотелите на белодробните кръвоносни съдове. Съобщава се за редуциране на ET_B -рецепторната mRNA с 45% в белодробни хомогенати, взети от плъхове с експериментална БАХ (Gosselin R., 1997; Yorikane R., 1993). Посочената редуцирана експресия на ET_B рецепторите може да обясни резултатите от изследванията на различни рецепторни антагонисти за ендотелин (селективни и неселективни) върху ефектите на ET-1, съответно спазъм с резистентност на белодробните артерии при модел на БАХ при плъхове. Тази новост в научните изследвания дава направление за бъдещо приложение и подбор на селективни или неселективни антагонисти на рецепторите за

ендотелин в зависимост от индивидуалното състояние на пациента.

Новост в изследванията върху ET_B рецептори е установената им роля в механизми на хронична хипоксия. Доказано е, че при плъхове с дефицит на тези рецептори се променят показатели на белодробната хипертония в условия на хипоксия (Ivy et al., 2002). Тези изследвания насочват към дискусия за протективна роля на ET_B рецепторите при хипоксични състояния, включително и за артериалната реактивност при белодробна хипертония.

В допълнение ще посочим, че 2 фармакологични средства са проучени и се предлагат като терапевтична стратегия за блокиране на нежеланите ефекти на ендотелин при БАХ и други заболявания: антагонисти на рецептори за ендотелин, съответно селективен за ET_A рецептор (ambrisentan) и неселективен за двата подтипа рецептори (bosentan).

През последните години се създават и се проучват експериментално нови генерации на ET антагонисти. Съобщава се за високоселективен ETA рецепторен антагонист (sitaxentan) (Barst et al., 2004). За съжаление, високата хепатотоксичност, която бе доказана за това фармакологично средство, доведе до спиране на изследванията и внедряването в клиниката (Don et al., 2012). Риск от хепатотоксичност се доказва и при други новосинтезирани и проучвани селективни ETA рецепторни антагонисти. Въпреки този факт не спират усилията да се намерят ефективни антагонисти на ендотелини с цел да се намали смъртността при пациентите от БАХ. През последните години се посочва до 15% смъртност в различни държави от това заболяване, по-значима сред възрастните хора. Усилията във фармакологията и фармацевцията доведоха до създаване на нова генерация активни рецепторни антагонисти за ендотелин за орално приложение. Тези средства се създадоха чрез модифициране структурата на bosentan и увеличаване на неговата ефективност с намаляване на нежеланите лекарствени реакции (Bollí et al., 2012). Представител на тази нова група фармакологични средства е Macitentan (Opsumit, АСТ-064992). Установено е, че Macitentan е двоен антагонист и блокира ETA и ETB рецепторите. Преми-

нал е експерименти с клинични изследвания и третата фаза на клинични проучвания е завършена през 2012 г. (Pulido et al., 2013). Получил е разрешение от FDA на САЩ през 2013 г. за лечение на БАХ. Метаболизира се в черния дроб при участие основно на ензимите от група CYP3A4 и за разлика от другите антагонисти на ендотелини при Macitentan се получава метаболит, който е фармакологично активен. Характерно за този метаболит е, че има по-дълъг плазмен живот (Iglarz et al., 2008; Sidharta et al., 2011; Sidharta et al., 2013a; Sidharta et al., 2013b). Macitentan е с по-значима фармакологична активност и с по-малък риск от нежелани ефекти в сравнение с bosentan. Взети заедно, изследванията върху това ново фармакологично и терапевтично средство показват, че създаването и изучаването на антагонисти с блокиращо действие върху двата вида рецептори за ендотелини е съвременно и перспективно направление с надежда да се намали смъртността при белодробна артериална хипертония.

ЕПИГЕНЕТИЧНИ НОВИ ФАКТИ ЗА РЕГУЛАЦИЯ НА ЕНДОТЕЛИНИ И ТЕХНИ РЕЦЕПТОРИ

Епигенетиката е съвременно направление на изучаване на човешкия геном, което допълва данните за унаследяване на определени заболявания, свързани с промени в гените. При епигенетичните промени се извършват химични реакции, които засягат хроматина и са на ниво на хистони (метиране, ацетиране, фосфорилиране и др.) или на ниво на ДНК метилиране (хипометилиране или хиперметилиране), както и на ниво на транскрипционни фактори и посттранскрипционни протеини. Нови и оскъдни са изследванията за епигенетична регулация на ендотелини. Документирани са промени в гена EDN1 чрез модификация на хистони и ДНК метилиране, които имат роля в регулация на ET-1 (Welch et al., 2013). Допуска се, че епигенетични механизми чрез ДНК метилиране повлияват гена, свързан с апоптоза в някои тумори при участие на ET_B рецептори. В подкрепа на това твърдение са изследванията върху някои видове тумори, като меланом и олигодендроглиом, при които са установени епигенетични механизми

на инактивиране на ET-2 и ET-3 mRNA и протеини в тумори (Bagnato et al., 2011). Установено е хиперметиране на 2 гена – EDN2 и EDN3. Факторите, които предизвикват епигенетични изменения, са свързани с влияния от околната среда. Съобщава се за ролята на нарушеното хранене на майката и на фетуса по време на бременност и по-честото срещане на епигенетични промени при новородени от гладували майки. Документирани са повишени нива на ацетиране на хистони в механизмите на действие на ET-1. Таргет за нарушения в ацетирането е хистон-3 (H3). Макар и оскъдни, новите факти за епигенетични механизми в програмирането на ендотелини и техните рецептори дават ново направление в изучаване патогенезата на БАХ и търсене на епигенетични фармакологични средства, които да се приложат при съответно епигенетично нарушение. С методите на епигенетиката се доказва, че има риск от модификации на хистони, промени във физиологичното ДНК метилиране за възникване на БАХ и съответно за ролята на ендотелини в патогенезата и клиниката на заболяването.

Чрез епигенетичните проучвания се осветли и новост в характеристиките на ET_B рецептори относно тяхната роля в туморогенезата и унаследяването на гени, отговорни за различни тумори. Това също е ново и бъдещо направление в изучаването на ендотелините и техните рецептори с приложение на знанията в клиничната практика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Откриването на ET-1 през 1988 г. се натрупаха значими експериментални и клинични изследвания върху механизмите на действие и фармакологията на ендотелините, изолираха се техните рецептори и се създадоха лекарства за лечение на белодробна артериална хипертония. При човека се документира разликата между ET-2 с две аминокиселини от ET-1, както и разликата с 6 аминокиселини на ET-3 от ET-1. Изолираха се рецепторите за ендотелини в основните два подтипа: ETA и ETB. Беше изолирано семейство пептиди от змийска отрова (Takasaki C. et al., 1988) и от тях се

създаде и първият селективен агонист на ЕТВ рецепторите sarafotoxin S6C (William et al., 1991). Доказа се, че ЕТ-1 е най-честата изоформа на ендотелини в сърдечно-съдовата система на човек, че ЕТ-1 се освобождава от ендотелните клетки и има силно и продължително вазоконстрикторно действие върху кръвоносните съдове. Стотици публикувани изследвания утвърждават ролята на ЕТ-1 в регулацията на кръвоносните съдове на много органи и системи, както и ролята му в патогенеза на силно рисково за живота заболяване, каквото е белодробната артериална хипертония. В представения анализ на най-нови факти за ендотелини е посочен прогресът върху изследването на нови пептиди, антагонисти на ендотелини, епигенетични характеристики на ендотелин и неговите рецептори. Съвременни проучвания подкрепят развитието на направление във фармакологията за създаване и клинично приложение на антагонисти за рецепторите на ендотелини в лечението на белодробна артериална хипертония. Фокусирано е върху важна стратегия на създаването на нови антагонисти на двата вида ЕТА и ЕТВ рецептори, която дава надежда за бъдещи ефективни лекарства за лечение на БАХ и за лечение на тумори.

В заключението ще добавим, че има и друга съвременна фармакологична стратегия в изследванията върху ендотелини, която е свързана с инхибиране на ендотелин-конвертиращи ензими-1. Бъдещи изследвания ще документират възможностите за клинично изпитване на инхибитори на посочените ензими при лечение на заболявания, свързани с вазоконстрикция.

Библиография

1. Michel, R. P., D. Langleben et J. Dupuis. The endothelin system in pulmonary hypertension. – *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **81**, 2003, 542-554.
2. Miyauchi, T. et al. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. – *Circ. Res.*, **73**, 1993, 887-897.
3. Jasmin, J. F., P. Cernacek et J. Dupuis. Activation of the right ventricular endothelin (ET) system in the monocrotaline model of pulmonary hypertension: response to chronic ETA receptor blockade. – *Clin. Sci. (Lond)*, **105**, 2003, 647-653.

4. Alexander, S. P., A. Mathie et J. A. Peters. Guide to receptors and channels (GRAC), 3rd edition. – *Br. J. Pharmacol.*, **153**, 2008, (Suppl. 2), S1-209.
5. Yuzgulen, J. et al. Characterisation of the 'endothelin-like domain peptide' (ELDP) co-synthesised with endothelin-1 from the EDN1 gene. – *Life Sciences*, 2013, 93.
6. Cade, C. et al. Lack of biological activity of preendothelin [110-130] in several endothelin assays. – *Life Sci.*, **47**, 1990, 2097-2103.
7. Chang, I. et al. Endothelin-2 deficiency causes growth retardation, hypothermia, and emphysema in mice. – *J. Clin. Invest.*, **123**, 2013, 2643-2653.
8. de la Monte, S. M. et al. Regional and maturation-associated expression of endothelin 2 in rat gastrointestinal tract. – *J. Histochem. Cytochem.*, **43**, 1995, 203-209.
9. Takizawa, S. et al. Differential expression of endothelin-2 along the mouse intestinal tract. – *J. Mol. Endocrinol.*, **35**, 2005, 201-209.
10. Plumpton, C. et al. Expression of endothelin peptides and mRNA in the human heart. – *Clin. Sci. (Lond)*, **90**, 1996, 37-46.
11. Marciniak, S. J. et al. Localization of immunoreactive endothelin and proendothelin in the human lung. – *Pulm. Pharmacol.*, **5**, 1992, 175-182.
12. Karet, F. E. et A. P. Davenport. Localization of endothelin peptides in human kidney. – *Kidney Int.*, **49**, 1996, 382-387.
13. Palanisamy, G. S. et al. A novel pathway involving progesterone receptor, endothelin-2, and endothelin receptor B controls ovulation in mice. – *Mol. Endocrinol.*, **20**, 2006, 2784-2795.
14. Ko, C. et al. Endothelin-2 in ovarian follicle rupture. – *Endocrinology*, **147**, 2006, 1770-1779.
15. Ko, C., R. Meidan et P. J. Bridges. Why two endothelins and two receptors for ovulation and luteal regulation? – *Life Sci.*, **91**, 2012, 501-506.
16. Braunger, B. M. et al. Constitutive overexpression of Norrin activates Wnt/beta-catenin and endothelin-2 signaling to protect photoreceptors from light damage. – *Neurobiol. Dis.*, **50**, 2013, 1-12.
17. Sauvageau, S1. Et al. Change in pharmacological effect of endothelin receptor antagonists in rats with pulmonary hypertension: role of ETB-receptor expression levels. – *Pulm. Pharmacol. Ther.*, **22**, 2009, № 4, 311-317.
18. Sauvageau, S. et al. Endothelin-1-induced pulmonary vasoreactivity is regulated by ET(A) and ET(B) receptor interactions. – *J. Vasc. Res.*, **44**, 2007, 375-381.
19. Angus, J. et C. Wright. The endothelin system in cardiopulmonary diseases. Allschwil, Switzerland: Friedrich Reinhardt Verlag. Endothelin and the sympathetic nervous system; 2002, 97-125.
20. Gosselin, R. et al. Endothelin receptor changes in hypoxia-induced pulmonary hypertension in the newborn piglet. – *Am. J. Physiol.*, **273**, 1997, L72-79.
21. Yorikane, R. et al. Altered expression of ETB-receptor mRNA in the lung of rats with pulmonary hypertension. – *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **22**, 1993, (Suppl. 8), S336-338.
22. Ivy, D. D. et al. Exaggerated hypoxic pulmonary hypertension in endothelin B receptor-deficient rats. – *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **282**, 2002, L703-712.
23. Barst, R. J. et al. Sitaxsentan therapy for pulmonary arterial hypertension. – *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **169**, 2004, 441-447.

24. Don, G. W. et al. Ironic case of hepatic dysfunction following the global withdrawal of sitaxentan. – Intern. Med. J., **42**, 2012, 1351-1354.
25. Bolli, M. H. et al. The discovery of N-[5-(4-bromophenyl)-6-[2-[(5-bromo-2-pyrimidinyl)oxy]ethoxy]-4-pyrimidinyl]-N'-p ropylsulfamide (Macitentan), an orally active, potent dual endothelin receptor antagonist. – J. Med. Chem., **55**, 2012, 7849-7861.
26. Pulido, T. et al. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. – N. Engl. J. Med., **369**, 2013, 809-818.
27. Iglarz, M. et al. Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist. – J. Pharmacol. Exp. Ther., **327**, 2008, 736-745.
28. Sidharta, P. N. et al. Macitentan: entry-into-humans study with a new endothelin receptor antagonist. – Eur. J. Clin. Pharmacol., **67**, 2011, 977-984.
29. Sidharta, P. N. et al. Pharmacokinetics of the novel dual endothelin receptor antagonist macitentan in subjects with hepatic or renal impairment. – J. Clin. Pharmacol., **55**, 2013, 291-300.
30. Sidharta, P. N., P. L. van Giersbergen et J. Dingemans. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of macitentan, an endothelin receptor antagonist, in an ascending multiple-dose study in healthy subjects. – J. Clin. Pharmacol., **54**, 2013, 291-300.
31. Welch, A. K. et al. Early progress in epigenetic regulation of endothelin pathway genes. – Br. J. Pharmacol., **168**, 2013, 327-334.
32. Bagnato, A. et al. Role of the endothelin axis and its antagonists in the treatment of cancer. – Br. J. Pharmacol., **163**, 2011, 220-233.
33. Takasaki, C. et al. Sarafotoxins S6: several isotoxins from *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp) venom that affect the heart. – Toxicon, **26**, 1988, 543-548.
34. William, D. L. et al. Sarafotoxin S6c, an agonist which distinguishes between endothelin receptor subtypes. – Biochem. Biophys Res. Commun., **175**, 1991, 556-561.

✉ *Адрес за кореспонденция:*

Д-р Георги Асенов Богданов
 Катедра по фармакология и токсикология
 Медицински факултет
 Медицински университет
 ул. Здраве № 2
 1341 София
 e-mail: dr.georgi.bogdanov@mail.bg
 GSM: 0889501994

✉ *Address for correspondence:*

Dr. Georgi Asenov Bogdanov, MD
 Department of Pharmacology and Toxicology
 Medical Faculty
 Medical University
 2 Zdrave, str.
 Bg – 1341 Sofia
 e-mail: dr.georgi.bogdanov@mail.bg
 GSM: 0889501994