

## СИСТЕМА ЭНДОТЕЛИНОВЫХ ПЕПТИДОВ: МЕХАНИЗМЫ КАРДИО-ВАСКУЛЯРНЫХ ПАТОЛОГИЙ

ГОМАЗКОВ О. А.

НИИ Биомедицинской химии РАМН: 119832 Москва, Погодинская 10;  
факс:(095) 245-08-57; e-mail: inst@ibmh.msk.su

Представлена информация о биохимии "семейства" эндотелинов (ЕТ) - группы самих изопептидов, их предшественников, ферментов метаболизма, а также сведения о топографической фармакологии специфических ЕТ-рецепторов и большом спектре физиологических реакций "в норме", которые рассматриваются как основа для оценки роли эндотелинов в генезе патологий вазокардиального профиля. Огромный пласт экспериментальных и клинических работ, посвященных ЕТ, демонстрирует его "вездесущую" активность, связанную, в первую очередь, с эндотелием и гладкой мускулатурой сосудов практически всех органов (включая сердце, легкие, мозг, репродуктивную систему и надпочечники), что определяет широкий спектр эндотелин-зависимых патологий. Анализируется новейшая информация по биохимии, экспериментальной и клинической патологии эндотелиновых пептидов, современные концепции их значимости для физиологии "нормальных" и патологических процессов, а также способы фармакологической коррекции этих патологий.

**Ключевые слова:** эндотелин, эндотелин-превращающий фермент, рецепторы, кардио-васкулярная патология, фармакологическая коррекция

**ВВЕДЕНИЕ.** В ряду физиологически значимых регуляторных пептидов в последние годы резко увеличился интерес к эндотелину. Открытый 10 лет назад как эндотелиновый фактор с высокой вазомоторной активностью [1], он стал объектом огромного числа исследований, которым только в 1998 году было посвящено более тысячи научных публикаций. Большинство из них рассматривают роль эндотелина-1 и его изоформ в широком спектре кардиоваскулярных патологий.

Эндотелин-1 оказывается причастным к ишемической болезни сердца, острому инфаркту миокарда, нарушениям ритма сердца, легочной и системной гипертензии, атеросклеротическим повреждениям сосудов, специфическим сосудистым нарушениям (рестеноз вследствие коронарной ангиопластики), постродовых сосудистых осложнениях, почечной патологии (васкулярном гломерулонефрите), ишемическим повреждениям мозга (субарахноидальная геморрагия), диабету и др.

Большой интерес к клиническому исследованию эндотелинов, граничащий с ажиотажем, выражается подчас в заголовках научных публикаций типа: "Антагонисты рецептора эндотелина: сердечные препараты будущего?"; "Эндотелин-1: курьез ученых или реальный виновник ишемической болезни сердца?"; "Артериальная стенка: новая фармакологическая и терапевтическая мишень" и др. Эндотелин рассматривается как маркер и предиктор тяжести и исхода этих патологий [2], чем в значительной мере может быть объяснен практический интерес: определения содержания пептида в крови и тканях, исследования активности

ферментов метаболизма, экспрессии и специфичности рецепторов, поиска селективных антагонистов и ингибиторов эндотелин-специфичных пептидаз.

Огромность представленного выше списка эндотелин-сопряженных патологий может быть объяснена только одним обстоятельством: эндотелин является одним из важнейших регуляторов функционального состояния эндотелия, морфологически сопряженного с кровью, с одной стороны (в буквальном смысле), и с мышечной стенкой сосудов, с другой. Эндотелий - это уникальное "эндокринное дерево" [3], выстилающее абсолютно все регионы сосудистой системы организма. Здесь синтезируются многие вазоактивные субстанции, определяющие его функциональный статус, влияющие на тонус гладкой мускулатуры сосудов, а также сопряженные с активностью других вазоактивных пептидных и непептидных соединений.

#### *Биохимия и фармакология эндотелиновой системы.*

Эндотелин представляет собой крупный бициклический полипептид, составленный комбинацией 21 аминокислоты. Помимо эндотелина-1 (ЕТ-1), известны две его изоформы - эндотелины -2 и -3, отличающиеся друг от друга некоторыми вариациями в аминокислотной последовательности (рис 1). ЕТ-1 и ЕТ-3, повидимому, секретируются различными клетками. Если ЕТ-1 в большинстве случаев образуется в эндотелиальных клетках, изоформа ЕТ-3 обнаружена в мозге, что позволило рассматривать ее в качестве нового нейропептида с еще непонятными функциями [4].

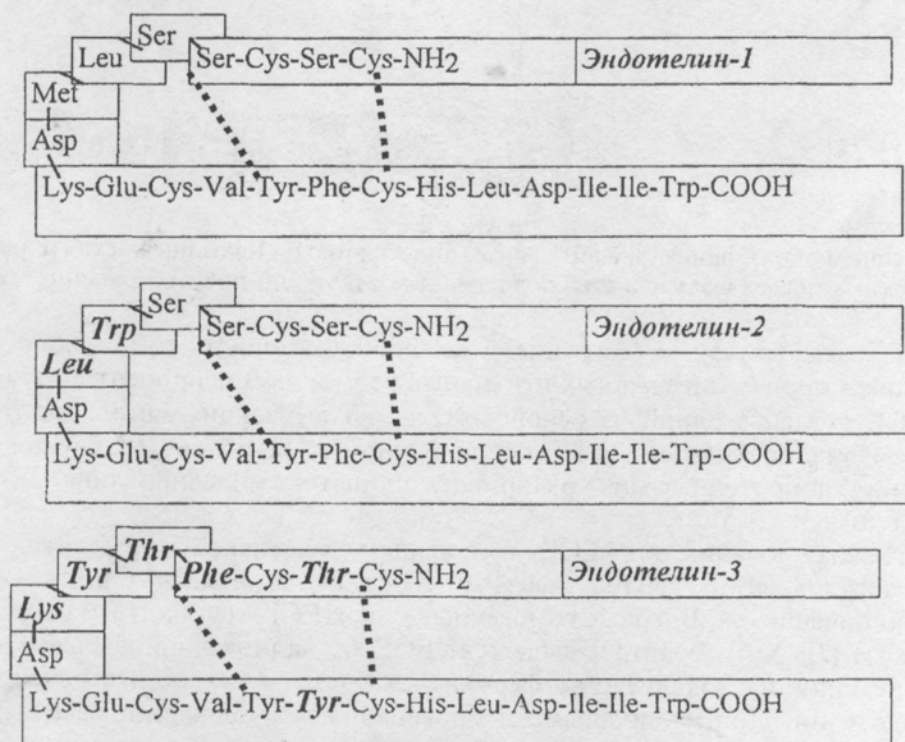


Рисунок 1.

Строение изопептидов: эндотелина-1, -2 и -3. Выделены аминокислотные остатки в структуре ЕТ-2 и ЕТ-3, отличающиеся от ЕТ-1.

#### *Эндотелин-превращающий фермент*

ЕТ-1 образуется в результате ограниченного протеолиза из "большого эндотелина" ("Big endothelin" /В-ЕТ/), молекулы включающей 38 аминокислотных остатков, под влиянием эндотелин-превращающего фермента (endothelin-converting enzyme, ЕСЕ) (рис. 2). Биосинтез указанных эндотелинов происходит при гидролизе

соответствующих "изопредшественников": В-ЕТ-1, -2 и -3 служат основными субстратами для ЕСЕ. В препаратах эндотелиальных клеток человека из пупочной вены соотношение гидролиза этих предшественников составляет, соответственно, 40:2,5:1 [5].

#### Пре-про-ЕТ-1[1-212]

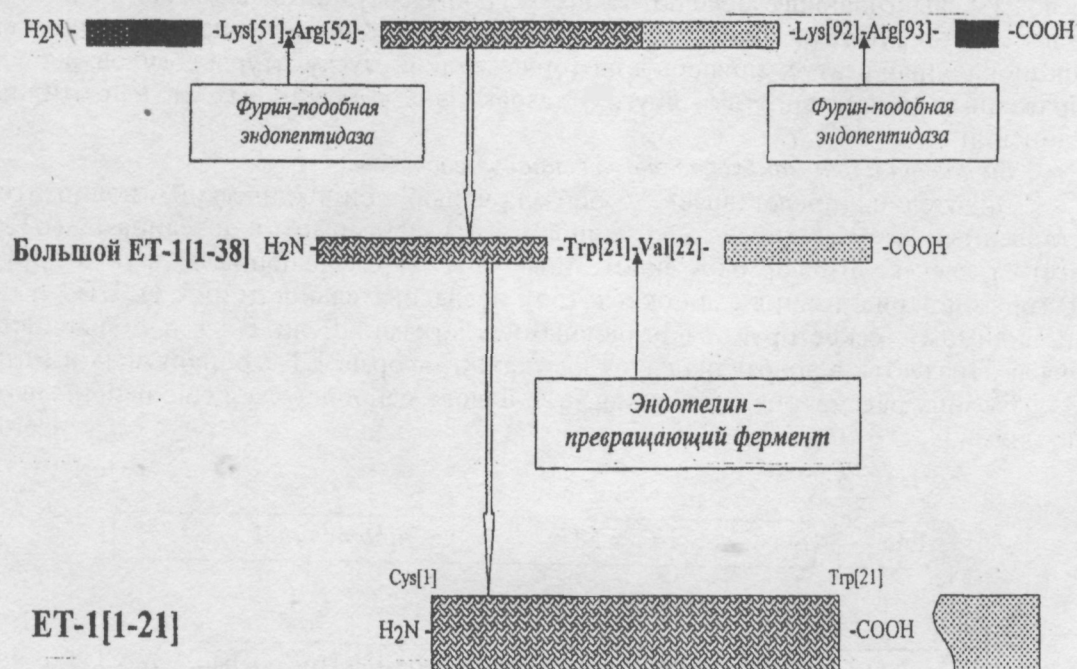


Рисунок 2.

Процессинг и образование "зрелой" формы эндотелина-1. Показаны места гидролиза аминокислотных последовательностей под влиянием эндотелин-процессирующих пептидаз.

ЕСЕ относится к группе мембраносвязанных металлопротеиназ, участвующих в процессинге многих пептидных гормонов и нейропептидов. По ряду свойств ЕСЕ сходен с одной из основных  $Zn^{2+}$  - содержащих металлопротеиназ - нейтральной эндопептидазой 24.11 (неприлизинном). На основе сравнения ЕСЕ с другими металлопротеиназами предпринята попытка моделирования активного центра ЕСЕ [6].

Выявлена локализация ЕСЕ в большинстве тканей млекопитающих: в эндотелии сосудов легких, сердца, почек, мозга, плаценты, а также в поджелудочной железе и надпочечниках. Впервые гомогенный белок ЕСЕ был получен из микросом легких крысы [7]. Хи и соавт.[8] выделили ЕСЕ из надпочечников быка, впервые обратив внимание на локализацию фермента в секреторных тканях другого типа, нежели эндотелий. Почти одновременно появившиеся публикации рассматривают ультрамикроскопическую локализацию ЕСЕ. Обнаружено, что фермент находится как на клеточной поверхности эндотелиальных клеток сосудов, так и внутри эндотелиальных везикул; при этом возможна рециклизация его с поверхности внутрь эндотелия [9]. Иммуофлюоресцентная микроскопия демонстрирует, что изоформа ЕСЕ-1a расположена преимущественно на поверхности клеток, тогда как отличающийся от него ЕСЕ-1b - внутриклеточно, будучи колокализированным с транс-Гольджи маркерным белком [10]. Эти данные расходятся с наблюдениями [11], представляющим ЕСЕ-1a как внутриклеточный, "по видимому интравезикулярный" фактор образования ЕТ-1. Сканирующая электронная микроскопия подтверждает,



что В-Т-1 гидролизует обеими изоформами ЕСЕ-1 в гранулах эндотелия пупочной вены человека [12].

Интересно наблюдение [13], где показано, что ЕТ-1 способен подавлять экспрессию мРНК ЕСЕ-1 в эндотелиальных клетках легких, демонстрируя возможность обратной регуляции процесса биогенеза ЕСЕ-1.

Подробный обзор литературы по ЕСЕ и его функциональной значимости опубликован ранее [14].

Предпринята попытка установить соответствие тканевой локализации (экспрессии) ЕСЕ, его субстрата - В-ЕТ-1 - и самого ЕТ-1. С помощью иммунохимического подхода в микросомальных фракциях тканевых препаратов сердца, надпочечников, легких, мозга и в изолированных эндотелиальных клетках было установлено соответствие указанных биохимических компонентов в большинстве исследованных васкулярных тканей, а также в бронхиальных эпителиальных клетках, глиальных образованиях, в нейронах кортекса [15].

Как и большинство пептидаз, ЕСЕ, вероятно, может участвовать в метаболизме других физиологически значимых пептидов. Фермент из трансфицированных клеток яичника хомячка гидролизовал брадикинин по связи Pro[7]-Phe[8]. Эта реакция тормозилась фосфорамидоном, ЭДТА, но не тиорфаном [16]. Более детальный анализ выявил, что ЕСЕ-1, в противоположность неприлизину, обладал минимальной активностью в отношении небольших олигопептидов (лей-энкефалин), однако эффективно расщеплял нейротензин, вещество Р, брадикинин и бета-цепь инсулина [17]. Эти результаты свидетельствуют о возможном участии ЕСЕ в метаболизме пептидов более широкого спектра физиологической активности.

С помощью "сэндвич-ELISE" получены моноклональные антитела к ЕСЕ-1 [18].

#### *Рецепторы эндотелинов*

Образование ЕТ-1 происходит в эндотелиальных клетках, как на поверхности, так и внутри клеточной мембраны эндотелия, а также на поверхности подлежащих гладкомышечных клеток. ЕТ-1 действует паракринным способом на рецепторы гладких мышц сосудов, вызывая их сокращение и рост, и аутокринно-/паракринным способом на эндотелиальные клетки, вызывая продукцию вазорелаксантов и рост-стимулирующих факторов - NO и простагличина [19].

Идентифицированы несколько подтипов рецепторов, специфически связывающих эндотелины: ЕТА - рецептор, локализованный в гладкой мускулатуре сосудистых клеток, и обладающий большей аффинностью по отношению к ЕТ-1 и -2, нежели к ЕТ-3. ЕТА рецепторы были клонированы, для них установлена аминокислотная последовательность и трансмембранное расположение активных участков. ЕТВ подтип, детектированный фармакологическими методами, не имеет предпочтительности по отношению к изоформам ЕТ и экспрессируется преимущественно в эндотелиальных клетках [20]. Однако ныне установлены два вида ЕТВ рецепторов [21]. Все три подтипа эндотелиновых рецепторов разнообразно локализованы в сосудистой системе: ЕТА рецепторы обнаруживаются преимущественно в гладкой мускулатуре сосудов, опосредуя вазоконстрикторный эффект лиганда; ЕТВ1 подтип обнаруживается в эндотелиальных клетках сосудов, участвуя в эндотелий-зависимой вазодилатации; присутствующие в гладкой мускулатуре ЕТВ2 рецепторы опосредуют вазоконстрикторный эффект.

Иммунохимические и электронномикроскопические исследования конкретизируют тканевую локализацию подтипов эндотелиновых рецепторов. ЕТА рецепторы присутствуют в гладких мышцах коронарных артерий и в кардиомиоцитах. ЕТВ рецепторы определяются преимущественно в дистальной части коронарных сосудов [22-24]. Эта информация оказывается существенной с учетом типа активируемого пострецепторного процесса, в результате которого



происходит непосредственный или сопряженный с высвобождением "вторичных" дилататоров (NO, простаглицлин, эндотелиальный ростовой пептид) физиологический ответ.

Взаимодействие каждого подтипа рецептора с лигандом запускает свойственный ему каскад сигнальных реакций с вовлечением варьирующих систем вторичных посредников. ET-1 через ETA рецепторы, включает цепь процессов, среди которых активированная G-белками фосфатидилинозитол-специфичная фосфолипаза C играет, повидимому, основную роль. Оба вторичных посредника - инозитолт - 1,3,5-трифосфат и диаглицерол - ответственны за реализацию трансмембранного сигнала. Последующие реакции приводят к изменению концентрации  $Ca^{2+}$  в цитозоле и его пассажу через соответствующие каналы мембраны (рис. 3). Эффекты ET-2, опосредованные ETA рецепторами, оказываются количественно сходными - в противоположность действию изопептида ET-3.

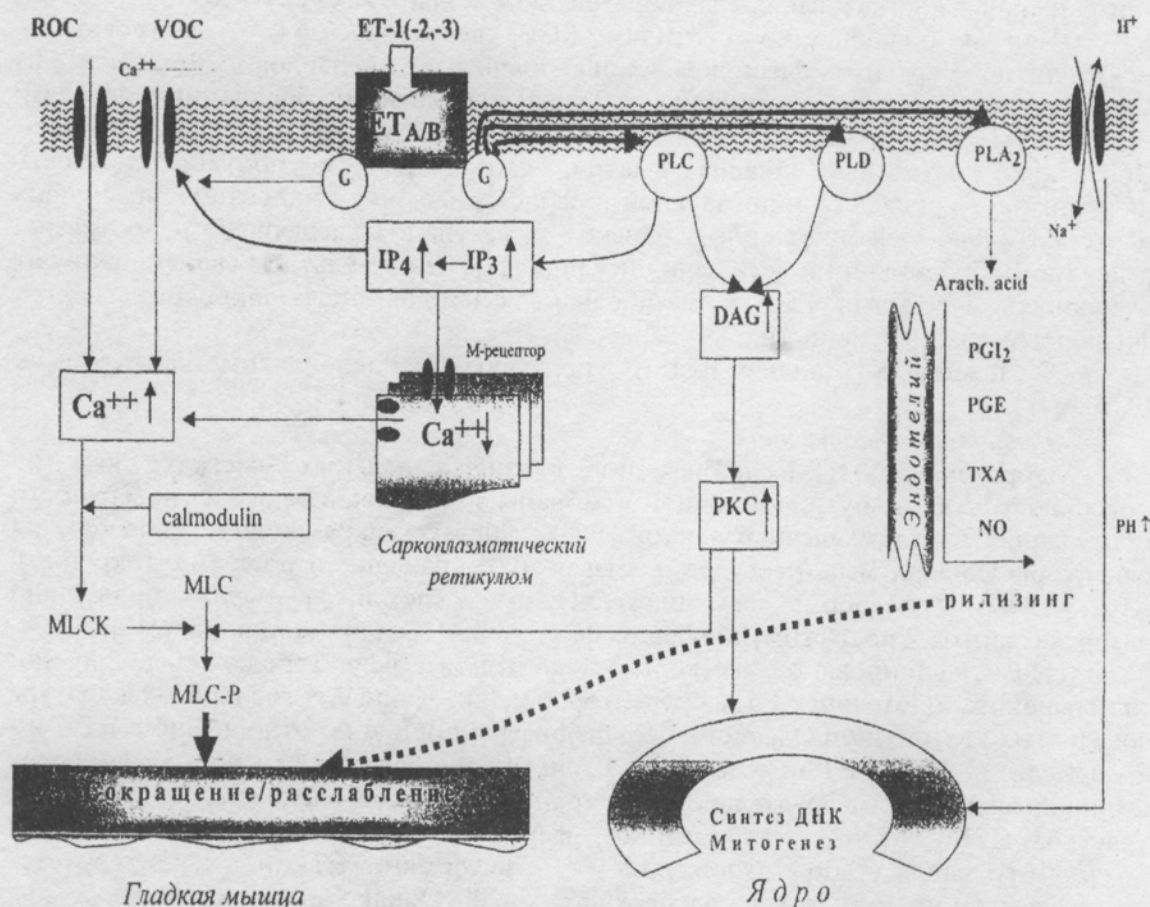


Рисунок 3.

Система трансдукторных процессов, опосредующих физиологические эффекты эндотелинов (по Rubanui and Polokoff, 1994 [85], модифицировано). Обозначения: ET-1 (-2,-3) - эндотелин-1 (-2,-3); ETA/B - рецепторы эндотелина; ROC - рецептор-зависимый  $Ca^{2+}$  канал; VOC - низковольтный  $Ca^{2+}$  канал; PLC (PLD, PLA2) - фосфолипазы (соответственно, -C,-D,-A2); IP3 - 1,4,5-инозитолтрифосфат; IP4 - 1,3,4,5-инозитолтетрафосфат; DAG - 1,2-диаглицерол; PKC - протеникиназа C; PGE, PGI2, TXA - простагландины арахидонового каскада; MLC - легкая цепь миозина (myosin light chain); MLCK - киназа легких цепей миозина.

Однако, вызываемая ET-1 клеточная пролиферация, включающая фосфорилирование тирозина, сопряжена с участием тирозинкиназы и G-белка ETA-рецептора. Такой путь индуцированных вторичных посредников реализует митогенную функцию ET-1. Изопептид ET-3, чья аффинность для ETA рецептора

оказывается низкой, реализует свои эффекты, соединяясь с ЕТВ рецептором, запуская активацию фосфатидилинозитол-специфичной фосфолипазы С; последующая аккумуляция циклического ГМФ при участии окиси азота приводит к вазодилаторному эффекту пептида.

В целом, многообразие функций ЕТ-1, как модулятора тонуса сосудов, клеточного роста, пролиферации, митогенеза, релизига гормонов из надпочечников и др. может быть объяснено наличием различных сигнальных (трансдукторных) механизмов. Помимо приведенных выше сведений, ЕТ-1 активирует эффекторные системы, включая фосфолипазы С, -D, -A(2), аденилат- и гуанилатциклазы и цитозольно/ядерные протеинкиназы. Эти процессы связаны с активностью различных подтипов эндотелиновых рецепторов, включающими соответствующие эффекторные системы. Подробно эти сведения представлены в обзоре [25].

Тот факт, что подтипы эндотелиновых рецепторов обнаруживаются во многих тканях и в различной плотности, может объяснить широкую вариабельность эффектов, связанных с регулирующей или патогенетической функцией эндотелинов. Представленные выше изоформы эндотелина вносят большое разнообразие в реализацию тонкой "механики" ЕТ-зависимых процессов в норме и при патологии, иллюстрацией которых является по сути всё последующее изложение.

Важная информация была получена на основе концепции молекулярного узнавания, которая позволяет приблизиться к пониманию эволюции молекулярных взаимоотношений функционально значимых пептидов. В исследованиях [26] на базе структурного анализа клонов кДНК для ангиотензина II и ЕТ-1 получена информация, выделяющая сайты связывания ЕТ-1. Выяснение общей генной структуры рецепторов ангиотензина II и ЕТ-1 является исходной молекулярной основой установления функциональной связи этих пептидных систем в организме. Предполагается, что места связывания регуляторных пептидов и экспрессии соответствующих рецепторов были эволюционно запрограммированы и определяются соответствующими комплементарными участками ДНК генома.

Эндотелины расцениваются как наиболее сильные из известных ныне соединений вазоконстрикторного действия. В большинстве исследований при внутривенном болюсном введении или при инфузии концентрации, для которых можно получить заметные изменения системного АД, находятся в диапазоне  $10^{-10}$  -  $10^{-8}$  М. Хотя, возможны диаметрально противоположные реакции при использовании суперминимальных доз в  $10^{-14}$  моля на кг.

Эффекты эндотелинов сопряжены с высвобождением из эндотелия известных вазорелаксаторов - оксида азота, простаглицлина и натрийуретического пептида предсердий (ANP). ЕТ-1, действуя на ЕТА рецепторы, тормозит синтез NO в сосудах, стимулированных бета-1-интерлейкином [27].

Отдельно следует отметить информацию о роли ЕТ-1 в качестве апоптоз-супрессирующего фактора. В культуре клеток эндотелия из аорты крысы, подвергнутых спровоцированному апоптозу, дозы ЕТ-1  $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  М увеличивали их выживаемость; специфичность действия ЕТ-1 контролировалась антагонистом ЕТВ (но не ЕТА) рецепторов. Эти сведения указывают на возможно новую роль эндотелина как клеточного физиологического регулятора [28].

#### *Влияние эндотелина на систему крови*

Тромбин стимулирует синтез и секрецию ЕТ-1. На препаратах эндотелиальных клеток из пупочной вены и легочной артерии доза тромбина 4 U/ml стимулировала секрецию ЕТ-1 и экспрессию мРНК препроЕТ-1 в течение 1-2 часов. Поскольку ингибиторы тирозинкиназы гербимицин А и генистеин тормозили эти процессы, сделан вывод о протеинкиназном механизме эффекта тромбина [29]. Тромбин экспрессировал также мРНК эндотелин-превращающего фермента (ЕСЕ-1) и увеличивал активность самого фермента в культуре эндотелия крысы.



Представленный механизм ET-стимулирующего эффекта тромбина был подтвержден в исследованиях с геном ET-1 [30].

На культуре эндотелиальных клеток сосудов выявлено стимулированное нативными тромбоцитами высвобождение ET-1; этот эффект непосредственно связан с активацией опухолевого рост-трансформирующего бета-фактора (TGF-beta) [31]. В суспензии тромбоцитов человека ET-1 увеличивал релизинг  $Ca^{2+}$ . Этот процесс, включающий инозитол-опосредованную активацию циклического ГМФ и увеличение уровня  $Ca^{2+}$ , определяет пути возможного влияния эндотелина на механизмы тромбоцитарного гемостаза [32,33].

ET-1 и ET-3 тормозили синтез тканевого активатора плазминогена в культуре гладкомышечных сосудистых клеток человека и, напротив, увеличивали активность PAI-1 (ингибитора активатора плазминогена) [34]. Однако, при длительной (до 6 часов) инфузии ET-1 здоровым добровольцам не обнаружено какого-либо влияния пептида на показатели свертывающей и фибринолитической систем крови (включая такие маркеры эндотелиальной дисфункции, как фактор Виллебранда и тромбомодулин) [35].

#### *Эндотелин и патологии сердца*

ET-1, предшественник его синтеза и рецепторы обнаружены как в эндотелии коронарных сосудов, так и в ткани самого миокарда.

Повреждения эндотелия, обусловленные химическими, микробными или физическими воздействиями, способствуют развитию атеросклероза; в этот процесс оказываются вовлеченными ростовые пептидные факторы, цитокины, компоненты фибринолитической системы крови и гемокоагуляции, ведущие к миграции и пролиферации гладкомышечных клеток. Важными в этих процессах оказываются синтезируемые в эндотелии вазодилататоры - простациклин, кинины, NO и эндотелиальный фактор гиперполяризации клеток. Роль NO сводится к торможению ростового процесса и миграции клеток; в сочетании с простациклином этот фактор участвует в предупреждении атеро- и тромбогенеза, снижая агрегацию и адгезию пластинок. Комплекс этих процессов оказывается связанным с функцией вазоконстрикторных пептидов - ангиотензина II и эндотелина-1, обладающих, напротив, протромбогенной и рост-прототирующей активностью.

Поэтому современная терапевтическая стратегия в отношении коронарной патологии фокусируется на удержании или восстановлении равновесия перечисленных эндотелиальных факторов. В частности, нитрат-содержащие препараты компенсируют дефицит эндогенного NO, антагонисты  $Ca^{2+}$  "сдерживают" активность ангиотензина II и ET-I на уровне гладких мышц сосудов, облегчая вазодилаторный эффект NO. Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, помимо снижения синтеза ангиотензина II, препятствуют энзиматической деградации кининов, что ведет также к повышению релизинга эндотелиального NO. Активно вводимые в кардиотерапию антагонисты рецепторов эндотелинов являются еще одним средством восстановления эндотелиального дисбаланса при сердечно-сосудистой патологии. В целом, согласно изложенной здесь программы [36], перечисленные препараты ограничивают действие одних эндотелиальных факторов, компенсируют дефицит других и восстанавливают таким образом их функциональный баланс.

Эта позиция соответствует постулируемой [37] теории функциональной гетерогенности коронарных сосудов, регулируемой присутствующими в эндотелии, тучных клетках и миоцитах химическими посредниками. Среди них указываются фактор роста фибробластов (FGF), эндотелин, гепарин, участвующие в координации вазомоторных эффектов коронарного русла.

Следствием нарушений метаболизма и сократительной функции миокарда становятся изменения сердечного ритма, приводящие к развитию фибрилляций. Быстрое повышение содержания ET-1 в коронарном русле может стать причиной



такой патологии. В экспериментах на крысах вызванная перевязкой коронарной артерии ишемия сопровождалась развитием аритмий, которые блокировались применением антагонистов ЕТА и ЕТВ рецепторов [38]. Экспрессия больших количеств эндогенного ЕТ-1 из "большого предшественника" приводила к развитию вентрикулярной аритмии (модель легкое/изолированное сердце по Лангендорфу). Ингибитор эндотелин-превращающего фермента фосфорамидон полностью подавлял вазоконстрикцию и нарушения ритма [39].

У больных с кардиопатологией отмечаются изменения активности эндотелин-превращающего фермента. При инфаркте миокарда обнаружена повышенная активность ЕСЕ-1, по сравнению с пациентами, не страдающими сердечной патологией. Реакция на метопролол выявила пониженную экспрессию мРНК ЕСЕ-1 в левом предсердии [40]. Повышенное конвертирование В-ЕТ-1 обнаружено в артериях пациентов, страдавших коронарным атеросклерозом [41]. Повреждение интимы коронарных сосудов, ведущее к развитию атеросклероза, также сопровождалось экспрессией ЕСЕ-1 и локальным синтезом пептида. Размеры неоинтимы уменьшались при введении крысам фосфорамидона [42]. В ткани правого предсердия человека выявлена экспрессия гена ЕТ-2, изопептида, изученного еще очень мало [43].

В экспериментах с альфа(1)-адреностимулятором фенилэфрином, который вызывал гипертрофию кардиомиоцитов крысы, обнаружена повышенная экспрессия мРНК ЕСЕ-1; ингибитор ЕСЕ FR901533 тормозил стимулированный адреномиметиком синтез белка в миоцитах, но не влиял на экспрессию натрийуретического пептида предсердий. Выявляется, таким образом, молекулярный механизм ЕТ-стимулируемой гипертрофии, связанной с генной транскрипцией тяжелой цепи бета-миозина [44].

Известно, что при острой ишемии миокарда уровень ЕТ-1 в системной крови значительно увеличивается. Содержание пептида, в основном, коррелирует с тяжестью патологического процесса. У пациентов с острым инфарктом миокарда уровень ЕТ-1 служит предиктором исхода заболевания. Содержание В-ЕТ-1 в плазме крови соответствует прогнозу годичной смертности, являясь в этом случае показателем более достоверным, чем содержание норадреналина, ANP или показателя эхокардиограммы [45,46]. Содержание в крови предшественника В-ЕТ-1 выявило четкие корреляции с показателями сократительной активности левого желудочка, оцениваемой по величине сердечного выброса и конечного диастолического давления у пациентов с ишемической болезнью [47].

Молекулярные механизмы увеличения уровня ЕТ-1 рассматриваются в [48], где описана индукция мРНК В-ЕТ-1 в различных отделах сердца крысы после воспроизведения острого инфаркта. Максимальная экспрессия этой мРНК отмечалась через семь дней (25-ти кратное увеличение) в инфарктной зоне.

Формированию хронической сердечной недостаточности сопутствует развитие тканевой гипертрофии, и эндотелин стимулирует клеточную пролиферацию, обладая митогенной активностью. Биохимические механизмы этих процессов также предполагают экспрессию генов, участвующих в биосинтезе ЕТ-1, и вовлечение других систем пептидных регуляторов. Таковым при формировании гипертрофии кардиомиоцитов в культуре является, наряду с ЕТ-1, ангиотензин II [49].

Клинические исследования констатируют эффективность бозентана в клинике и/или антагониста ЕТА рецепторов FR139317 (на крысах) в различных видах сердечной патологии. Как кратковременное (до двух недель), так и длительное (до 9-ти месяцев) применение этих препаратов способствовало улучшению гемодинамики, ремоделирования и снижения показателя смертности [50-53].

Речь идет, таким образом, о целостной системе ауто-/паракринной регуляции, связанной с биосинтезом ЕТ-1 при острой ишемии миокарда и последующем развитии хронической сердечной недостаточности. Исследования у

больных с патологией сердца показали, что уровень ЕТ-1 и его предшественника в лучшей степени коррелируют с измененными показателями гемодинамики (традиционные и эхографические измерения в покое и после физической нагрузки), чем с величинами тромбксана, простагландина F, альфа-некротического фактора и др. [54].

*Эндотелин и гипертензивные патологии.*

Поскольку ЕТ-1 является самым сильным из известных ныне эндогенных вазоконстрикторов, была постулирована ведущая роль пептида в патогенезе различных форм гипертензий. Значительные разночтения данных, получаемых как в клинике, так и в эксперименте, позволили сделать вывод о том, что ЕТ-1 скорее является преобладающим фактором патологии и что изменения его уровня в различные стадии заболевания или при различных формах (экспериментальных моделях) может не соответствовать характеру патологического процесса. В отличие от приведенных примеров, попытки использования антагонистов ЕТ-рецепторов при гипертензивных состояниях могут оказаться неэффективными. Такой анализ приведен в обзорных публикациях [55,56].

Уровень ЕТ-1 у спонтанно-гипертензивных крыс Вистар-Киото увеличивается с возрастом и к 8-й неделе (становление устойчивой гипертонии) оказывается значительно выше исходно измеряемого в сердце и в грудной аорте, однако ниже, чем в мозге [57]. Микроинъекции ЕТ-1 нормотензивным и спонтанно-гипертензивным крысам (1,0 - 10,0 пикомолей) в нейроны солитарного тракта приводило к увеличению АД, систолического давления левого желудочка, сердечного индекса  $dP/dt(max)$ . Эти данные демонстрируют влияние ЕТ-1 на центральную регуляцию гемодинамики [58].

Полагают, что нарушения функции почек, сопровождающие хроническую гипертензию, могут быть также связаны с повышенным образованием и экскрецией ЕТ-1. Пациенты, чувствительные к потреблению NaCl, имеют более высокий уровень пептида в плазме крови и в моче [59]. Диастолическая гипертензия, развивающаяся у больных с пересаженной почкой, по-видимому, обусловлена ЕТ-зависимой вазоконстрикцией, связанной, в свою очередь, с трансформирующим ростовым бета-фактором (TGF-beta) и ренином почек [60].

У 4-х недельных спонтанно гипертензивных крыс выявляется повышенная экспрессия мРНК ЕСЕ-1 в почках. Возможно, увеличенная у СГК активность ЕТ-1 способствует задержке натрия в почках, являясь фактором патогенеза гипертензии [61].

Поскольку ЕТ-1 играет важную роль в регуляции легочного кровотока, вазоконстрикторное действие пептида, образующегося в больших количествах в кровеносном русле или в ткани, может быть причиной развития легочной гипертензии. Такая посылка нашла немало подтверждений клинического и экспериментального характера. В биоптатах легких и в венозной крови, взятых от больных с легочной гипертензией, обнаружено увеличение содержания ЕТ-1, соответственно в 3 и в 2 раза [62]. Выявлена повышенная активность эндотелин-превращающего фермента в легочном эпителии, гладких мышцах и макрофагах; при этом активность NO-синтазы, фермента ответственного за синтез оксида азота, не отличалась у здоровых людей и у пациентов с легочной гипертензией [63].

В экспериментах на собаках с легочной гипертензией, вызванной острой гипоксией, продемонстрирована возможность коррекции антагонистами ЕТ-рецепторов [64]. "Монокроталиновая модель" легочной гипертензии, выполненная на крысах, показала связь обусловленных ЕТ-1 гемодинамических сдвигов, их коррекции антагонистом ЕТА рецепторов, измененной сосудистой реактивности к NO и увеличением эндотелий-зависимой дилатации в ответ на ацетилхолин (как показатель выраженной эндотелиальной дисфункции) [65].



Развитию хронической патологии способствуют атероматозные изменения интимы сосудов. На культуре эндотелиальных клеток пуповины человека установлено, что липопротеины низкой плотности увеличивали секрецию ET-1, тогда как липопротеины высокой плотности, наоборот, тормозили этот процесс. ET-1-модулирующая активность липопротеинов зависела от места их оседания (апикальная или базальная стороны артериальной интимы) [66]. Эти данные можно сопоставить с опытами на гладкомышечных клетках пуповины с удаленным эндотелием, где выявлена активность ECE, конвертировавшего В-ET-1, -2 и -3 [67]. В культуре эндотелиальных клеток быка вазальный эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF) стимулировал активность ECE-1, что указывает на возможность регуляторного влияния этого белка на экспрессию эндотелиновой системы в условиях образования неointимы и атеросклероза [68].

#### *Эндотелин и ишемические повреждения мозга*

Аплицированный в мозг *in vivo* ET-1 действует, как правило, на адвентивную, но не на люминальную поверхность церебральных артерий, вызывая длительную констрикцию, сходную с картиной церебрального вазоспазма после повреждения мозга. Экспрессия предшественника ET-1 индуцируется нарушениями, возникающими в эндотелии мозговых сосудов, изменениями местного гемостаза, иммунных и провоспалительных реакций. Констрикторная активность ET-1 может стать фактором усугубления вазоспазма и обращения его в цепь порочных патохимических реакций. Такова общая теоретическая позиция оценки роли эндотелина при патологии мозгового кровообращения [69].

Роль ET-1 выявляется на различных моделях ишемического повреждения мозга: инъекции аутологичной свежей крови в желудочки мозга [70,71], нанесения дозированной черепной травмы [72], фокальной церебральной ишемии [73], диффузного повреждения мозга [74], холодовой травмы мозга [75]. Значение ET-1, как ведущего фактора развития церебрального вазоспазма, доказывается применением блокаторов ETA-рецепторов - TBC 11251, Ro 61-1790, а также блокаторов ETB1 и ETB2 рецепторов - RES-701-1 и BQ788. Вовлечение в эндотелино-опосредованные реакции поврежденного мозга ETB рецепторов является новым фактом, дополняющим возможности использования ETB-антагонистов [73,76].

Церебральный вазоспазм, как основной феномен субарахноидального геморрагического синдрома, купировался введением кроликам ингибитора ECE. Препарат CGS 26303 блокировал контролируемую по видеомонитору констрикцию базилярной артерии, вызванную системным введением или локальной аппликацией В-ET-1 [77]. Рассматривается механизм ET-1 индуцируемой и ETA-рецепторами опосредуемой констрикции церебральных артерий (*in situ*) с участием каскада: фосфолипаза C - протеинкиназа C [78]. Соотношение ET-1 и NO в патологии диффузного повреждения мозга сильно варьирует в зависимости от срока развития процесса и исследуемой зоны мозга [74].

Наконец, исследования в клинике свидетельствуют о том, что увеличенный уровень ET-1 в спинно-мозговой жидкости в первые 18 часов мозгового инсульта может служить дополнительным диагностическим индикатором, поскольку в этот период уровень ET-1 в крови еще остается нормальным [79].

#### *Возможные терапевтические подходы коррекции ET-зависимых кардиоваскулярных патологий*

Использование специфических рецепторных антагонистов пептида/ов позволяет, с одной стороны, констатировать причастность именно этого пептида к развитию физиологической или патологической ситуации и, во-вторых, - в качестве последующего шага - коррегировать эффекты в различных тканевых регионах, в соответствии с локализацией рецепторов данного подтипа. Важной оказывается приведенная выше информация о ET-рецепторной и химической гетерогенности сосудов различных регионов, в частности - морфологической и химической гетерогенности прокси-



мальной и дистальной частей коронарного ложа. Локально "акцентированная" коррекция с помощью селективных антагонистов ЕТ-рецепторов определяет тактику современной терапии кардиоваскулярных патологий различного профиля.

Селективные антагонисты ЕТА и ЕТВ или смешанные антагонисты ЕТА/В рецепторов активно входят в медицинскую практику [80]. Они рассматриваются в качестве "новой терапевтической интервенции для лечения гипертензии, сердечной недостаточности и других заболеваний" [81].

У больных с тяжелой формой сердечной недостаточности применение оральной формы бозентана, антагониста ЕТА/В рецепторов, в течение двух недель приводило к улучшению показателей гемодинамики и сократительной активности сердца. Эффективность бозентана была очевидной на фоне использования традиционных кардиопрепаратов, типа ингибиторов АПФ, диуретиков, дигоксина [53]. Позитивным оказалось применение этого препарата у больных с коронарной недостаточностью, состояние которых документировалось ангиографически и интракоронарным доплеровским мониторингом [82].

Большая популярность ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента в кардиологической терапии служит стимулом для создания аналогичных препаратов, влияющих на метаболизм эндотелина. Изучение структуры и активного центра эндотелин-превращающего фермента дает информацию о возможном дизайне соединений, специфически связывающихся с ЕСЕ [6]. Терапевтический потенциал таких соединений оценивается как весьма перспективный [83], однако к настоящему времени нет ингибиторов ЕСЕ, принятых к клиническому использованию.

Также как и для АПФ, ведутся поиски "двойных" ингибиторов - ЕСЕ/нейтральная эндопептидаза [84], которые, однако, не выходят пока за рамки экспериментальных исследований.

#### *Заключение.*

Выявляется огромный пласт работ, посвященных эндотелину - важному пептидному регулятору. Его активность, связанная, в первую очередь, с эндотелием и гладкой мускулатурой сосудов и простирающаяся на функции практически всех органов (включая легкие, мозг, репродуктивную систему и надпочечники), определяет широкий спектр эндотелин-зависимых патологий.

Значительная информация о биохимии "семейства" эндотелинов - группы самих изопептидов, их предшественников, ферментов метаболизма - а также сведения о топографической фармакологии специфических ЕТ-рецепторов и большом спектре физиологических реакций "в норме" - служат основой для конкретной оценки значимости эндотелинов в генезе патологий вазо-кардиального профиля.

Важно также отметить, что эндотелин, как представитель большого класса пептидных регуляторов, функционально сопряжен с активностью других пептидных и непептидных соединений (ангиотензины, кинины, адреномедуллин, атриальные пептиды, "малые" гипоталамические гормоны, цитокины, катехоламины, система оксида азота, семейство простагландинов и др.), выполняющих в организме роль модуляторов, координаторов и "реализаторов" множественной гаммы физиологических и патологических процессов.

Работа поддержана грантом 98-04-48131а Российского Фонда Фундаментальных Исследований.

Автор приносит благодарность А.А.Лагунину за компьютерный дизайн иллюстраций к данной статье.

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Yanagasawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y. et al. (1988), *Nature*, **332**, 411-415.
- 2 Monge J.C. (1998) *J Cardiovasc. Pharmacol.*, **32** (Suppl.2), S36-S42.
- 3 Antoniucci D., Fitzpatrick L.A. (1996) *Endocrinologist*, **6**(6), 481-487.
- 4 Maeda S., Miyauchi T., Goto K., Matsuda M. (1997) *Life Sci.*, **61**(4), 419-425.
- 5 La M. and Reid J. (1995) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **22**, 315-323.
- 6 Sansom C., Hoang V., Turner A. (1995) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **26**, Suppl. 3, S75-S77.
- 7 Takahashi M., Matsushita Y., Iijima Y., Tanzawa K. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 21394-21398.
- 8 Xu D., Emoto N., Giaid A., Slaughter C., Kaw S. et al. (1994) *Cell*, **78**, 473-485.
- 9 Barnes K., Brown C., Turner A.J. (1998) *Hypertension*, **31**(1), 3-9.
- 10 Schweizer A., Valdenaire O., Nelbock P., Deuschle U. et al. (1997) *Biochem. J.*, **328**(Part 3), 871-877.
- 11 Parnot C., Lemoullec J.M., Cousin M.A., Guedin D. et al. (1997) *Hypertension*, **30**(4), 837-844.
- 12 Russell F., Skepper J.N., Davenport A.P. (1998) *Circul. Res.*, **83**(3), 314-321.
- 13 Naomi S., Iwaoka T., Disashi T., Inoue J., Kanesaka Y. et al. (1998) *Circulation*, **97**(3), 234-236.
- 14 Гомазков О.А. (1998) *Биохимия*, **63**(2), 12-20.
- 15 Davenport A.P., Kuc R.E., Plumpton C., Mockridge J.M. et al. (1998) *Histochem. J.*, **30**(5), 359-374.
- 16 Hoang M.V., Turner A. (1997) *Biochem. J.*, **327**(Part 1), 23-26.
- 17 Johnson G.D., Stevenson T., Ahn K.H. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**(7), 4053-4058.
- 18 Subkowski T., Hillen H., Kroger B., Schmidt M. (1998) *J. Immunoassay*, **19**(2/3), 75-93.
- 19 Schiffrin E.L., Touyz R.M. (1998) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **32** (Suppl.3), S2-S13.
- 20 Sakurai T., Yanagasawa M., Takuwa Y., et al. (1990) *Nature*, **348**, 732-735.
- 21 Masaki N., Vane J.R., Vanhoutte P.M. (1994) *Pharmacol. Rev.*, **46**(2), 137-42.
- 22 Russell F.D., Skepper J.N., Davenport A.P. (1997) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **29**(6), 820-826.
- 23 Russell F.D., Skepper J.N., Davenport A.P. (1998) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **31**(3), 424-430.
- 24 Dashwood M.R., Timm M., Muddle J.R. et al. (1998) *Endothelium /New York*, **6**(1), 61-70.
- 25 Douglas S.A., Ohlstein E.H. (1997) *J. Vasc. Res.*, **34**(3), 152-164.
- 26 Ruizopazo N., Hirayama K., Akimoto K. et al. (1998) *Mol. Med.*, **4**(2), 96-108.
- 27 Ikeda U., Yamamoto K., Maeda Y. et al. (1997) *Hypertension*, **29**(1Part 1), 65-69.
- 28 Shichiri M., Sedivy J.M., Marumo F., Hirata Y. (1998) *Mol. Endocrin.*, **12**(2), 172-180.
- 29 Marsen T.A., Simonson M.S., Dunn M.J. (1995) *Circ. Res.*, **76**(6), 987-995.
- 30 Golden C.L., Nick H.S., Visner G.A. (1998) *Amer. J. Physiol.*, **18**(5), L854-L863.
- 31 Murata S., Matsumura Y., Takada K., Asai Y. et al. (1995) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **274**(3), 1524-1530.
- 32 Catalan R.E., Martinez A.M., Gargiulo L., Liras A. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **215**(1), 219-226.
- 33 Halim A., Kanayama N., Elmaradny E., Maehara K. et al. (1995) *Thromb. Res.*, **80**(2), 105-112.

- 34 Zhang W.J., Bammer T., Binder B.R., Wojta J. (1997) Fibrinolysis Proteolysis, 11(5-6), 245-250.
- 35 Kapiotis S., Jilma B., Szalay T. et al. (1997) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol, 17(11), 2861-2867.
- 36 Ruschitzka F.T., Noll G., Luscher T.F. (1997) Cardiology, 88 (Suppl.3), 3-19.
- 37 Tiefenbacher C.P., Chilian W.M. (1998) Basic. Res. Cardiol., 93(6), 446-454.
- 38 Sharif I., Kane K.A., Wainwright C.L. (1998) Cardiovasc. Res., 39(3), 625-632.
- 39 Alexiou K., Dschietzig T., Simsch O, et al. (1998) J. Am. Coll. Cardiol., 32(6), 1773-1778.
- 40 Bohnemeier H., Pinto Y.M., Horkay F., Totter M. et al. (1998) Clin. Exper. Hypertens., 20(4), 417-437.
- 41 Maguire J.J., Davenport A.P. (1998) Br.J.Pharmacol., 125(2), 238-240.
- 42 Minamino I., Kurihara H., Takahashi M. et al. (1997) Circulation, 95(1), 221-230.
- 43 Sharma P., Lu F., Rut A., Brown M.J. (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun., 245(3), 709-712.
- 44 Kaburagi S., Hasegawa K., Morimoto T., Araki M. et al. (1999) Circulation, 99(2), 292-298.
- 45 Monge J.C. (1998) J. Cardiovasc. Pharmacol., 32(Suppl.2), S36-S42.
- 46 Omland T., Lie R.T., Aarland T., Dickstein K. (1994) Circulation, 89, 1573-1579.
- 47 Haug C., Koenig W., Hoehner M., Kochs M. et al. (1998) Clin. Chem. 44(2), 239-243.
- 48 Oie E., Vinge L.E., Tonnessen T., Grogard H.K. et al. (1997) Amer. J. Physiol. Heart Circ. Phys., 42(4), H1727-H1736.
- 49 Gray M.O., Long C.S., Kalinyak J.E., Li H.T., Karliner J.S. (1998) Cardiovasc. Res., 40(2), 352-363.
- 50 Kiowski W., Sutsch G., Hunziker P. et al. (1995) Lancet, 346(8977), 732-736.
- 51 Mulder P., Richard V., Derumeaux G., Hogie M. et al. (1997) Circulation, 96(6), 1976-1982.
- 52 Ohnishi M., Wada A., Tsutamoto T., Fukai D. et al. (1998) Cardiovasc Res. 39(3), 617-624.
- 53 Sutsch G., Kiowski W., Yan X.W., Hunziker P. et al. (1998) Circulation, 98(21), 2262-2268.
- 54 Spinarova L., Toman J., Pospisilova J., Soucek M. et al. (1998) Int. J. Cardiol., 65(3), 227-232.
- 55 Moreau P. (1998) Review Cardiovasc. Res., 39(3), 534-542.
- 56 Pintosietzma S.J., Paul M. (1998) Kidney Int., 54(Suppl.67), S115-S121.
- 57 Iyer R.S., Singh G., Rebello S. et al. (1995) Pharmacology, 1(2), 96-104.
- 58 Dai S.M., Shan Z.Z., Miao C.Y., Yin M., Su D.F. (1997) J.Cardiovasc. Pharmacol, 30(4), 475-480.
- 59 Ferri C., Bellini C., Desideri G. et al. (1997) Clin. Sci., 93(1), 35-41.
- 60 Kirk A.D., Jacobson L.M., Heisey D.M., Fass N.A. et al. (1997) Transplantation, 64(12), 1716-1720.
- 61 Disashi T., Nonoguchi H., Iwaoka T. et al. (1997) Hypertension, 30(6), 1591-1597.
- 62 Cacoub P., Dorent R., Nataf P., Carayon A. et al. (1997) Cardiovasc Res, 33(1), 196-200.
- 63 Giaid A. (1998) Chest , 114(3 Suppl), S208-S212.
- 64 Willette R.N., Ohlstein E.H., Mitchell M.P, et al. (1997) J. Pharm. Exp. Ther., 280(2), 695-701.
- 65 Prie S., Stewart D.J., Dupuis J. (1998) Circulation, 97(8), 744-751.
- 66 Unoki H., Fan J.L., Watanabe T. (1999) Cell. Tissue Res., 295(1), 89-99.



- 67 Maguire J.J., Johnson C.M., Mockridge J.W., Davenport A.P. (1997) *Br. J. Pharmacol.*, **122**(8), 1647-1654.
- 68 Matsuura A., Kawashima S., Yamochi W. et al. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**(3), 713-716.
- 69 Zimmermann M., Seifert V. (1998) *Neurosurgery*, **43**(4), 863-875.
- 70 Josko J., Hendryk S., Jedrzejowskaszypula H., Gwozdz B. et al. (1998) *J. Physiol. Pharmacol.*, **49**(3), 367-375.
- 71 Wanebo J.E., Arthur A.S., Louis H.G., West K. et al. (1998) *Neurosurgery*, **43**(6), 1409-1417.
- 72 Sato M., Noble L.J. (1998) *Brain Res.*, **809**(1), 39-49.
- 73 Touzani O., Galbraith S., Siegl P., McCulloch J. (1997) *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **17**(11), 1157-1165.
- 74 Sharma A.C., Misra M., Prat R., Alden K. et al. (1998) *Neurol. Res.*, **20**(7), 632-636.
- 75 Gorlach C., Siren A.L., Knerlich F., Feger G. et al. (1998) *J. Cerebr. Blood Flow Metabol.*, **18**(12), 1357-1364.
- 76 Zuccarello M., Boccaletti R., Rapoport R.M. (1998) *Eur. J. Pharmacol.*, **357**(1), 67-71.
- 77 Caner H., Kwan A., Arthur A., Jeng A. et al. (1996) *J. Neurosurg.*, **85**, 917-922.
- 78 Gorlach C., Benyo Z., Wahl M. (1998) *Kidney Int.*, **54**(Suppl.67), S224-S225.
- 79 Lampl Y., Fleminger G., Gilad R. et al. (1997) *Stroke*, **28**(10), 1951-1955.
- 80 Benigni A., Remuzzi G. (1999) *Lancet*, **353**(9147), 133-138.
- 81 Schiffrin E.L. (1998) *J. Hypertension*, **16**(12Part 2), 1891-1895.
- 82 Wenzel R.R., Fleisch M., Shaw S. et al. (1998) *Circulation*, **98**(21), 2235-2240.
- 83 Jeng A.Y. (1997) *Expert. Opin. Ther. Patents*, **7**(11), 1283-1295.
- 84 De Lombaert S., Ghai R., Jeng A., Trapani A. and Webb R. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **204**, 407-412.
- 85 Rubanyi G.M., Polokoff M.A. (1994) *Pharmacol. Reviews*, **46**(3), 325-415.

Поступила 13.04.99.

#### THE SYSTEM OF THE ENDOTHELIN PEPTIDES: MECHANISMS OF THE CARDIO-VASCULAR PATHOLOGIES.

Institute of Biomedical Chemistry, RAMS, Pogodinskaya st.10, 119832, Moscow, Russia,  
FAX (7)- (095)-245-08-57

O.A.GOMAZKOV

A rapidly growing body of data support the concept of endothelin as a paracrine acting endothelial regulators. The system of endothelin peptides - their chemical structure, physiological activity and role in cardiovascular pathological processes are reviewed. Molecular specificity, isoforms, and physicochemical parameters of the endothelin-converting enzyme (ECE) characterize this novel metalloproteinase as important regulator, that catalyses final step in the biosynthesis of endothelins. The role of the general endothelial system for various cardiovascular pathological states, including congestive heart failure and myocardial infarction, arterial hypertension, atherosclerotic vascular diseases is discussed. Therapeutic approaches with some endothelin receptor antagonists and ECE inhibitors are discussed, and endothelin system therefore represents a likely target for the development for the novel pharmaceutical agents.

**Key words:** regulatory peptides, endothelin, endothelin-converting enzyme, cardiovascular disorders, therapeutic approach.