

ET-1 és Bosentan hatásának vizsgálata normotenzív (WKY) és spontán hipertenzív (SHR) patkányok arteria mesenterica preparátumain

Antal Mónika¹, Brassai Attila²

¹Maros Megyei Sürgősségi Kórház, ²Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Gyógyszertan Tanszék

Evaluarea efectelor ET-1 și Bosentan asupra arterei mesenterice a șobolanilor normotenzivi (WKY) și hipertenzivi (SHR)

Introducere: Datorită relațiilor actuale științifice endotelina este cel mai potent vasoconstrictor în organism, ea reprezintă coordonatorul universal al funcției celulare, având un rol important în procesul patologic al hipertrofiei, fibrozei, inflamației. Pentru atenuarea disfuncției endoteliale o posibilitate este blocarea receptorilor endotelinici, prin Bosentan, un antagonist selectiv ET-A/ET-B. Obiective: Studiul asupra efectului contractil al ET-1, respectiv caracteristicile vasculare ale bosentanului asupra arterei mesenterice a șobolanilor normotenzivi (Wistar-Kyoto Rats), și hipertenzivi (Spontaneously Hypertensive Rats). Metode: După izolare, am secționat artera, rezultându-se două preparate inelare (2-3mm) pe care le-am menținut în viață cu soluție fiziologică Krebs. Am asigurat o temperatură constantă, fiziologică de 37-38°C, respectiv oxigenare. După adăugare de PE am verificat viabilitatea țesutului, prin administrarea Ach am efectuat distingerea celor două tipuri de țesut: intactă cu endotelium, respectiv preparat extirpat-fără endotelium. ET-1 am folosit în doză cumulativă în diferite concentrații urmărind contracțiile produse, respectiv prin antagonizare cu bosentan am evaluat răspunsul relaxant al acestuia, reprezentând grafic curbele doză-efect. Rezultate: Datorită răspunsului contractil al ET-1, am constatat o contracție a preparatului WKY semnificativ mărită față de SHR, în schimb efectul relaxant al bosentan s-a semnalat a fi similară în ambele preparate. Concluzii: Faptul că nu s-a demonstrat o diferență semnificativă în ceea ce privește relaxarea a bosentan, reprezintă o posibilă ipoteză că bosentan nu exercită un rol semnificativ în alterarea presiunii arteriale în SHR.

Cuvinte cheie: Bosentan, șobolani hipertenzivi, arteră mesenterică, contractilitate, efect vasorelaxant

Effect of an endothelin receptor antagonist Bosentan in spontaneously hypertensive rats (SHR) and control Wistar -Kyoto (WKY) rats.

Introduction: ET-1 is a potent vasoconstrictor peptide involved in the regulation of vascular tone, exerts vasoactive, pro-inflammatory, hypertrophic, and profibrotic properties on the heart, kidney, and blood vessels. To attenuate this effects endothelin receptor antagonists (ERA) are improved in this process, mainly the treatment with bosentan. Objective: The effect of the combined ET-A/ET-B endothelin receptor antagonist bosentan was evaluated in spontaneously hypertensive rats (SHR) and control Wistar-Kyoto (WKY) rats, to determine the contractil characteristics of ET-1, to evaluate the vascular changes due to bosentan treatment. Methods: The rats were anesthetized before the midline incision, by isolation of mesenteric artery we prepared small rings which were introduced in Krebs solution. The vascular changes were examined also with intact endotelium and with endotelium-denuded mesenteric vessels, in the presence of increasing concentrations of ET-1. To investigate the contribution of ERA in SHR and control WKY vascular relaxation we examined the two separated groups by adding cumulated doses of bosentan. Results: In the presence of ET-1 the contractil responses was significantly higher in WKY than SHR, but the bosentan relaxation indicated a quite similar response in both mesenteric vessels. Conclusion: These results suggest that there are interactions among the two types of vessels, there was no significant difference between the relaxation responses, which represents an approximative effect of bosentan in alteration of the blood pressure in SHR.

Keywords: Bosentan, hypertensive rats, mesenteric artery, contractility, relaxation response

Orvostudományi Értesítő, 2009, 82 (4): 268-271

www.orvtudert.ro

A farmakologiai kutatások egyik legfontosabb folyamata indult el az endothelin rendszer tanulmányozásának bevezetésével. Azon felfedezést miszerint az endothel sejtek lényeges szerepet játszanak a simaizom relaxációban, követte annak a feltételezésnek az igazolása, hogy létezik egy endothel dependens vasoconstrictio is [6, 7, 11]. Mára már tudjuk hogy az endothelin származékok, közülük is az endothelin-1 (ET-1), a jelenleg ismert leghatékonyabb vasoconstrictor faktor, amely az érszűkítő hatása mellett serkenti a simaizom proliferációt, valamint a szívizomsejt hipertrofiát. Az endothelium által termelt 21 aminosavat tartalmazó endothelin családba tartozó vazoaktív endogén peptidek az ET-1, ET-2, ET-3. Ezen peptidek aszerint hogy az ET-A (simaizom), vagy ET-B (endothel) receptorokon hatnak, fontos szerepet töltenek be a simaizomtónus regulációban, érszűkítődést vagy elernyedést okozva [4].

Az endotheliális diszfunkció okozta különböző elváltozások a szervezetben olyan folyamatokra vezethetők vissza mint vasoconstrictio, intima fibrózis, sejtproliferáció-

hipertrofia, gyulladásos folyamatok, trombózis, amelyek összességükben az endothelin tútermelés okozta károsodások kialakulását segítik elő. Az endotheliális diszfunkció javítására lehetőség nyílt az endothelin receptor blokádján. Ilyen hatású szerek első képviselője a nem szelektív ET/A-ET/B receptor antagonista Bosentan, amelyet kísérletes munkánkhoz is felhasználtunk.

A Bosentan (Tracleer®), az eddig egyedüli (FDA által 2001-ben jóváhagyott) endothelin receptor antagonista, amelyet a pulmonális hipertónia kezelésében alkalmaznak [1, 2, 9]. A terápiás javaslat megállapításának céljából több tanulmányt is végeztek, ezek közül legfontosabbak a REACH-1: krónikus szívelégtelenségben, magasvérnyomásban, ENABLE-1, ENABLE-2: szívelégtelenségben, BREATH: pulmonális hipertenzióban. Elegendő adattal eddig csak a pulmonális hipertenzio esetében rendelkezünk, a társpatológia kezelésének indikációjára még további tanulmányok szükségesek. A Bosentan akut hemodinamikai állatkísérletekben javította a bal kamra funkcióját, a myocytafunkciót, a pulmonális és szisztémás hemodinamikai paramétereket; csökkent a szívizom átépülése, javultak a coronarialekötéssel létrehozott szívelégtelenségben szenvedő állatok életkilátásai [8]. Állatkísérletek bizonyítják hogy Bosentan adagolása

Dr. Brassai Attila
Marosvásárhely - Târgu Mureș
Argeșului 8/2
e-mail: abrassai@yahoo.com

jelentős mértékben javítja az endotheliális diszfunkciót, az érfal remodelling kialakulását.

Ami az endothelin receptor antagonisták gyógyászati jellegzetességeit illeti, alkalmazásuk előnyösnek mondható amiatt, hogy másként hatnak mint az ismert kardiális szerek, esetleg ki is egészíthetik egymás hatását. Nem okoznak másodlagos neuro-hormonális aktivitást sem a KIR részéről, sem a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer részéről. Ami ellenjavallatukat illeti, az ET receptorok ubikviter elhelyezkedése miatt, az ET antagonisták hatása a célszerveken kívül is előfordulhat, de még nem teljesen tisztázott. Nagy dózisban való adagolásuk hepatotoxikus, illetve súlyos magzatkárosító hatásuk miatt terhességben ellenjavallt.

Az általunk végzett kísérletek objektuma a mesenterialis artéria volt, amely hasonlóképpen más artériákhoz, magában foglalja az ép endotheliumot valamint a körkörös simaizomrendszert. Célunk volt megvizsgálni az ET-1 érösszehúzó tulajdonságának változásait, illetve a kontrakciócsökkenés mértékét a Bosentan érellazító hatásának következtében, normotenzív (Wistar-Kyoto Rats) és hipertenzív (Spontaneously Hypertensive Rats) patkányok izolált arteria mesenterica preparátumain. Ugyanakkor bizonyosságot kívántunk nyerni az endothelium jelentőségéről a kontrakciós válaszban, figyelve az intakt endothellel rendelkező, illetve endothel irtott preparátumok között mutatkozó különbségeket.

Anyag és módszer

Kísérletes munkánkhoz hímnemű normotenzív patkányokat (Age-matched Wistar-Kyoto Rats-WKY, $n=28$), illetve hipertenzív patkányokat (Spontaneously Hypertensive Rats-SHR, $n=10$) használtunk, súlyuk 250-300 g között változva. Az állatokat dekaptálás előtt éteres anesztéziában részesítettük, ezután pedig kivéztettük. Medián laparotómia után, a vékonybeleket eltávolítva feltártuk az arteria mesentericát, melynek az izolálását követően belőle kis gyűrűpreparátumokat nyertünk (2-3mm). Ezeket 37°C-on, Krebs-Henseleit oldatos szervfürdőbe függesztettünk fel, állandó oxigénkoncentráció biztosítása (95%O₂-5%CO₂) mellett. Mindkét típusú állatokból nyert készítmények viabilitását fenilefrinnel (phenylephrin, PE) ellenőriztük. A kísérletek felét ép endothellel rendelkező érfalon, a másik felét pedig endothel irtott szövetpreparátumon végeztük. Az endothel irtás mechanikus módszerrel történt, úgy hogy az artéria gyűrűk belső rétegét tüvel körkörös mozdulatokkal távolítottuk el. Az in vitro adagolt hatóanyagok okozta tónusváltozásokat egy kezdeti 15-20 perces relaxációs idő után, figyeltük. Miután a készítményeket fenilefrinnel összehúzva ellenőriztük a szövetek életképességét, acetilkolinnal elernyesztve következtettünk az ép endothelium jelenlétére. A kontrakciókat és a relaxációkat számítógép segítségével izotóniás transduceren keresztül négy csatornás AD instruments-Chart-recorderrel regisztráltuk, a feldolgozás és görbeillesztés Sigma Plot programmal történt. A szövetpreparátumokhoz kumulatíván adagoltuk az ET-1-et, 10⁻⁸,

10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ M koncentrációban, követve az értónus változásokat, majd egy bizonyos idő után adagoltuk a Bosentan 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M koncentrációban; ezt előinkubációban is alkalmaztuk 10⁻⁸ M oldatban. A tónusfokozódás értékét grammban adtuk meg. A statisztikai elemzések Microsoft Excel 2003, SPSS 10.0 program segítségével történtek. A szignifikancia számításához páros t-tesztet használtunk $p<0,05$ ($n\leq 6$) minősült statisztikailag szignifikánsnak.

Eredmények

Endothelin-1 (ET-1) jelenlétében az összehúzódások mértéke a koncentráció függvényében emelkedett, a legnagyobb kontrakciót 10⁻⁶ M koncentrációnál érte el mind a WKY mind a SHR állatok endothellel rendelkező készítményein (1. ábra).

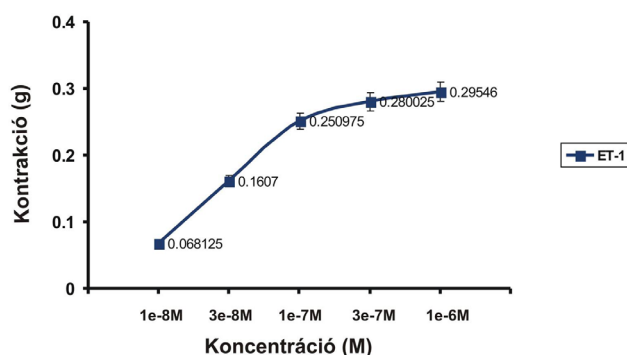
Az ET-1 és PE által kiváltott tónusváltozás összehasonlítását a 2. ábra tünteti fel. Az endothelmentes preparátumon közel ugyanolyan mértékű érösszehúzódást okozott akárcsak az ET-1, ezzel szemben az endothellel rendelkező ereken az ET-1 kontraktilis-válasza jóval kifejezettebb volt, mint a fenilefriné, ezáltal is utalva az endothél szerepére a vasoconstrictioiban.

Intakt és exstirpált endothelű preparátumok ET-1-re adott válaszában dózis-hatás görbét normotenzív állatokon a 3. ábra tünteti fel. Ez jelzi hogy az endothel irtott készítmények nem reagálnak olyan mértékű érösszehúzódással ET-1-re mint az endothellel rendelkező preparátumok.

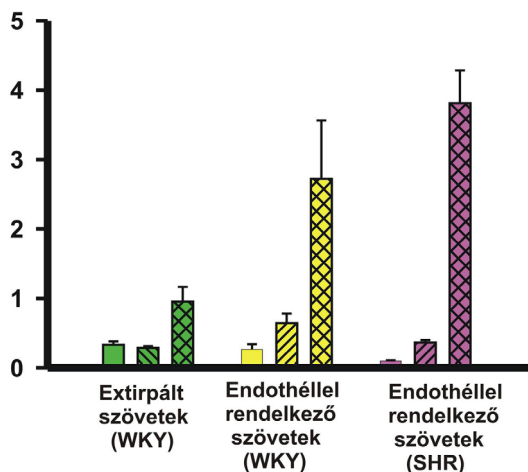
A WKY és az SHR típusú állatok érkészítményein összehasonlítva, az ET-1 hatása jelentősen különbözött: a normotenzív patkányok ET-1-re adott válasza szignifikánsan nagyobb volt, mint a hipertenzív patkányoké (4. ábra).

Bosentan preinkubáció befolyása az ET-1 érösszehúzó hatására WKY preparátumokon vizsgálva igen szembetűnő volt. Az 5. ábrán látható, hogy előkezelés után a kontraktilis-válasz jóval kisebb mértékű.

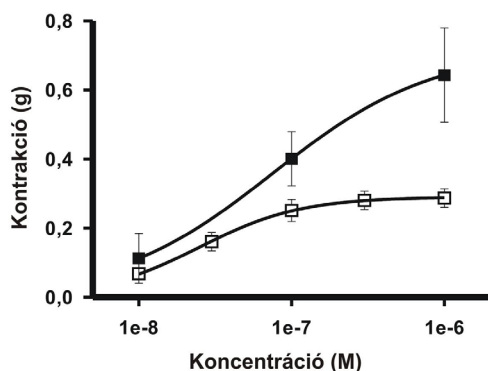
A Bosentan relaxáló hatásának összehasonlítását normotenzív és hipertenzív állatokból nyert preparátumokon a 6. ábrán szereplő adaghatás-görbék mutatják. Megállapítható



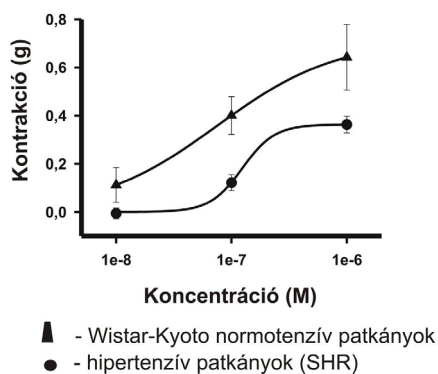
1. ábra. ET-1 kumulatív dózis-hatás görbéje



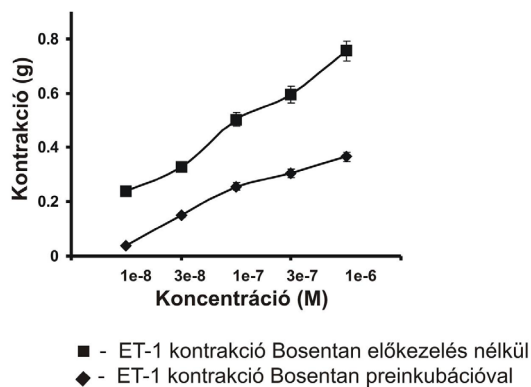
2. ábra. ET-1 és PE érszűkítő hatásának összehasonlítása (Sima oszlopok : PE 10⁻⁶ M (ordináta:g); Sávos oszlopok : ET 10⁻⁶ M (ordináta:g); Keresztes oszlopok: ET-1 / PE hatás aránya (ordináta: arányszámok))



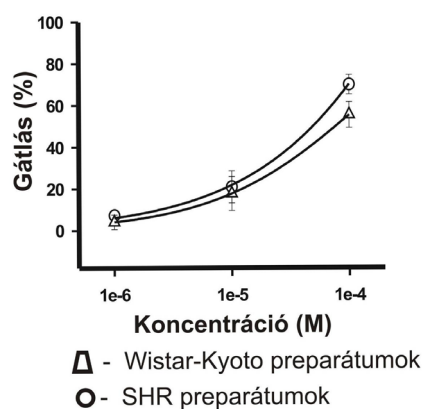
3. ábra. ET-1 összehúzó hatása normotenzív patkányok intakt és extirpált preparátumain



4. ábra. ET-1 dózis-hatás görbe összehasonlítása normotenzív és hipertenzív preparátumokon



5. ábra. Bosentan preinkubáció befolyása az ET-1 érszűkítő hatására



6. ábra. Bosentan relaxáló effektusának dózishatás-görbéje normotenzív és hipertenzív preparátumokon

hogy a koncentráció növekedésével fordított arányban csökkent a kontrakciók mértéke, és a két típusú szerv között nincs szignifikáns különbség azok elernyedésének mértékében.

Megbeszélés

Kísérleti eredményeink egyrészt megerősítik az endothel szerepét az értónus szabályozásában és az ET-1 érszűkítő hatásában. Hasonlóan a kardiovaszkuláris rendszer más területein nyert adatokhoz, mutatják azt hogy az ET-1 hatása a mesenterialis artériában jelentős mértékben endothel függő mind az SHR, mind a WKY preparátumok esetében. Másrészt adataink igazolják a Bosentan az ET-1 antagonistá hatását illetve érellazító effektusát.

A WKY és SHR állatcsoportok állapotjelzőit összehasonlítva érdekes különbséget figyelhetünk meg az ET-1 érszűkítő és a Bosentan érellazító hatásának a mértékében. Az ET-1 szignifikánsan gyengébb érszűkítődést eredményezett a hipertenzív állatcsoportban a normotenzív csoport válaszához képest. Ezzel szemben a Bosentan okozta elernyedés mértékében nem volt szignifikáns különbség a hipertenzív és normotenzív patkányok erein.

Ez a megfigyelt különbség kapcsolatba hozható a különböző kísérletes hipertónia modelleken közölt ellentmondásos adatokkal. Irodalmi adatok utalnak arra hogy a Bosentan eltérő antihipertenzív hatású SHR - illetve DOCA-salt típusú patkányok hipertónia modelljein [10, 12].

Schiffrin et al. feltételezése szerint SHR-patkányokban az ET-1-nek nincs kulcsszerepe a hipertenzió és kardiális remodelling fenntartásában [10]. Úgy tűnik, hogy erre utalnak a mi kísérleti eredményeink is.

A magasvérnyomás SHR-modelljében mutatkozó ellentmondásos eredmények miatt egyes szerzők feltételezik, hogy a Bosentan hatástalan lenne a hipertónia kezelésében. Mindenesetre az ET-1 antagonisták antihipertenzív hatásának eredményessége még nem teljesen tisztázott, ezen gyógyszercsoport tehát még további kutatás tárgyát képezi.

Irodalom

1. Boulanger C.M.C. – *Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure*, J Mol Cell Cardiol, 1999, 31:39-49.
2. Channick R.N, Simonneau G., Sitbon O. et al. – *Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study*, Chest, 2003, 124:247-254.
3. Cowburn P.J., Cleland J.G.F. – *Endothelin antagonists for chronic heart failure: do they have a role?*, Eur Heart J, 2001, 22:1772-1784.
4. Chan M.F., Okun I., Lytton Stavros F. et al. – *Identification of a new class of ETA selective endothelin antagonists by pharmacophore directed screening*, Biochem Biophys Res Commun, 1994, 201(1):228-234.
5. Császár A. – *Az endothel-diszfunkció és befolyásolási lehetőségei*, Háziorvos továbbképző szemle, 2004, 9:366-369.
6. Fonyó A. – *Az orvosi élettan tankönyve*, Medicina, Budapest, 1997, 109-111.
7. Fürst Zs. (szerk.) – *Farmakológia*, Medicina, Budapest, 2001, 70-80.
8. Hynynen M.M., Khalil R.A. – *The Vascular Endothelin System in Hypertension – Recent Patents and Discoveries*, Harvard Medical School, 2006.
9. Li Jin-S., Schiffrin E.L. – *Effect of chronic treatment of adult spontaneously Hypertensive Rats with an endothelin receptor antagonist*, Br J Pharmacol, 1995 13(6):647-652.
10. Schiffrin E.L., Sventek P., Li J.s. et. al. – *Antihypertensive effect of an endothelin receptor antagonist in DOCA-salt spontaneously hypertensive rats*, Br J Pharmacol, 1995-115(8):1377-1381.
11. Yanagisawa M., Inoue A., Ishikawa T. et al. – *Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide*, PNAS, 1988, 85:6964-6967.
12. Yu M., Gopalakrishnan V., McNeill J.R. – *Role of endothelin and vasopressin in DOCA-salt hypertension*, Br J Pharmacol., 2001, 132:1447-1454.