

# Systeme Endothéline et Circulation Pulmonaire

Par :  
**Jean-François Jasmin**

Département de Physiologie  
Faculté de Médecine  
Université de Montréal

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de  
l'obtention du grade de PhD en Physiologie

Mai, 2003

©, Jean-François Jasmin, 2003



W

4

U58

2007

v.041

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée **“Système Endothéline et Circulation Pulmonaire”**

Présenté par : **Jean-François Jasmin**

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

- Dr Jocelyn Dupuis, directeur de recherche
- Dr Louis P. Perreault, président du jury
- Dr Ernesto Schiffrin, membre interne
- Dr Pedro D'orléans-Juste, membre externe
- Dr Éric Thorin, représentant du doyen de la Faculté de médecine

## **Résumé Français**

L'endothéline-1 (ET-1) est un puissant vasoconstricteur possédant une activité pro-mitogénique. L'ET-1 provient du clivage de son précurseur, la big-ET-1, par l'enzyme de conversion de l'ET (ECE). Plusieurs types d'ECEs ont été identifiés. Certaines sont exprimées à la surface membranaire tandis que d'autres sont retrouvées à l'intérieur de la cellule. L'ET-1 interagit avec deux types de récepteurs, ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>. Le récepteur ET<sub>A</sub> est localisé sur les cellules musculaires lisses et provoque les effets vasoconstricteurs et pro-mitogéniques de l'ET-1. Le récepteur ET<sub>B</sub> est exprimé à la fois sur les cellules endothéliales où il provoque une vasodilatation et la clairance de l'ET-1 circulante et à la fois sur les cellules musculaires lisses où il provoque des effets vasoconstricteurs et pro-mitogéniques.

Les niveaux plasmatiques et tissulaires d'ET-1 sont augmentés dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires, telle entre-autre l'hypertension pulmonaire (HTP). Les antagonistes des récepteurs de l'ET, autant sélectifs pour les récepteurs ET<sub>A</sub> que non-sélectifs, ont été démontrés bénéfiques dans le traitement d'HTP. Le double rôle des récepteurs ET<sub>B</sub> soulève cependant une problématique à savoir s'il est préférable ou non de bloquer ces récepteurs. Puisque les récepteurs ET<sub>B</sub> endothéliaux provoquent une vasodilatation et la clairance de l'ET-1, leurs blocages pourraient s'avérer néfaste. Cependant, puisque les récepteurs ET<sub>B</sub> musculaires lisses provoquent une vasoconstriction et des effets pro-mitogéniques, leurs blocages pourraient s'avérer favorables.

Nous avons donc premièrement évalué le rôle du récepteur  $ET_B$  lors d'HTP induite par injection de MCT. Nos résultats démontrent une diminution de clairance de l'ET-1 chez le rat MCT. Nous démontrons également que l'administration aigue d'un antagoniste des récepteurs  $ET_B$  diminue de façon accentuée le débit sanguin pulmonaire chez le rat MCT, suggérant un rôle protecteur de ces récepteurs lors d'HTP.

Nous avons ensuite évalué les modifications cardiopulmonaires de l'ET-1 et de ses récepteurs chez le rat MCT. Nous démontrons une augmentation des niveaux plasmatiques et ventriculaires d'ET-1 ainsi qu'une augmentation sélective de la densité des récepteurs  $ET_B$  ventriculaires droit chez le rat MCT. Un traitement avec un antagoniste sélectif  $ET_A$  améliore de façon significative les niveaux d'ET-1 ainsi que la densité des récepteurs  $ET_B$  dans le ventricule droit.

Nous avons ensuite effectué une étude comparative directe entre un antagoniste sélectif  $ET_A$  et un antagoniste non-sélectif dans le traitement d'HTP. Nous démontrons que bien que les deux antagonistes améliorent de façon similaire les pressions pulmonaires, l'antagoniste non-sélectif est le seul à améliorer la survie et l'hypertrophie ventriculaire droite.

Nous avons ensuite quantifié l'activité de l'ECE luminale dans les circulations coronaires et pulmonaires. Nous démontrons qu'il n'y a aucune extraction et hydrolyse décelable de big-ET-1 circulante dans un seul temps de passage pulmonaire. Bien qu'il n'y ait pas d'hydrolyse de big-ET-1 circulante dans un temps de transit coronarien, une extraction de  $14\pm 1\%$  de big-ET-1 fut observée.

Les résultats de la présente thèse suggèrent donc que le blocage additionnel des récepteurs  $ET_B$  est bénéfique dans le traitement de l'HTP et que les ECEs lumineales ne jouent pas de rôle important dans la conversion de la big-ET-1 et la modulation des niveaux circulants d'ET-1.

**Mots clés;** Endothéline, récepteur, hypertension pulmonaire, enzyme de conversion de l'ET, antagoniste

## **Résumé Anglais**

Endothelin-1 (ET-1) is a potent vasoconstrictor which also displays pro-mitogenicity for various types of cells and stimulates the deposition of collagen. The precursor big-ET-1 will be converted by the ET converting enzymes (ECEs) into the active peptide of 21 a.a. named ET-1. Several ECEs have now been identified: ECE-1, 2 and 3. The gene for ECE-1 encodes four different isoforms which preferentially cleave big-ET-1. ECE-1a, 1c and 1d are predominantly located at the surface of the endothelium whereas ECE-1b is mainly located intracellularly. ECE-2 preferentially cleaves big-ET-1 and is located in intracellular compartments. An ECE-3 which preferentially cleaves big-ET-3 has also been purified. ET-1 actions are mediated by two different receptors named  $ET_A$  and  $ET_B$ .  $ET_A$  receptors are located on smooth muscle cells where they mediate vasoconstrictive and proliferative effects.  $ET_B$  receptors are mainly located on the endothelial cells where they mediate vasodilatation and clearance of circulating ET-1. However, some  $ET_B$  receptors are also found on smooth muscle cells where they mediate vasoconstriction, hypertrophy and proliferation.

Plasma and tissue levels of ET-1 are increased in several cardiovascular diseases as pulmonary hypertension (PH). ET receptor antagonists, either selective for  $ET_A$  receptor or non-selective, have been shown effective in the treatment of PH. However, because of its dichotomous role, blockade of the



ET<sub>B</sub> receptor could theoretically provide more or less benefit in addition to ET<sub>A</sub> receptor blockade.

In a first study, we evaluated the role of ET<sub>B</sub> receptors in the regulation of pulmonary vascular tone and clearance of ET-1 in rats with monocrotaline (MCT)-induced PH. We showed a reduction in the clearance of <sup>125</sup>I-ET-1 in the MCT rats. We also demonstrated that an ET<sub>B</sub> receptor antagonist induced a more pronounced reduction in pulmonary perfusion flow rate in the MCT rats, suggesting an increase protective role of these receptors in PH.

In a second study, we evaluated the modifications of cardiopulmonary ET-1 and its receptors in MCT rats. We showed increased plasmatic and ventricular levels of ET-1 and a selective increase in the density of right ventricular ET<sub>B</sub> receptors in rats with PH. Treatment with a selective ET<sub>A</sub> antagonist significantly reduced the right ventricular ET-1 levels and ET<sub>B</sub> receptor density.

In a third study, we directly compared the effectiveness of a selective ET<sub>A</sub> and a non-selective antagonist in treatment of MCT rats with established PH. Even if both antagonists similarly improved pulmonary pressures and flow-pressures relationships, the non-selective antagonist was the only one to improve survival and right ventricular hypertrophy.

In a fourth study we evaluated the activity of luminal ECEs in single pulmonary and coronary transit times. Our results showed no detectable extraction and hydrolysis of circulating big-ET-1 in a single pulmonary passage. However, we showed that the heart extracted  $14\pm 1\%$  of circulating big-ET-1 without any detectable hydrolysis in a single transit time.

Our results therefore suggest that additional blockade of  $ET_B$  receptors would be beneficial in the treatment of PH and that luminal ECEs are unlikely to convert circulating big-ET-1 *in vivo*.

**Keywords;** Endothelin, receptors, pulmonary hypertension, ET-converting enzymes, antagonist

## **Table des matières**

Page titre.....	i
Composition du jury .....	ii
Résumé français .....	iii
Résumé anglais .....	vi
Table des matières .....	ix
Liste des tableaux .....	xii
Liste des figures .....	xiii
Abréviations .....	xv
Dédicace .....	xx
<b>1.0-Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1-Endothelium.....	1
1.1.1-Prostacycline.....	1
1.1.2-Monoxyde d'azote.....	3
1.1.3-Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium.....	5
1.1.4-Thromboxane A2 et Prostaglandine H2 .....	6
1.2-Système Endothéline.....	7
1.2.1-Structure de l'ET .....	7
1.2.2-Biosynthèse de l'ET .....	9
1.2.3-Sécrétion de l'ET.....	13
1.2.4-Inactivation de l'ET.....	15
1.2.5-Récepteurs vasculaires de l'ET.....	16
1.2.6-Effets vasculaires de l'ET .....	18
1.2.7-Effets cardiaques de l'ET .....	21
1.2.8-L'ET dans l'embryogénèse.....	22
1.2.9-Implications physiopathologiques de l'ET .....	23
1.2.9.1-Insuffisance cardiaque .....	23
1.2.9.2-Hypertension artérielle .....	27
1.2.9.3-Athérosclérose .....	29
1.2.9.4-Hypertension pulmonaire .....	31
1.2.9.5-Autres pathologies .....	36
1.3-Hypertension Pulmonaire.....	40
1.3.1-Classification de l'HTP .....	40
1.3.2-Épidémiologie de l'HTP primaire.....	42
1.3.3-Pathobiologie de l'HTP primaire.....	43
1.3.4-Traitements de l'HTP primaire .....	46
1.3.4.1-Inhibiteurs de l'ECA.....	47
1.3.4.2-Bloqueurs des canaux calciques.....	47
1.3.4.3-Anticoagulants .....	49
1.3.4.4-Analogues de prostacycline .....	50

1.3.4.5-Monoxyde d'azote .....	54
1.3.4.6-Inhibiteurs de phosphodiesterase .....	54
1.3.4.7-Transplantation et septostomie .....	55
1.3.4.8-Antagonistes de l'ET .....	56
1.3.4.9-Perspectives futures.....	57
1.3.5-Modèles animaux d'HTP .....	59
1.3.5.1-Modèle hypoxique.....	59
1.3.5.2-Modèle infarctus.....	60
1.3.5.3-Modèle monocrotaline.....	61
<b>2.0-Rationnelle .....</b>	<b>65</b>
<b>3.0-Articles.....</b>	<b>68</b>
3.1-Article #1: Importance of Local Production of Endothelin-1 and of the ET <sub>B</sub> Receptor in the Regulation of Pulmonary Vascular Tone.....	68
3.2-Article #2 : Activation of the right ventricular endothelin system in pulmonary arterial hypertension : Response to chronic ET <sub>A</sub> receptor blockade ....	92
3.3-Article #3 : Effectiveness of a Non-Selective ET <sub>A/B</sub> and a Selective ET <sub>A</sub> Antagonists in Rats With Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension.....	117
3.4-Article #4 : Evaluation of luminal endothelin-converting enzyme activity in the pulmonary and coronary circulations .....	146
<b>4.0-Discussion.....</b>	<b>168</b>
4.1-Rôles du récepteur ET <sub>B</sub> dans l'HTP .....	168
4.1.1-Clairance de l' <sup>125</sup> I-ET-1 .....	168
4.1.2-Régulation du tonus vasculaire pulmonaire .....	170
4.1.3-Profil cardiaque des récepteurs de l'ET .....	171
4.2-Comparaison d'antagonistes sélectif et non-sélectif .....	173
4.2.1-Effets sur la survie .....	174
4.2.2-Effets hémodynamique .....	174
4.2.3-Effets sur l'hypertrophie du ventricule droit .....	176
4.3-Activité de l'ECE luminale .....	179

<b>5.0-Conclusion</b> .....	182
<b>6.0-Remerciements</b> .....	183
<b>Bibliographie</b> .....	184

**Liste des Tableaux**

<b>Tableau 1: Caractéristiques des différents modèles animaux d'HTP ..</b>	<b>64</b>
<b>Tableaux de l'article # 2.....</b>	<b>111</b>
Table 1-Morphologic and hemodynamic parameters .....	111
Table 2-Kinetic parameters of <sup>125</sup> I-ET-1 binding in cardiac ventricles and in the lungs.....	112
<b>Tableaux de l'article # 3.....</b>	<b>139</b>
Table 1-Hemodynamic and morphologic parameters .....	139

## **Liste des Figures**

<b>Figure 1-Facteurs vasoactifs libérés de l'endothélium .....</b>	<b>2</b>
<b>Figure 2-Structures primaires des endothélines .....</b>	<b>8</b>
<b>Figure 3-Biosynthèse de l'endothéline-1 .....</b>	<b>10</b>
<b>Figure de l'article # 1 .....</b>	<b>89</b>
Figure 1-Effect of increasing doses of the specific ET <sub>B</sub> receptor antagonist BQ788 on pulmonary ET-1 removal .....	89
Figure 2-Variation of perfusion flow rate with increasing doses of the specific ET <sub>B</sub> receptor antagonist BQ788 .....	90
Figure 3-Immunoreactive ET-1 levels measure in plasma taken from the right ventricle (venous) and the aorta (arterial) .....	91
<b>Figure de l'article # 2 .....</b>	<b>114</b>
Figure 1-Right ventricular systolic pressure (panel A), and the ratio RV/LV+S (panel B).....	114
Figure 2-Venous and aortic plasma ET-1 levels .....	115
Figure 3-Ventricular (panel A) and pulmonary (panel B) ET-1 levels .	116
<b>Figure de l'article # 3 .....</b>	<b>142</b>
Figure 1-Kaplan Meier survival curves .....	142
Figure 2-Effects of selective ET <sub>A</sub> and non-selective ET <sub>A/B</sub> antagonists on the right ventricular systolic pressure.....	143
Figure 3-Effects of selective ET <sub>A</sub> and non-selective ET <sub>A/B</sub> antagonists on the right ventricular hypertrophy .....	144
Figure 4-Relationship between the perfusion pressure and the flow rate in isolated lungs .....	145

<b>Figure de l'article # 4</b> .....	166
Figure 1-Outflow profiles of human I <sup>125</sup> big-ET-1 and its vascular reference, EBD-labeled albumin, in isolated lungs (A) and heart (B).	166
Figure 2-Big-ET-1 and ET-1 levels from outflow samples after bolus injection of unlabeled human big-ET-1 in isolated lungs (A) and heart (B) .....	167



## Abréviations

a.a.	Acides aminés
ALPHABET	Groupe de l'étude européenne sur le beraprost et l'hypertension pulmonaire artériolaire " <i>Arterial Pulmonary Hypertension and Beraprost European Study Group</i> "
AMP	Adénosine mono-phosphate cyclique
ANP	Peptide natriurétique de l'oreillette " <i>Atrial Natriuretic Peptide</i> "
Asp	Asparagine
AT-1	Récepteur 1 de l'angiotensine II
All	Angiotensine II
BMPR <sub>2</sub>	Récepteur II de la protéine morphogénétique osseuse " <i>Bone Morphogenetic Protein Receptor II</i> "
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CGRP	Peptide relié au gène de la calcitonine " <i>Calcitonin gene-related Peptide</i> "
CHO	Ovaires d'hamster chinois " <i>Chinese Hamster Ovary</i> "
COX	Cyclo-oxygénase
DAG	Diacylglycérol
DOCA	Déoxycorticostérone acétate
DMCT	Déhydro-monocrotaline
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine II
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
EDE	Enzyme dégradante de l'endothéline

EDHF	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothelium " <i>Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor</i> "
EDRF	Facteur relaxant dérivé de l'endothélium " <i>Endothelium Derived Relaxing Factor</i> "
EET	Acide époxyeicosatriénoïque
ENABLE	Diminution des évènements d'insuffisance cardiaque par l'antagoniste de l'endothéline Bosentan " <i>Endothelin Antagonist Bosentan for Lowering Cardiac Events in Heart Failure</i> "
ERK	Kinase reliée au signal extracellulaire " <i>Extracellular Signal-Related Kinase</i> "
ET	Endothéline
ET <sub>A</sub>	Récepteur A de l'endothéline
ET <sub>B</sub>	Récepteur B de l'endothéline
ET <sub>C</sub>	Récepteur C de l'endothéline
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes " <i>Fibroblastic Growth Factor</i> "
Gly	Glycine
GMP <sub>c</sub>	3'-5'-guanosine monophosphate cyclique
His	Histidine
HTA	Hypertension artérielle
HTP	Hypertension pulmonaire
HUVECs	Cellules endothéliales de veines ombilicales humaines " <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> "

Ile	Isoleucine
IP	Récepteur I <sub>2</sub> des prostaglandines " <i>Prostaglandin I<sub>2</sub> receptor</i> "
IP <sub>3</sub>	Inositol tri-phosphate
IVA	artère coronaire interventriculaire antérieure
JNK	Kinase reliée à la portion N-terminale de c-jun " <i>C-Jun N-terminal Kinase</i> "
K <sup>+</sup> <sub>ATP</sub>	Canaux potassiques dépendants de l'adénosine-5'-Triphosphate
LDL	Lipoprotéines de faibles densité " <i>Low Density Lipoproteins</i> "
Leu	Leucine
L-NNA	N(G)-nitro-L-arginine
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes " <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> "
MCT	Monocrotaline
MEK	MAPK kinase
MKP1	MAPK phosphatase-1
MMP	Métalloprotéases liées à la matrice " <i>Matrix Metalloproteases</i> "
MPOC	Maladies pulmonaires obstructives chroniques
NEP	Endopeptidase neutre " <i>Neutral Endopeptidase</i> "
NO	Monoxyde d'azote " <i>Nitric Oxide</i> "
NOS	Monoxyde d'azote synthétase " <i>Nitric Oxide Synthase</i> "
NYHA	Association cardiaque de New-York "New-York Heart Association"
OLE	" <i>Open Label Extension</i> "

PDE	Phosphodiesterases
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandine Endoperoxide H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostacycline
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidyl inositol bi-phosphate
PI3K	Kinase phosphoinositide-3 " <i>Phosphoinositide-3 Kinase</i> "
PKG	Protéine kinase G
PLC	Phospholipase C
REACH-1	Recherche sur les antagonistes de l'endothéline dans l'insuffisance cardiaque chronique " <i>Research on Endothelin Antagonist in Chronic Heart Failure</i> "
SDRA	Syndrome de détresse respiratoire de l'adulte
Ser	Sérine
SHR	Rats spontanément hypertendus " <i>Spontaneously Hypertensive Rats</i> "
TGF-β	Facteur de croissance transformant β " <i>Transforming Growth Factor β</i> "
Thr	Thréonine
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale-α " <i>Tumor Necrosis Factor-α</i> "
Trp	Tryptophane
TXA <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>
Tyr	Tyrosine
VEGF	Facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires " <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> "

WHO Organisation pour la santé mondiale "*World Health Organization*"

5-HT Sérotonine

**Cette thèse est dédiée à Isabelle Mercier et toute ma famille pour leurs  
encouragements et leurs supports incroyables.**

**Merci Beaucoup!!!**

## 1.0-INTRODUCTION

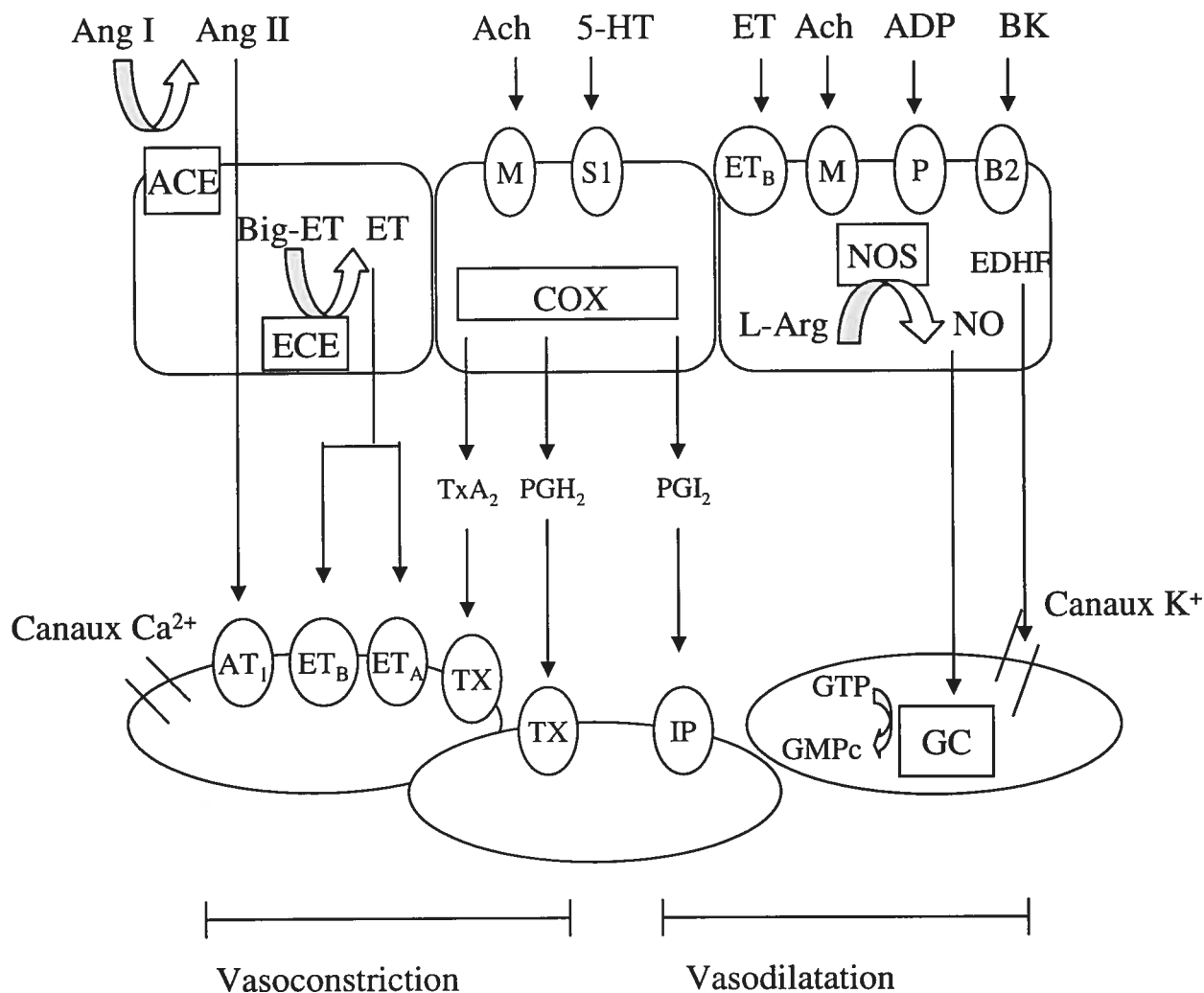
### 1.1-Endothélium

L'endothélium fut longtemps considéré comme une simple barrière statique entre le sang et les cellules musculaires lisses vasculaires. Il est maintenant bien connu que l'endothélium maintient une surface non-thrombogénique, agit comme barrière sélective et est impliqué dans le contrôle du tonus vasculaire par la sécrétion de plusieurs substances vasoactives. En effet, l'endothélium sécrète plusieurs vasodilatateurs tels le monoxyde d'azote, la prostacycline et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ainsi que plusieurs vasoconstricteurs tels entre autres l'endothéline et la thromboxane  $A_2$  (Figure 1).

#### 1.1.1-Prostacycline

Moncada et al. (1976) ont premièrement découvert la prostacycline ( $PGI_2$ ), un puissant vasodilatateur possédant également une activité antagoniste sur l'agrégation plaquettaire (1). La  $PGI_2$ , produite surtout au niveau de l'endothélium, provient de la cascade de l'acide arachidonique. La cyclo-oxygénase (COX) transforme d'abord l'acide arachidonique en Prostaglandin Endoperoxide  $H_2$  ( $PGH_2$ ) qui sera par la suite transformée en  $PGI_2$  par l'enzyme membranaire prostacycline synthase (2;3). La  $PGI_2$ , libérée des cellules endothéliales se lie aux récepteurs IP (*Prostaglandin  $I_2$ -receptor*)

## Figure 1. Facteurs vasoactifs libérés de l'endothélium



ACE: Ang converting enzyme, Ach: Acétylcholine, ADP: Adénosine diphosphate, Ang: Angiotensin, BK: Bradykinine, COX: Cyclo-oxygénase ECE: ET converting enzyme ET: Endothelin, GC: Guanylate cyclase, L-Arg: L-Arginine, NO: Oxyde nitrique, PGH<sub>2</sub>: Prostaglandine H<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>: Prostacycline, TxA<sub>2</sub>: Thromboxane A<sub>2</sub>. Adapté de Lüscher and Barton (1997).



présents au niveau des cellules musculaires lisses sous-jacentes (4). La liaison de la PGI<sub>2</sub> à ce récepteur, faisant partis de la famille des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G, active l'adénylate cyclase qui induira l'augmentation de 3'-5'-adénosine monophosphate cyclique (AMPc) provoquant ainsi la relaxation de la cellule musculaire lisse et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (5;6). La production de PGI<sub>2</sub> est stimulée par de nombreux facteurs à la fois physiques et neurohormonaux tels entre autres ; l'hypoxie, les forces de cisaillements, la bradykinine, l'angiotensine et l'endothéline (7-11).

#### *1.1.2-Monoxyde d'azote*

Furchgott et Zawadzky (1980) ont par la suite décrit un facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF; *Endothelium Derived Relaxing Factor*) en démontrant la vasodilatation dépendante de l'endothélium d'aorte de lapin provoquée par l'acétylcholine (12). Ce facteur relaxant fut par la suite identifié comme étant le monoxyde d'azote (NO) par Palmer en 1987 (13). Le NO est synthétisé à partir de la L-arginine, qui sera clivée par l'enzyme NOS (*Nitric Oxide Synthase*) en NO et L-citrulline. Il existe trois isoformes de NOS soit; eNOS, nNOS et iNOS. La eNOS est une enzyme membranaire présente au niveau des cellules endothéliales, du myocarde et des plaquettes (14;15). La nNOS est une enzyme cytosolique retrouvée au niveau des neurones et du muscle squelettique (16;17). La iNOS est retrouvée à la fois au niveau de l'endothélium, du myocarde, des fibroblastes, des cellules musculaires lisses

et des plaquettes (18-21). La eNOS et la nNOS sont des enzymes constitutivement actives et dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ , tandis que la iNOS est une enzyme cytosolique, inductible et indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  impliquée dans le choc septique, le cancer, l'ischémie cérébrale et l'infarctus du myocarde (22-29). Les gènes humains de chacune des NOS ont maintenant été identifiés. Ainsi, le gène de la eNOS se retrouve sur le chromosome 7, celui de la nNOS sur le chromosome 12 alors que celui de la iNOS est situé au niveau du chromosome 17 (30;31). Le NO, synthétisé dans les cellules endothéliales, diffuse librement vers les cellules musculaires lisses sous-jacentes et se lie à une enzyme cytosolique, la guanylate cyclase soluble. La guanylate cyclase provoque l'augmentation du second messenger 3'-5'-guanoside monophosphate cyclique (GMPc) (32;33). Le GMPc active par la suite une protéine kinase (PKG) qui ira phosphoryler les canaux calciques et potassiques pour ainsi diminuer la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  et activer les canaux potassiques (34-37). La PKG active également la phosphatase de la chaîne légère de myosine inhibant ainsi la phosphorylation de celle-ci et par le fait même la contraction de la cellule musculaire lisse (38;39). La production de NO est stimulée par de nombreux facteurs tels les catécholamines, la bradykinine, la sérotonine (5-HT) et les oestrogènes (40-43). Le NO est également relâché suite à des forces de cisaillement au niveau de la paroi endothéliale et à de l'hypoxie (44-46).

### 1.1.3- Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

Un facteur dérivé de l'endothélium provoquant des relaxations indépendantes du NO et associées à l'hyperpolarisation de la cellule musculaire lisse fut par la suite décrit (47;48). Ce facteur fut nommé EDHF (*Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor*) puisque ses effets étaient médiés par une augmentation de la sortie de potassium de la cellule. Divers candidats possibles ont maintenant été identifiés comme étant l'EDHF. L'acide époxyeicosatriénoïque (EET), un dérivé de l'acide arachidonique clivé par le cytochrome P450, induit l'hyperpolarisation de cellules musculaires lisses en activant les canaux potassiques dépendants du  $Ca^{2+}$  (49). Les ions potassiques ( $K^+$ ) pourraient eux-mêmes représenter l'EDHF. En effet, l'augmentation de  $K^+$  peut induire l'hyperpolarisation de la cellule musculaire lisse en activant les canaux potassiques à rectification entrante et la  $Na^+K^+ATPase$  (50;51). Notons également que les jonctions myo-endothéliales pourraient également jouer un rôle important dans l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses. En effet, l'hyperpolarisation des cellules endothéliales suite à un quelconque agoniste pourrait être transmise directement à la cellule musculaire lisse via ces jonctions (52;53).

#### 1.1.4- *Thromboxane A<sub>2</sub> et Prostaglandine H<sub>2</sub>*

L'endothélium peut également sécréter des substances vasoconstrictrices telles la thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) et la PGH<sub>2</sub>. Comme mentionné précédemment, la PGH<sub>2</sub> provient de la voie de l'acide arachidonique. La PGH<sub>2</sub> peut par la suite être transformée en TxA<sub>2</sub> par une enzyme microsomale nommée thromboxane A<sub>2</sub>-synthase (54). La TxA<sub>2</sub> et la PGH<sub>2</sub> agissent sur le même récepteur présent au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires (55;56). Le récepteur des TxA<sub>2</sub>, ou récepteur TP, est un récepteur à sept passages transmembranaires couplé à la protéine Gq (57). La liaison de la TxA<sub>2</sub> ou de la PGH<sub>2</sub> au récepteur active la protéine Gq qui activera à son tour l'effecteur phospholipase C (PLC) menant ainsi à l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> nécessaire à la contraction de la cellule musculaire lisse (58). En plus de leur activité vasoconstrictrice, la TxA<sub>2</sub> et la PGH<sub>2</sub> ont des effets pro-mitogéniques sur différents types cellulaires incluant les cellules musculaires lisses vasculaires et favorisent également l'aggrégation plaquettaire (59-61).

## **1.2-Système Endothéline**

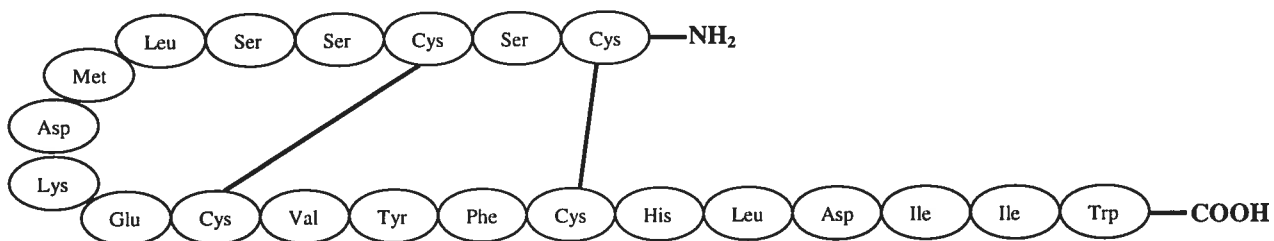
L'endothélium sécrète également l'endothéline (ET). L'ET fût isolée en 1988 par Yanagisawa à partir de milieu de culture de cellules endothéliales d'aorte thoracique de porc (62). L'ET est un puissant vasoconstricteur possédant une activité pro-mitogénique et favorisant également la déposition de collagène (62).

### *1.2.1-Structure de l'ET*

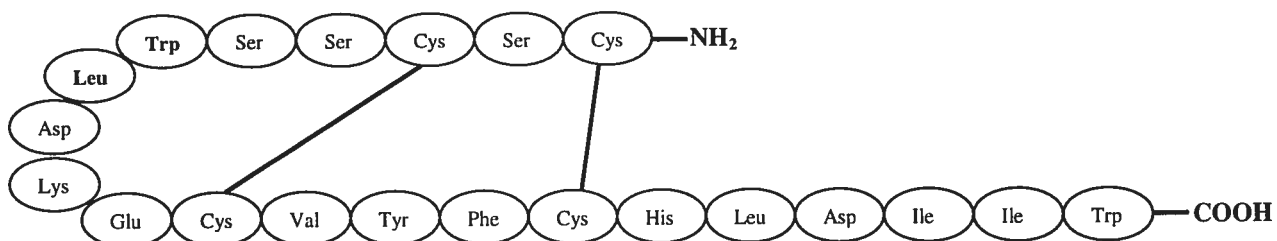
L'endothéline est un peptide de 21 acides aminés (a.a.) possédant 4 résidus cystéines formant deux ponts disulfures dans la portion N-terminal (Figure 2). Le domaine N-terminal détermine l'affinité de l'endothéline au récepteur tandis que le domaine C-terminal contient le site de liaison au récepteur. L'ET se retrouve sous trois isoformes, dérivées de trois gènes différents, l'ET-1, l'ET-2 et l'ET-3 : L'ET-1 représente l'isoforme la plus importante au niveau vasculaire (63). L'ET-2 et l'ET-3 diffèrent de l'ET-1 par respectivement seulement deux et six acides aminés. L'ET possède également une forte homologie structurale avec la Sarafotoxine, un peptide vasoconstricteur isolé du venin du serpent *Atractaspis engaddensis* (64;65).

## Figure 2. Structures Primaires des Endothélines (ET)

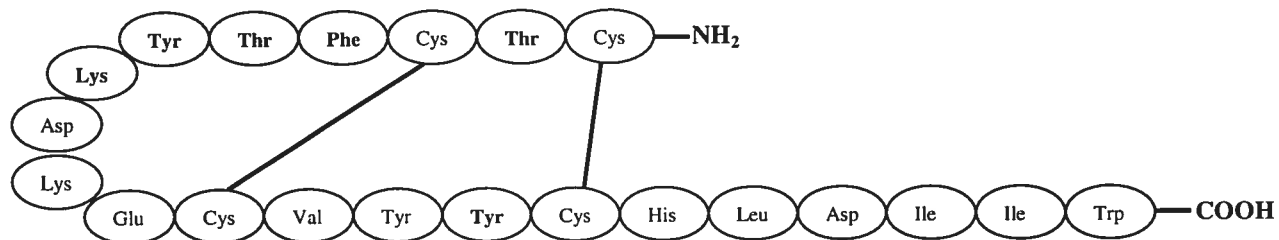
### ET-1



### ET-2



### ET-3



### 1.2.2-Biosynthèse de l'ET

Le gène de l'ET-1 humaine a été cloné et est localisé dans la portion télomérique du chromosome 6 (66). Les gènes humains de l'ET-2 et l'ET-3 se retrouvent pour leur part respectivement au niveau des chromosomes 1 et 20 (66). Le gène de l'ET-1 est transformé en un prépropeptide constitué de 212 acides aminés nommé prépro-ET-1. La prépro-ET-1 est par la suite clivée par des endopeptidases de types furines ainsi que par des carboxypeptidases qui clivent deux acides aminés supplémentaires dans la portion C-terminale pour créer un peptide de 38 acides aminés nommé pro-ET-1 ou big-ET-1 (67). La big-ET-1 sera par la suite clivée par l'enzyme de conversion de l'ET (ECE) entre les résidus Trp<sup>73</sup> et Val<sup>74</sup>, en peptide mature de 21 acides aminés nommé ET-1 (Figure 3) (68). La big-ET-2 sera également clivée par l'ECE entre les résidus Trp<sup>73</sup> et Val<sup>74</sup> tandis que la big-ET-3 sera clivée entre les résidus Trp<sup>73</sup> et Ile<sup>74</sup>. Les ECEs font partis de la famille de métalloendopeptidase membranaire zinc-dépendante tout comme l'endopeptidase neutre (NEP) 24.11 et la protéine associée au groupe Kell (*Kell blood group protein*) (69).

La première ECE fut purifiée par Takahashi et al. (1993) à partir de microsomes de poumons de rats (70). De nombreuses ECEs ont maintenant été identifiées et peuvent être distinguées selon leur localisation et le pH auquel elles ont une activité maximale. Le gène de l'ECE-1 humaine a été identifié au niveau du chromosome 1 (1p36) et engendre quatre isoformes

### Figure 3. Biosynthèse de l'ET-1

**Prépro-Endothéline-1**  
(212 a.a.)



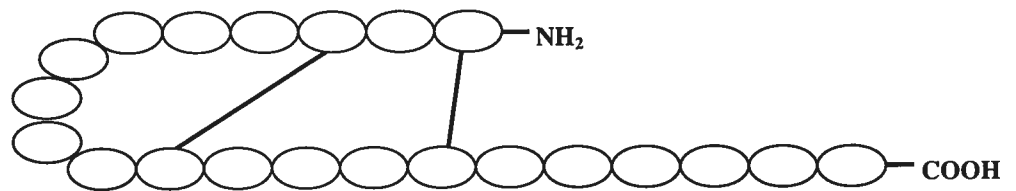
↓  
Endopeptidase  
Carboxypeptidase

**Big-Endothéline-1**  
(38 a.a.)



↓  
Enzyme de  
conversion de  
l'endothéline

**Endothéline-1**  
(21 a.a.)





provenant de quatre promoteurs alternatifs (71-73). L'ECE-1c, constituée de 754 acides aminés, est exprimée à des niveaux plus importants que l'ECE-1a (758 a.a.) et l'ECE-1d (767 a.a.) tandis que les niveaux de l'ECE-1b (770 a.a.) ne représentent que 5% de l'ECE-1 total. Les ECEs-1 sont des protéases intégrales de type 2 liées à la membrane. Elles sont constituées d'un seul domaine transmembranaire, de motifs de liaison au zinc, de sites de glycosylation, d'une courte portion N-terminal cytoplasmique et d'une longue portion C-terminal extracellulaire contenant le domaine catalytique. Les quatre ECE-1 diffèrent l'une de l'autre dans leur portion N-terminal tandis qu'il y a une forte homologie dans le premier tiers de la portion C-terminal. L'ECE-1a, l'ECE-1c et l'ECE-1d sont exprimées de façon prédominante à la surface membranaire tandis que l'ECE-1b est localisée dans des compartiments intracellulaires en association avec l'appareil de Golgi. Les quatre isoformes d'ECE-1 clivent préférentiellement la big-ET-1 que la big-ET-2 et big-ET-3 dans un ratio respectif de 1.0/0.1/0.1.

Emoto et al. (1995) ont également purifié une ECE-2 bovine (74). L'ECE-2 provient d'un gène différent, hydrolyse la big-ET-1 de façon préférentielle et se retrouve à l'intérieur de la cellule en association avec l'appareil de Golgi où elle possède une activité maximale à un pH acide de 5.5 (74). L'ECE-2 serait une protéine liée à la membrane et possédant un domaine catalytique C-terminal au niveau de la lumière des vésicules de sécrétion (74). Selon des études *in vitro* et de transfections il fut démontré que l'ECE-2 était retrouvée en grande quantité dans les tissus nerveux tels le cortex cérébral et le

cervelet. L'ECE-2 est également retrouvée en plus faible quantité dans le myomètre, les testicules, les ovaires et les cellules endothéliales en cultures. Toutefois, la proportion d'ARNm de l'ECE-2 dans les cellules endothéliales en culture ne représente que de 1 à 2 % l'expression de l'ARNm de l'ECE-1. L'ECE-2 est cependant 250 fois plus sensible à l'activité du phosphoramidon que l'ECE-1, ce qui est plus similaire aux NEP qu'à l'ECE-1. Récemment, Ikeda et al. (2002) ont identifié quatre sous-isoformes de l'ECE-2 chez le bœuf et la souris (75). Les sous-isoformes ECE-2a-1, 2a-2, 2b-1 et 2b-2 provenant de promoteurs alternatifs diffèrent les unes des autres dans leur portion N-terminale. L'ECE-2a-1 et l'ECE-2a-2 sont exprimés dans plusieurs tissus incluant le foie, les reins, les surrénales, les gonades et les cellules endothéliales tandis que l'ECE-2b-1 et l'ECE-2b-2 sont exprimées en forte majorité dans les tissus nerveux. Les quatre sous-isoformes d'ECE-2 demeurent toutefois toutes intracellulaires et associées avec le réseau golgien. Le gène humain de l'ECE-2 a maintenant été localisé au niveau du chromosome 3q28-q29 (76).

Hasegawa et al. (1998) ont récemment purifié une nouvelle ECE, l'ECE-3, à partir de microsomes d'iris bovin (77). Cette ECE-3 clive préférentiellement la big-ET-3 et possède une activité optimale à un pH de 6.6. La masse moléculaire de l'ECE-3 est légèrement plus élevée (140kDa) que celle de l'ECE-1 et 2 (130kDa). L'activité de cette nouvelle enzyme est également inhibée par le phosphoramidon.

L'ET peut également être clivée par différentes autres enzymes. En effet, la NEP 24-11, des chymases ainsi que la métalloprotéinase-2 matricielle (MMP-2) ont toutes été démontrées apte à cliver l'ET. Lebel et al. (1996) ont démontré que l'incubation de parenchyme pulmonaire de cobaye avec le thiorphan et le SQ 28603, deux inhibiteurs de la NEP, diminuait de façon significative la contraction induite par la big-ET-1 et la big-ET-2 (78). Pour leur part, Nakano et al. (1997) ont démontré que la chymase purifiée de mastocytes humains clivait la big-ET-1 en ET de 31 acides aminés (1-31) (79). Il fût par la suite démontré, dans des cellules musculaires lisses d'artères coronaires d'humain, que l'ET 1-31 était dix fois moins puissante que l'ET 1-21 pour induire une contraction (80). D'autre part, Fernandez-Patron et al. (1999) ont démontré, en incubant de la big-ET-1 avec la MMP-2 humaine, que cette dernière clivait la big-ET-1 entre les résidus Gly<sup>32</sup> et Leu<sup>33</sup> générant ainsi une endothéline de 32 a.a. (1-32) (81). Ils ont par la suite démontré, chez l'artère mésentérique de rat, que cette nouvelle ET (1-32) était un plus puissant vasoconstricteur que l'ET-1 (1-21). En effet, ils ont remarqué que l'ED<sub>50</sub>, dose à laquelle 50 % de l'effet est atteint, de l'ET (1-32) était de  $4.0 \pm 1.1$  pmol tandis que celui de l'ET-1 (1-21) était de  $27.7 \pm 8.2$  pmol.

### *1.2.3-Sécrétion de l'ET*

L'ET est sécrétée préférentiellement (80%) du côté abluminal lui conférant ainsi une action surtout paracrine et locale alors que seulement 20% de celle-

ci est sécrétée du côté luminale dans la circulation sanguine (82). La synthèse et la sécrétion de l'ET sont contrôlées par différents mécanismes autant stimulateurs qu'inhibiteurs. Il est généralement reconnu que cette régulation a lieu au niveau de la transcription et de la traduction de l'ARNm et qu'il n'y a pas de stockage de l'ET dans des vésicules de sécrétion. De nombreux facteurs provoquent l'augmentation d'expression de l'ARNm de la prépro-ET-1. L'angiotensine II, la thrombine, le TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ), l'interleukine-1, l'adrénaline, la vasopressine et bien d'autres facteurs favorisent tous la synthèse de l'ET (83). À l'opposé, le NO, la PGI<sub>2</sub>, l'héparine, le peptide natriurétique de l'oreillette (ANP) et les estrogènes diminuent la synthèse de l'ET.

Notons cependant que certains auteurs divisent les voies de sécrétion de l'ET en voie constitutive et voie régulée. La voie constitutive représente la relâche constante d'ET tandis que la voie régulée est constituée de vésicules de sécrétion emmagasinant de l'ET, de la big-ET et de l'ECE. En effet, il fut démontré que les corps de Weibel-Palade emmagasinaient des substances vasoactives telles l'histamine, le facteur de von Willebrand, de la P-sélectine et du CGRP (*Calcitonin Gene-Related Peptide*). Ces corps de Weibel-Palade contiendraient également de l'ET, de la big-ET et de l'ECE, permettant ainsi une hydrolyse de la big-ET à l'intérieur même de ces corps et ainsi le stockage d'ET (84).

L'ET est libérée de façon constitutive et joue un rôle dans le contrôle du tonus vasculaire. Haynes et Webb (1994) ont démontré par des études de plethysmographie que l'injection intra-artérielle d'antagonistes des récepteurs ET<sub>A</sub> de l'ET provoquait une augmentation du débit sanguin de l'avant-bras chez l'humain (85;86). Ceci suggère donc que l'ET est libérée de façon constitutive et maintient une contraction tonique basale. Le tonus basal vasculaire est donc maintenu en équilibre par la sécrétion continue de vasoconstricteurs, tel l'ET et de vasodilatateurs, tel le NO.

#### *1.2.4-Inactivation de l'ET*

L'ET possède une demie-vie plasmatique de seulement 7 minutes et est par conséquent dégradée rapidement. Des enzymes dégradantes de l'ET (EDEs) sont présentes et clivent l'ET en métabolites inactifs (87). La NEP 24.11 représente l'une de ces EDEs. En effet, Vijayaraghavan et al. (1990) ont démontré que la NEP 24.11 clivait l'ET-1 en trois étapes. Le premier clivage se fait entre les résidus Ser<sup>5</sup>-Leu<sup>6</sup> suivi d'un deuxième clivage entre les Asp<sup>18</sup>-Ile<sup>19</sup> et d'un troisième entre les résidus His<sup>16</sup>-Leu<sup>17</sup>. Puisque dans l'ET-2 et l'ET-3 les résidus Ser<sup>5</sup>-Leu<sup>6</sup> sont respectivement remplacés par les résidus Ser<sup>5</sup>-Trp<sup>6</sup> et Thr<sup>5</sup>-Tyr<sup>6</sup> le clivage de celles-ci par la NEP 24.11 s'effectue seulement en deux étapes (88).

### 1.2.5-Récepteurs Vasculaires de l'ET

L'ET agit sur deux types de récepteurs désignés ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>. Les gènes humains des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> ont respectivement été identifiés sur les chromosomes 4 et 13 (89;90). Ces récepteurs sont de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. D'autres récepteurs ont été caractérisés chez différentes espèces, e.g. le récepteur ET<sub>C</sub> chez les mélanophores de la grenouille *Xenopus laevis*, mais n'ont pas été identifiés chez les mammifères (91). Le récepteur ET<sub>A</sub> se situe au niveau des cellules musculaires lisses où il induit la contraction, l'hypertrophie et la prolifération de ces cellules (92;93). Ce récepteur possède une affinité plus grande pour l'ET-1 que pour l'ET-2 et encore plus que pour l'ET-3. Lorsque l'ET se lie au récepteur ET<sub>A</sub>, il y a activation de la protéine G<sub>q</sub> qui active à son tour l'effecteur PLC. La PLC clivera le phosphatidyl inositol bi-phosphate (PIP<sub>2</sub>) en inositol tri-phosphate (IP<sub>3</sub>) et diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub> induira la relâche de Ca<sup>2+</sup> du réticulum sarcoplasmique permettant ainsi l'augmentation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire nécessaire à la contraction de la cellule musculaire lisse. Le DAG pour sa part peut activer des canaux Ca<sup>2+</sup> membranaires ainsi que la protéine kinase C (PKC) qui phosphorylera différentes cibles. L'entrée de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire suivant l'activation du récepteur ET<sub>A</sub> et provoquant ainsi la contraction a classiquement été associée aux canaux Ca<sup>2+</sup> voltage-dépendants (94;95). Toutefois, certaines études ont démontré que l'entrée de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire s'effectuait davantage par des canaux cationique non-sélectifs. D'ailleurs, Zhang et al.

(1998) ont démontré, chez l'aorte thoracique de rat, que l'utilisation de nifédipine, un antagoniste des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants de type L, n'avait aucun effet sur la contraction induite par l'ET-1 mais que le SK & F 96365, un bloqueur des canaux cationiques non-sélectifs, inhibait de façon concentration-dépendante la contraction induite par l'ET-1 (96). Ils ont également démontré dans le même article que le NO inhibait l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire induite par l'ET-1 en supprimant l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par les canaux cationiques non-sélectifs. Le récepteur  $\text{ET}_A$  peut donc également être couplé à une protéine Gs qui activerait directement les canaux cationiques non-sélectifs et permettrait l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  nécessaire à la contraction. Bien que le récepteur  $\text{ET}_A$  soit généralement considéré comme vasoconstricteur et pro-mitogénique, certaines études ont démontré que l'activation de ce récepteur pouvait induire la relâche de prostaglandines vasodilatatrices et l'augmentation de l'AMPc (97;98).

Le récepteur  $\text{ET}_B$  est pour sa part majoritairement situé au niveau des cellules endothéliales quoiqu'il soit également présent sur les cellules musculaires lisses. Le récepteur  $\text{ET}_B$  n'a pas d'affinité particulière pour les trois différentes isoformes (99). Le récepteur  $\text{ET}_B$  endothélial induira une vasodilatation via la production de NO et de  $\text{PGI}_2$  qui diffuseront vers les cellules musculaires lisses et relaxeront ces dernières. Le récepteur  $\text{ET}_B$  endothélial est également responsable de l'extraction de l'ET circulante par internalisation du complexe récepteur-ET (100;101). Le récepteur  $\text{ET}_B$  musculaire lisse médie pour sa part les mêmes effets que le récepteur  $\text{ET}_A$  et

ceci via les mêmes voies de signalisations intracellulaires (102;103). Certaines études ont également démontré que le récepteur ET<sub>B</sub> était responsable de la synthèse de TxA<sub>2</sub> (104;105).

Plusieurs antagonistes soit sélectifs pour l'un ou l'autre des récepteurs ou non-sélectifs ont été développés au cours des années. Les antagonistes utilisés dans les études de la présente thèse sont le LU135252 et le BSF420627. Le LU135252 est un antagoniste sélectif pour les récepteurs ET<sub>A</sub> (K<sub>i</sub> ET<sub>A</sub> : 1.4 nM, K<sub>i</sub> ET<sub>B</sub> : 184 nM) possédant une biodisponibilité de 86 % et une demie-vie plasmatique de 10 heures. Le BSF420627 est pour sa part un antagoniste non-sélectif (K<sub>i</sub> ET<sub>A</sub> : 2.2 nM, K<sub>i</sub> ET<sub>B</sub> : 5.8 nM) possédant une biodisponibilité de 60 % et une demie-vie plasmatique de 2 heures. Les principaux antagonistes mentionnés dans la présente thèse sont le BQ788, un antagoniste sélectif pour les récepteurs ET<sub>B</sub>, le BQ123, un antagoniste sélectif pour les récepteurs ET<sub>A</sub>, et le bosentan, un antagoniste non-sélectif.

#### *1.2.6-Effets Vasculaires de l'ET*

Au niveau vasculaire, l'injection intra-artérielle ou intraveineuse d'ET-1 induit un effet biphasique constitué initialement d'une légère vasodilatation transitoire suivie d'une vasoconstriction soutenue. La vasodilatation transitoire initiale est attribuable à l'interaction de l'ET-1 avec les récepteurs ET<sub>B</sub> endothéliaux tandis que la vasoconstriction soutenue est attribuable à



l'interaction de l'ET-1 avec les récepteurs, ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>, présents au niveau des cellules musculaires lisses.

Comme mentionné précédemment, l'ET-1 possède également une activité pro-mitogénique, c'est-à-dire quelle peut induire la prolifération de différents types cellulaires incluant les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules endothéliales et les fibroblastes. Cette activité pro-mitogénique a été démontrée dans de nombreuses études à la fois chez l'animal et chez l'humain (106-113).

Hirata et al. (1989) ont premièrement démontré que l'ET augmentait l'incorporation de H<sup>3</sup>-thymidine dans les cellules musculaires lisses d'aorte de rat (106). Il fut également démontré que l'ET peut activer les voies des "Mitogen Activated Protein Kinase" (MAPK) tels "*Extracellular Signal-Related Kinase 1-2*" (ERK1/2), "*C-Jun N-terminal Kinase*" (JNK) et p38 MAPK (107). L'ET activerait la voie des MAPKs de plusieurs façons. Comme mentionné précédemment, les récepteurs de l'ET sont couplés à une protéine Gq. Celle-ci se subdivise en deux sous-unités, soit Gαq et Gβγ. Les MAPKs peuvent, premièrement, être activées par la PKC qui elle-même est activée par la voie de Gαq-PLC-DAG (108). Les MAPKs peuvent également être activées par la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) qui elle-même est stimulée par la sous-unité Gβγ (108). De plus, Foschi et al. (1997) ont démontré que l'ET-1 provoquerait une phosphorylation tyrosine dépendante de Shc dans les

cellules glomérulaires de rats (109). Shc se lie par la suite au Grb2 et Sos1 est recruté résultant ainsi en l'activation de p21<sup>Ras</sup> qui peut par la suite stimuler la voie de ERK. Bien que l'activité pro-mitogénique fut classiquement associée au récepteur ET<sub>A</sub>, différentes études ont démontré l'implication des récepteurs ET<sub>B</sub> dans ce phénomène. Wang et al. (1994) ont démontré chez des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*) exprimant soit le récepteur ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> humain que les deux types de récepteurs provoquaient l'incorporation de H<sup>3</sup>-thymidine et l'activation de MAPK (110). De plus, Davie et al. (2002) ont démontré que dans les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires humaines isolées avec une proportion égale de récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>, l'ET-1 stimulait la synthèse d'ADN via les deux récepteurs (111).

De façon similaire, l'ET-1 induit également la prolifération des cellules endothéliales. En effet, il fut démontré que l'ET-1 pouvait promouvoir la prolifération, la migration et l'invasion de HUVECs de façon dose-dépendante (112). Cet effet était bloqué par le BQ788 suggérant ainsi que les récepteurs ET<sub>B</sub> étaient responsables de la réponse angiogénique à l'ET-1. L'ET-1 fut également démontrée apte à augmenter l'effet angiogénique du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (112).

L'ET-1 peut également induire la synthèse et la déposition de collagène. En effet, Rizvi et al. (1996) ont démontré que l'ET-1 stimulait la synthèse de collagène de type I dans des cellules musculaires lisses d'artères coronaires et d'aortes de porc. Ces effets semblent médiés en bonne partie par les

récepteurs  $ET_A$  puisque le BQ123 diminue de façon significative cette synthèse de collagène (113).

### *1.2.7-Effets Cardiaques de l'ET*

Les récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  sont tous deux présents au niveau des cardiomyocytes et des fibroblastes cardiaques. Les récepteurs  $ET_A$  sont toutefois majoritaires (90%) sur les cardiomyocytes. Au niveau cardiaque, l'ET-1 induit des effets inotropes et chronotropes positifs via l'augmentation de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  (114;115).

L'ET-1 favorise également le développement de l'hypertrophie cardiaque. Bogoyevitch et al. (1994) ont démontré que l'ET-1 provoquait l'activation des MAPKs dans les cardiomyocytes de rats néonataux (116). Le même groupe a par la suite démontré, toujours dans les cardiomyocytes de rats néonataux, que l'ET-1 stimulait l'activation de ERK et JNK (117). L'étude de Ueyama a démontré que l'activation de p38MAPK par l'ET-1 dans les cardiomyocytes de rats néonataux était bloquée par le BQ123, un antagoniste des récepteurs  $ET_A$ , et non pas par le BQ788, un antagoniste des récepteurs  $ET_B$ , suggérant ainsi que les récepteurs  $ET_A$  étaient responsables de cette activation (118). Il fut également démontré que l'induction de MAPK, de raf-1 et d'hypertrophie des cardiomyocytes de rats néonataux par un stress mécanique était complètement bloquée par le BQ123 et non pas par le BQ788 (119).

Dans les fibroblastes cardiaques de rats l'ET-1 augmente la synthèse de collagène de type I et III (120). Cette synthèse n'est pas bloquée par un antagoniste des récepteurs ET<sub>A</sub> suggérant ainsi un rôle possible des récepteurs ET<sub>B</sub> dans la fibrose cardiaque. Katwa et al. (1993) ont d'ailleurs démontré que le pourcentage de récepteur ET<sub>B</sub> était de 60 % dans les fibroblastes cardiaques de rats (121). De plus, Hocher et al. (1999) ont récemment démontré que la fibrose cardiaque dans les ventricules hypertrophiés de rats avec hypertension réno-vasculaire était améliorée par un antagoniste des récepteurs ET<sub>B</sub> mais non pas par un antagoniste ET<sub>A</sub> (122).

#### *1.2.8-L'ET dans l'Embryogénèse*

L'ET joue un rôle primordial dans le développement du fœtus tel que démontré par de nombreuses anomalies chez les souris knock-out pour l'ET. En effet, des souris déficientes en ET-1 et ET<sub>A</sub> meurent à la naissance par asphyxie dû à des malformations de la crête neurale (123;124). Ces souris présentent également des malformations cranio-faciale importantes. Les souris déficientes en ET-1, ET<sub>A</sub> et ECE-1 démontrent également des malformations cardiaques tels que des défauts de septum ventriculaire, la coarctation de l'aorte, l'absence d'artère sous-clavière droite et la présence de crosse aortique du côté droit (125;126).

### *1.2.9-Implications Physiopathologiques de l'ET*

Une augmentation des niveaux circulants d'ET-1 se retrouve dans diverses conditions pathologiques cardiovasculaires chez l'humain, telles l'insuffisance cardiaque, l'hypertension artérielle, l'athérosclérose et l'hypertension pulmonaire de différentes étiologies (127-133). L'ET-1 jouerait également un rôle dans la resténose, l'ischémie-reperfusion, le diabète et le cancer (134-136). Dans différents modèles animaux reproduisant ces conditions et quelques études cliniques, les antagonistes des récepteurs de l'ET, autant sélectifs pour les récepteurs ET<sub>A</sub> que non-sélectifs, se sont démontrés efficaces à divers degrés suggérant ainsi qu'une activation du système ET contribue, du moins en partie, à ces mécanismes physiopathologiques.

#### *1.2.9.1-Insuffisance Cardiaque*

En 1990, Margulies et al. démontraient que les niveaux plasmatiques d'ET-1 étaient doublés chez les chiens ayant subis 8 jours de surstimulation cardiaque (137). Peu de temps après, McMurray et al. (1992) démontraient que les niveaux d'ET-1 plasmatiques étaient doublés chez 47 patients avec insuffisance cardiaque (127). L'augmentation des niveaux plasmatiques et tissulaires de l'ET-1 et de la big-ET-1 dans l'insuffisance cardiaque furent par la suite démontré dans de nombreux modèles animaux ainsi que chez l'humain (138-140). Une corrélation positive entre l'augmentation des niveaux d'ET-1 ainsi que de big-ET-1 et la sévérité de l'insuffisance cardiaque fut

même démontrée (139). D'une part, l'augmentation des niveaux plasmatiques d'ET-1 démontre une corrélation négative avec la fraction d'éjection ventriculaire gauche et l'index cardiaque et une corrélation positive avec la classe fonctionnelle et la pression télédiastolique de ventricule gauche (139). Omland et al. (1994) ont également établis que la concentration plasmatique d'ET-1 était un pronostic important de la mortalité un an après un infarctus du myocarde (140). Pour sa part, l'augmentation des niveaux plasmatiques de big-ET-1 fut corrélée négativement avec la fraction d'éjection et positivement avec la pression télédiastolique ventriculaire gauche et la mortalité à court terme (141;142). L'augmentation des niveaux plasmatiques d'ET-1 dans l'insuffisance cardiaque semble dû à la fois à une diminution de la clairance de l'ET-1 circulante ainsi qu'à une augmentation de sa production (138).

L'ET exerce plusieurs rôles dans l'insuffisance cardiaque. En effet, l'ET-1 peut contribuer au développement de l'insuffisance cardiaque en exerçant des effets presseurs, en augmentant l'action de d'autres peptides vasoactifs et comme mentionné précédemment en stimulant l'hypertrophie et la fibrose cardiaque (143;144). De plus, des effets non-cardiaques de l'augmentation des niveaux d'ET-1 contribuent également au développement de l'insuffisance cardiaque. Entre-autres, au niveau rénal, l'activation du système ET diminue de façon importante le débit rénal et le taux de filtration glomérulaire en plus d'augmenter la rétention de sodium et par conséquent le volume circulant. Récemment, Ding et al (2002) ont d'ailleurs démontré, chez des rats ayant subis un infarctus du myocarde, qu'un traitement de 8

semaines avec le bosentan, un antagoniste non-sélectif, améliorait de façon significative le débit plasmatique rénal et l'excrétion de sodium (145).

Les antagonistes de l'ET ont été démontrés efficaces dans divers modèles animaux d'insuffisance cardiaque. Mulder et al. (1997) ont démontré, chez le modèle d'infarctus chez le rat, qu'un traitement de neuf mois avec le bosentan améliorait de façon significative la survie, la pression artérielle et le débit cardiaque (146). Deux mois seulement après le début de ce traitement, une diminution de la pression télédiastolique ventriculaire gauche, de la dilatation du ventricule gauche, de l'hypertrophie cardiaque ainsi que de la densité du collagène dans le ventricule gauche était déjà présente. Le même groupe a par la suite démontré chez le même modèle qu'un traitement de dix semaines avec le LU135252, un antagoniste sélectif pour les récepteurs ET<sub>A</sub>, améliorait de façon significative les pressions systolique et télédiastolique du ventricule gauche, le débit cardiaque ainsi que la fraction de raccourcissement et la densité de collagène du ventricule gauche (147). L'effet bénéfique du LU135252 fut également établi dans le modèle de chien avec surstimulation cardiaque tel que démontré par l'amélioration de la pression de l'artère pulmonaire, de la pression télédiastolique du ventricule gauche et du débit cardiaque après trois semaines de traitement (148).

Quelques études cliniques ont également démontré l'efficacité des antagonistes de l'ET, autant sélectifs pour les récepteurs ET<sub>A</sub> que non-sélectifs, dans le traitement de l'insuffisance cardiaque chez l'humain (149-

154). Spieker et al. (2000) ont démontré l'efficacité du blocage aigu des récepteurs ET<sub>A</sub> chez l'humain. Ils ont établi que des patients insuffisants cardiaques de classe NYHA II et III avec une fraction d'éjection inférieure à 35% recevant une seule dose de LU135252 démontraient une amélioration dose-dépendante de l'index cardiaque, des pressions artérielles et pulmonaires moyennes ainsi que des résistances vasculaires systémiques et pulmonaires (152). D'autre-part, Sötsch et al. (1998) ont démontré l'efficacité aigu et à court terme du bosentan sur l'amélioration des pressions et résistances vasculaires artérielles et pulmonaires ainsi que le débit cardiaque chez des patients insuffisants cardiaques de classe fonctionnelle NYHA III (151). Des études cliniques chroniques vérifiant l'efficacité des antagonistes de l'ET ont également été réalisées au cours des dernières années. L'étude REACH-1 (*Research on Endothelin Antagonist in Chronic Heart failure*) a évalué l'effet à long terme d'une dose de 500 mg/bid de bosentan chez des patients insuffisants cardiaques. Malgré une amélioration des symptômes, cette étude fut arrêtée précocement puisqu'elle fut associée à une augmentation des enzymes hépatiques et une diminution de l'hématocrite chez près de la moitié des patients (154). Par la suite, l'étude OLE (*Open-Label Extension*), une extension de l'étude REACH-1 utilisant seulement une dose de 125 mg/bid pendant six mois a démontré une amélioration de la classe fonctionnelle NYHA chez les patients insuffisants cardiaques. Une augmentation des enzymes hépatiques fut détectée chez un seul des patients de l'étude OLE (155). Les résultats préliminaires de l'étude ENABLE (*Endothelin Antagonist Bosentan for Lowering Cardiac Events in Heart*



*Failure*) ont récemment été présentés (156). Le critère primaire de mortalité ou de ré-hospitalisation pour insuffisance cardiaque fut rencontré dans 40% des patients placebo et 39% des patients recevant le bosentan (125 mg/ 2 fois par jour). De plus, dans cette étude, le bosentan semblait provoquer une rétention accru de liquide peu après le début du traitement. Une autre étude, utilisant des doses inférieures, est en voie de réalisation.

#### *1.2.9.2-Hypertension artérielle*

Étant donné ses propriétés vasoconstrictrices et prolifératives pour les cellules musculaires lisses vasculaires, l'ET-1 pourrait être un médiateur important dans l'hypertension artérielle (HTA). Larivière et al. (1993) ont d'ailleurs démontré une augmentation de l'expression de l'ARNm de la prépro-ET-1 dans l'aorte et l'artère mésentérique de rats déoxycorticostérone acétate (DOCA)-sel (157). Une étude ultérieure a démontré que le bosentan atténuait de façon significative la pression systolique artérielle ainsi que l'hypertrophie vasculaire et le remodelage d'artères mésentériques de rat DOCA-sel, suggérant ainsi que l'ET contribuait au développement d'hypertension dans ce modèle (158). La contribution de l'ET-1 à l'HTA fut suggérée dans d'autres modèles animaux. D'Uscio et al. (1997) ont démontré que le rat Dahl sensible au sel démontrait une augmentation de la pression systolique artérielle, de l'épaisseur de la média et du ratio média/lumière des artères basilaires et mésentériques. De plus, cette étude a démontré qu'un traitement de 8 semaines avec le LU135252 diminuait de façon significative

la pression systolique artérielle ainsi que les changements structuraux des artères basilaires et mésentériques (159). Une augmentation d'expression fut également démontrée dans le cœur et l'aorte de rats Goldblatt, qu'il s'agisse du modèle un rein/ une agrafe (*one kidney/one clip*) ou du modèle deux reins/ une agrafe (*two kidneys/one clip*) (160). Cependant les niveaux d'expression de l'ET-1 n'ont pas été démontrés différents des rats normaux chez le rat *SHR* (*Spontaneously Hypertensive Rats*) suggérant que l'ET n'était pas impliquée dans ce modèle d'HTA (161). De plus, l'étude de Li et Schiffrin (1995) n'a démontré aucune amélioration de la pression systolique artérielle et du remodelage vasculaire d'artères coronaires, rénales, mésentériques et fémorales suite à un traitement de quatre semaines avec le bosentan chez le rat SHR (162). Toutefois, Miyauchi et al. (1989) ont démontré que la réponse maximale à une dose de 2000 pmol/kg d'ET-1 était significativement augmentée chez le rat SHR comparé au rat wistar Kyoto (163). L'implication du système ET dans le modèle d'hypertension génétique du rat SHR reste donc toutefois à être clarifiée.

Chez l'humain, quelques études ont démontré une augmentation des niveaux plasmatiques d'ET-1 chez les patients atteints d'HTA modérée à sévère. En effet, dès 1990 Saito et al. démontraient que les niveaux d'ET-1 plasmatiques étaient pratiquement doublés chez 20 patients avec HTA (128). De plus, ces niveaux d'ET-1 corrélaient de façon positive avec la classe d'HTA (selon la classification du *World Health Organization*). Schiffrin et al. (1997) ont démontré une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'ET-1 dans les

petites artères de résistances sous-cutanées lorsqu'il y avait présence d'HTA modérée et sévère (129). Par la suite, il fut démontré que la vasoconstriction induite par l'ET-1 était augmentée dans la circulation de patients HTA comparé aux normotensifs (164). Il fut également démontré que le blocage aigu des récepteurs de l'ET augmentait le débit sanguin et améliorait la réponse vasodilatatrice à l'acétylcholine dans l'avant-bras de patients avec HTA (165). L'administration de bosentan à des patients avec HTA pour quatre semaines améliore de façon significative les pressions artérielles systoliques et diastoliques (166). Des études cliniques à plus long terme sont donc à prévoir dans les années à venir.

#### *1.2.9.3-Athérosclérose*

De nombreuses études ont démontré des niveaux plasmatiques et tissulaires d'ET-1 augmentés ceci à la fois chez différents modèles animaux que chez l'humain atteint d'athérosclérose. Entre-autres, Miyauchi et al. (1992) ont démontré l'augmentation des niveaux d'ET-1 plasmatiques chez les rats nourris avec une diète riche en cholestérol (167). D'autre part, une étude de Lerman a retrouvé des niveaux plasmatiques et tissulaires d'ET-1 augmentés chez des patients atteints d'athérosclérose (130). Iwasa a récemment décrit qu'il y avait augmentation de l'ET-1 et des récepteurs ET<sub>B</sub> dans les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules spumeuses, les macrophages et les lymphocytes T dans les lésions athérosclérotiques de l'humain (168). Minamino et al. (1997) ont pour leur part démontré une augmentation de

l'expression de l'ECE-1 dans les cellules musculaires lisses vasculaires et les macrophages, à la fois chez le rat ayant subi une désendothélisation avec un ballon que chez la plaque athéromateuse humaine (169). Une augmentation des LDL (*Low Density Lipoproteins*) oxydés semble jouer un rôle primordial dans l'augmentation des niveaux d'ET-1. L'étude de Boulanger et al. (1992) a démontré une augmentation concentration-dépendante de l'expression de l'ARNm de la préproET-1 et de la relâche d'ET-1 dans les cellules endothéliales d'aorte porcine et humaine suite à une stimulation avec les LDL oxydés (170).

L'ET peut exercer plusieurs rôles dans le développement d'une plaque athérosclérotique. L'ET peut premièrement exercer un effet de chemoattraction sur les monocytes circulants, activer les macrophages et augmenter l'expression de molécules d'adhésions sur les cellules endothéliales (171;172). De plus, comme décrit précédemment, l'ET peut induire la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et des fibroblastes et promouvoir la production de collagène contribuant ainsi à la formation de la plaque athéromateuse.

Les antagonistes des récepteurs de l'ET ont été démontrés efficaces dans différents modèles animaux associés avec le développement d'athérosclérose. Kowala et al. (1995) ont démontré une diminution du nombre et de la taille des cellules spumeuses de respectivement 81% et 36% chez le hamster recevant une diète riche en cholestérol suite à un traitement

de 21 jours avec le BMS-182874, un antagoniste sélectif pour les récepteurs ET<sub>A</sub> (173). L'efficacité du LU135252 fut démontrée dans un modèle de souris déficientes en apolipoprotéine E (174). En effet, le traitement de ce type de souris avec le LU135252 pendant 30 jours améliore la relaxation NO-dépendante de l'aorte ainsi que les niveaux circulants de nitrates. De plus, ce traitement diminue l'aire occupée par des plaques athéromateuses de 31% ainsi que la grosseur des lésions de 20%.

#### *1.2.9.4-Hypertension pulmonaire*

Par ses effets presseurs, pro-mitogéniques et pro-fibrotiques, l'ET-1 peut contribuer au développement de l'hypertension pulmonaire (HTP). Une augmentation des niveaux plasmatiques et tissulaires d'ET-1 fut d'ailleurs démontrés dans différents modèles animaux d'HTP, tels le rat monocrotaline (MCT), le rat hypoxique, le rat insuffisant cardiaque et le chien avec embolie pulmonaire (175-179). Il fût également démontré, dès 1991, que les niveaux plasmatiques d'ET-1 étaient augmentés dans l'HTP humaine. En effet, Stewart et al. identifiaient que les niveaux plasmatiques d'ET-1 étaient doublés chez 27 patients dont 7 étaient atteints d'HTP primaire et 20 d'HTP secondaire (131). Une augmentation des niveaux plasmatiques et tissulaires d'ET-1 fut par la suite démontrée dans différents types d'HTP, tels l'HTP primaire, l'HTP secondaire à l'insuffisance cardiaque gauche, l'HTP persistante du nouveau-né, l'HTP associée à la haute altitude, l'HTP foétale et l'HTP associée aux maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC)

(132;133;180-183). L'augmentation des niveaux d'ET-1 chez les patients hypertendus pulmonaires pourrait être due en partie à une diminution de la clairance pulmonaire d'ET-1 (184). Une augmentation des niveaux plasmatiques de big-ET-1 fut également décrite dans l'HTP (185;186). De plus, il fut récemment démontré que les niveaux de big-ET-1 et d'ET-1 corrélaient de façon positive avec les pressions et résistances vasculaires pulmonaires et de façon négative avec le débit cardiaque, l'index cardiaque et la tolérance à l'effort (186).

Plusieurs études ont également démontré des changements d'expression des récepteurs de l'ET lors d'HTP. Une augmentation de l'expression des récepteurs ET<sub>B</sub> dans les artères et veines pulmonaires fut démontrée dans le modèle de rats hypoxiques (177;187). Une diminution de l'expression des récepteurs ET<sub>B</sub> pulmonaires fut toutefois démontrée dans les modèles de rats monocrotalines et de rats insuffisants cardiaques (175;179). Notons toutefois que cette diminution d'expression du récepteur ET<sub>B</sub> fut observée dans le poumon entier (voie aérienne + parenchyme + voie vasculaire) et non pas dans les artères et veines pulmonaires isolées. L'étude de Li et al. (1994) a d'ailleurs démontré que bien qu'il y ait augmentation de l'expression du récepteur ET<sub>B</sub> sans changement de celle du récepteur ET<sub>A</sub> dans l'artère pulmonaire de rats hypoxiques, l'expression du récepteur ET<sub>A</sub> était augmentée et celle du récepteur ET<sub>B</sub> inchangée dans le poumon entier (177). Chez l'humain, une augmentation de l'expression du récepteur ET<sub>B</sub> fut démontrée dans les artères pulmonaires de patients atteints d'HTP associée

à des thromboembolies (185). Une augmentation des récepteurs ET<sub>A</sub> sur les artères et veines pulmonaires fut identifiée chez le rat hypoxique (187;188). Une diminution de la densité du récepteur ET<sub>A</sub> sur l'aorte et l'artère pulmonaire fut toutefois démontrée chez l'humain atteint de cardiomyopathie dilatée, de maladies cardiaques ischémiques et d'HTP primaire (189). Cette diminution de densité fut suggérée comme une réponse adaptative du récepteur ET<sub>A</sub> suite à l'élévation des niveaux d'ET-1. La modulation de l'expression pulmonaire des récepteurs de l'ET semble donc différer selon le modèle d'HTP. Une augmentation à la fois des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> dans le ventricule droit fut établie dans différents modèles animaux, tels les modèles hypoxique et monocrotaline (177;190).

Les antagonistes des récepteurs de l'ET, autant sélectifs pour les récepteurs ET<sub>A</sub> que non-sélectif, ont été démontrés efficaces dans différents modèles animaux d'HTP. Dans le modèle de rats hypoxiques, Bonvallet et al. (1994) ont d'abord établis que le BQ123 atténuait de façon significative l'augmentation des pressions et résistances vasculaires pulmonaires ainsi que le développement d'hypertrophie ventriculaire droite (93). Il fut par la suite démontré chez le même modèle que le BQ123 pouvait également renverser l'HTP déjà bien établie et atténuer la progression de l'hypertrophie ventriculaire droite lorsque l'administration de celui-ci était commencée deux semaines après le début de la stimulation hypoxique (191). De façon similaire le bosentan a été démontré efficace autant pour prévenir le développement d'HTP que pour renverser l'HTP déjà établie dans le modèle de rats

hypoxiques (192). Dans le modèle de rat MCT, le LU135252 atténue l'augmentation de la pression systolique ventriculaire droite ainsi que le développement d'hypertrophie du ventricule droit de respectivement 42% et 28% sans toutefois améliorer l'hypertrophie des petites artères pulmonaires (193). Une amélioration de la pression systolique ventriculaire droite et de l'hypertrophie du ventricule droit de respectivement 39% et 23% fut également démontré lorsque le LU135252 était débuté deux semaines après l'injection de MCT (194). Le bosentan fut lui aussi efficace dans le modèle MCT tel que démontré par l'amélioration de la pression systolique et de l'hypertrophie du ventricule droit ainsi que de l'hypertrophie des petites artères pulmonaires (195). Dans cette même étude, le bosentan améliorait l'hypertrophie du ventricule droit même lorsque son administration était débutée dix jours après l'injection de MCT. Dans le modèle de rats avec HTP secondaire à un infarctus du myocarde, le LU135252, débuté 24 heures après la ligature coronarienne, améliore de façon significative les pressions pulmonaires et l'hypertrophie ventriculaire droite sans toutefois améliorer la fonction ventriculaire gauche (196). Les antagonistes des récepteurs de l'ET furent également démontré efficaces dans différents autres modèles animaux d'HTP, tels le porc et l'agneau hypoxiques, le porc avec pontage cardiopulmonaire (déviation de la circulation sanguine du cœur et des poumons par l'installation d'un circuit permettant au sang de passer de la veine cave ou l'oreillete droite à l'aorte), le chien avec embolie pulmonaire, le porc avec choc endotoxique, le chien avec surstimulation cardiaque, et le chien déhydromonocrotaline (197-203).



Quelques études ont également évalué l'efficacité des antagonistes des récepteurs de l'ET dans le traitement de l'HTP chez l'humain. Une étude aigue avec le sitaxsentan, un antagoniste sélectif pour les récepteurs ET<sub>A</sub>, a d'abord démontrée l'amélioration des pressions systoliques et des résistances vasculaires pulmonaires après six heures d'infusion intraveineuse chez 48 patients avec HTP secondaire à l'insuffisance cardiaque (204). Une administration de 6 heures de bosentan chez 7 femmes atteintes d'HTP primaire ou isolée a également améliorée les pressions et résistances pulmonaires tout en diminuant cependant les pressions et résistances systémiques (205). Une étude chronique de 12 semaines a récemment démontré l'efficacité du sitaxsentan chez 20 patients atteints d'HTP artériolaire (206). En effet, les patients recevant le sitaxsentan présentaient une amélioration de leur capacité à l'exercice telle qu'évaluée par le test de six minutes de marche en plus de présenter une amélioration des pressions et des résistances pulmonaires. Une récente étude, contenant cette fois-ci 213 patients atteints d'HTP artériolaire, a démontré l'efficacité de bosentan sur une période de 12 semaines (207). Les patients de cette étude présentaient une amélioration de la capacité à l'effort, de la dyspnée et de la classe fonctionnelle comparé au groupe placebo. Les patients recevant le bosentan avaient également un taux de réhospitalisation plus faible que les non-traités.

### *1.2.9.5-Autres pathologies*

L'ET-1 est également impliquée dans le phénomène de resténose. En effet, l'administration d'antagonistes des récepteurs de l'ET fut démontrée efficace pour prévenir la formation de néointima dans de nombreux modèles animaux de resténose. Dans le modèle de resténose induite par angioplastie dans des artères coronaires de rats, les antagonistes de l'ET ont diminué d'environ 50% la formation de néointima (134). De façon similaire, les antagonistes de l'ET diminuent la formation de néointima ainsi que la déposition de collagène dans les modèles d'angioplasties des artères iliaques et artères carotides de porc (208). De plus, les antagonistes de l'ET diminuent également l'hyperplasie de l'intima induite par l'installation d'endoprothèse chez le porc (209).

L'ET-1 joue également un rôle dans l'ischémie-reperfusion. Chez le rat ayant subi une occlusion d'une heure suivie de 24 heures de reperfusion, le TAK-044, un antagoniste non-sélectif, réduit de façon dose-dépendante la taille de l'infarctus (135). Brunner et al. (1998) ont par la suite démontré qu'un antagoniste sélectif pour les récepteurs ET<sub>A</sub> ou un antagoniste non-sélectif pouvait tous deux améliorer la relaxation diastolique, le débit cardiaque ainsi que la pression développée par le ventricule gauche chez les cœurs de rats ayant subi de l'ischémie-reperfusion (210). Chez le chien subissant 90 minutes d'occlusion coronaire suivie de 180 minutes de reperfusion, le LU135252 a amélioré le débit cardiaque et l'étendue de la zone myocardique

à risque (211). Les effets cardioprotecteurs des antagonistes de l'ET dans l'ischémie-reperfusion seraient en parties provoqués par le NO. En effet, Gourine et al. (2001) ont démontré que le LU135252 diminuait la taille de l'infarctus par rapport à la taille de la zone à risque de 79% à 43% chez le porc soumis à l'ischémie-reperfusion. L'addition de L-NNA (N(G)-nitro-L-arginine), un bloqueur de la NOS, augmentait ce rapport à 76% alors que l'addition de la L-arginine diminuait ce rapport à 56% (212). L'addition de L-arginine peut diminuer la taille de l'infarctus en réduisant l'accumulation de neutrophiles, en inhibant la formation de radicaux libres et en préservant la fonction endothéliale après l'ischémie (213). De plus, les antagonistes de l'ET se sont démontrés efficaces pour prévenir l'adhésion des neutrophiles lors d'ischémie-reperfusion (214).

L'ET-1 jouerait également un rôle dans les complications du diabète telles entres-autres l'hypertension, l'athérosclérose, la néphropathie, la rétinopathie et les maladies cérébrovasculaires. Notons que le rôle de l'ET-1 dans l'hypertension et l'athérosclérose a été décrit en détails dans les sections précédentes. Chez le modèle de rats avec injection de streptozotocine, induisant ainsi un diabète de type I, les antagonistes de l'ET ont diminué l'excrétion urinaire de protéines, la clairance de créatinine ainsi que l'expression glomérulaire du collagène I, III et IV, de la laminine B1 et B2, du TNF- $\alpha$ , du TGF- $\beta$ , du bFGF et du PDGF-B (215). Chez ce même modèle, les antagonistes de l'ET diminuent également la pression artérielle systolique,

l'excrétion rénale d'albumine, l'expression rénale d'ET-1 ainsi que l'excrétion urinaire d'ET-1 (216;217). D'autre part, le BQ123 fut démontré efficace pour contrer la diminution du flot sanguin de la rétine de rats diabétiques (218). Une augmentation de l'expression de l'ET-1, de l'ET-3, du récepteur ET<sub>A</sub> et du récepteur ET<sub>B</sub> fut également notée dans la rétine de rats streptozotocine (219). Notons également que dans ce modèle de diabète de type I, le bosentan améliore le poids des artères mésentériques, le ratio paroi-lumière ainsi que l'infiltration de mastocytes (220). Les antagonistes de l'ET améliorent même la vitesse de conduction des nerfs moteurs chez ce type de rats (221). Dans un modèle de diabète de type II tel le rat Goto Kakizaki, les antagonistes de l'ET sont efficaces pour diminuer la concentration plasmatique de glucose de 225±19 mg/dl à 101±8 mg/dl et pour rétablir la clairance du glucose (222).

L'ET-1 fut également impliquée dans le développement de plusieurs cancers. L'expression d'ET-1 et des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> ainsi que la production d'ET-1 furent détectées dans des cellules provenant de patients atteints du sarcome de Kaposi (223). De plus, l'utilisation de BQ788 ou de BQ123 se sont tous deux avérés efficaces pour réduire le taux de croissance de ces cellules. L'expression d'ET-1 fut également démontrée dans des cellules provenant de cancer de la prostate (136). L'application exogène d'ET-1 à ces cellules induit la prolifération du cancer prostatique. Cette prolifération fut inhibée par un antagoniste des récepteurs ET<sub>A</sub>. Il fut également démontré que le BQ788 mais non pas le BQ123 pouvait inhiber la croissance de

cellules provenant de mélanomes humains (224). La production d'ET-1 ainsi que l'expression des deux types de récepteurs fut également décrite dans le cancer colorectal (225). Chez ce type cellulaire, l'ET-1 augmentait de façon dose dépendante le nombre de cellules. Notons que cette prolifération pouvait être inhibée par le BQ123 mais non pas par le BQ788. Une augmentation de l'expression de l'ET-1 fut également décrite dans les cancers ovariens et les cancers du col utérin (226;227).

Notons qu'une augmentation des niveaux plasmatiques et tissulaires d'ET-1 fut également notée dans la cirrhose hépatique, le vasospasme cérébral, l'asthme et l'insuffisance rénale (228-234). D'ailleurs, les antagonistes de l'ET ont été démontrés efficaces pour diminuer l'hypertension portale et l'expression de collagène hépatique chez les rats cirrhotiques (235). Chez les chiens et les lapins avec vasospasme cérébral suite à une hémorragie subarachnoïdienne, les antagonistes de l'ET diminuent le rétrécissement et la vasoconstriction des artères basilaires (236;237). De plus, chez le modèle de souris avec asthme allergique, les antagonistes de l'ET réduisent l'accumulation de macrophages et l'infiltration d'éosinophiles (238). Finalement, chez le rat avec insuffisance rénale aigue, le BQ123 augmente la survie de 75% en améliorant la réabsorption de sodium, l'excrétion de potassium et le taux de filtration glomérulaire (239).

### ***1.3-Hypertension Pulmonaire***

La circulation pulmonaire est un système à faible pression avec une pression moyenne de l'artère pulmonaire se situant à environ 12-15 mmHg. Cette circulation doit cependant accommoder tout le débit cardiaque. Ceci est donc possible grâce à la faible résistance vasculaire de la circulation pulmonaire. L'hypertension pulmonaire (HTP) est définie comme l'augmentation des pressions artérielles pulmonaires suites à différentes pathologies. L'HTP est un problème hémodynamique pouvant résulter en la défaillance cardiaque droite ainsi que la mort subite. On définit une HTP légère lorsque la pression artérielle pulmonaire moyenne se situe entre 26 et 35 mmHg, une HTP modérée lorsqu'elle se situe entre 36 et 45 mmHg et une HTP sévère lorsqu'elle se situe à plus de 45 mmHg.

#### ***1.3.1-Classification de l'HTP***

L'HTP fut classiquement divisée en HTP primaire et HTP secondaire. L'HTP primaire ou de type idiopathique est une HTP sans cause connue et peu fréquente, tandis que l'HTP secondaire est beaucoup plus répandue. L'étiologie la plus importante d'HTP secondaire est l'insuffisance cardiaque ventriculaire gauche. De nombreuses autres conditions peuvent aussi en être responsable telles la sténose valvulaire mitrale, la maladie thromboembolique et la maladie pulmonaire obstructive chronique.

Cependant, depuis le congrès du WHO 1998 (*World Health Organization*) sur l'HTP primaire, l'HTP est maintenant classifiée en cinq classes définies selon la pathobiologie du développement de l'hypertension: (240)

- 1) La première classe est désignée comme hypertension pulmonaire artérielle. Cette classe comprend l'HTP primaire ou idiopathique sporadique et familiale ainsi que l'HTP associée à des maladies du collagène, à des fistules artério-veineuses congénitales, à l'infection au HIV, à l'hypertension portale, à l'ingestion de médicaments ou de toxines tels les anorexigènes (aminorex, fenfluramine) et à l'HTP persistante du nouveau-né.
  
- 2) La deuxième classe est désignée comme hypertension pulmonaire veineuse et comprend l'HTP secondaire à des pathologies ventriculaires et/ou auriculaires gauche, à des pathologies des valves cardiaques gauche, à des tumeurs, à des compressions des veines pulmonaires et à des maladies pulmonaires veno-occlusives.
  
- 3) La troisième classe est désignée comme HTP associée avec des dysfonctions du système respiratoire et/ou avec l'hypoxémie. Cette classe comprend donc l'HTP secondaire à des situations telles les MPOC, des maladies pulmonaires interstitielles, des désordres d'hypoventilation alvéolaire, des maladies pulmonaires néonatales, des dysplasies alvéolo-capillaire et l'exposition chronique à la haute altitude.

- 4) La quatrième classe est désignée comme HTP secondaire à des maladies thrombotiques et/ou emboliques.
  
- 5) La dernière classe est désignée comme HTP secondaire à des désordres affectant directement la circulation pulmonaire tels des maladies inflammatoires et des hémangiomas capillaires.

### 1.3.2-Épidémiologie de l'HTP primaire

L'HTP primaire est une maladie rare retrouvée seulement chez 1-2 personnes par millions (241). La plupart des cas d'HTP primaire sont sporadiques quoique 6 à 12% des cas soient héréditaires de façon autosomale-dominante (242). L'HTP primaire est retrouvée de deux à trois fois plus fréquemment chez les femmes que chez les hommes pour des raisons qui restent encore inconnus (243). L'HTP primaire héréditaire démontre de l'anticipation génétique, c'est-à-dire que l'HTP apparaît à un plus jeune âge à chaque génération (243). Newman et al. (2001) ont récemment suggéré que le gène responsable de l'HTP familiale se retrouverait au niveau du chromosome 2q31-32 (244). En effet, une mutation du gène *BMPR2* (*Bone Morphogenetic Protein Receptor II*) serait responsable de l'HTP familiale tel que démontré par leur étude comprenant 67 familles affectées de cette pathologie. Environ 25% des cas d'HTP considérés comme sporadiques posséderaient une mutation du *BMPR2*. Les "*bone morphogenetic proteins*" font partis de la superfamille du TGF $\beta$  et



module la croissance et la réparation des tissus. La liaison du ligand au BMPR2 entraîne une cascade intracellulaire de phosphorylation menant à la modulation de la transcription de l'ADN. Au niveau de la circulation pulmonaire, la fonction du BMPR2 serait antiproliférative et une mutation de son gène entraînerait une prolifération excessive. Toutefois, puisque seulement 10 à 20% des gens possédants une mutation du BMPR2 développent de l'HTP d'autres facteurs environnementaux et/ou d'autres mutations inconnues sont nécessaires pour développer cette pathologie.

### *1.3.3-Pathobiologie de l'HTP primaire*

Les artères pulmonaires de patients avec HTP primaire démontrent de la prolifération de l'adventice, de l'hypertrophie médiale et de la prolifération et de la fibrose intimale résultant en l'oblitération de la lumière du vaisseau (245). La plupart de ces patients développeront également des lésions focales nommées lésions plexiformes (246). Celles-ci sont constituées d'une prolifération des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses créant ainsi une néointima et formant une structure ayant la forme d'un glomérule rénal. Ces lésions plexiformes pourraient représenter une réponse angiogénique locale à de l'ischémie et/ou de l'hypoxie (246). Cependant, Lee et al. (1998) ont proposé que ces lésions représenteraient plutôt une forme de lésion néoplasique reflétant une dysfonction de la croissance des cellules endothéliales avec prolifération monoclonale de celles-ci (247). L'oblitération

partielle des artérioles augmente par conséquent les résistances vasculaires pulmonaires et impose l'augmentation des pressions artérielles pulmonaires.

Un déséquilibre entre les vasodilatateurs et les vasoconstricteurs est également présent dans l'HTP primaire. En effet, comme mentionné auparavant (section 1.2.9.4) les niveaux circulants d'ET-1 sont augmentés dans différents modèles animaux d'HTP artériolaire ainsi que chez les patients avec HTP primaire. De plus, une augmentation de l'excrétion des métabolites de la thromboxane  $A_2$  et une diminution de l'excrétion des métabolites de la  $PGI_2$  a été démontrée chez les patients atteints d'HTP primaire (248). Bien qu'une diminution d'expression de la NO synthase endothéliale (eNOS) pulmonaire soit également notée chez les patients avec HTP primaire, la production pulmonaire de NO est préservée ou augmentée (249-251). Les niveaux plasmatiques de sérotonine (5-HT) sont également augmentés dans l'HTP primaire tandis que les concentrations de 5-HT dans les plaquettes sont diminuées (252). Une étude de Herve et al. (1995) a suggéré qu'une dysfonction de stockage de la 5-HT dans les plaquettes pourrait expliquer leurs niveaux élevés dans l'HTP primaire (252).

Une augmentation des niveaux d'angiopoïétine, un facteur angiogénique provoquant le recrutement, la migration et la division des cellules musculaires lisses, fut également démontrée chez les patients avec HTP primaire (253). En effet, Du et al. (2003) ont démontré que les patients avec HTP de différentes étiologies présentaient une augmentation d'angiopoïétine dans les

cellules musculaires lisses pulmonaires ainsi qu'une augmentation de son récepteur et une diminution du BMPR1A dans les cellules endothéliales pulmonaires (253). Cette étude suggère donc une cascade moléculaire commune à toutes les formes d'HTP, incluant l'HTP primaire familiale, par laquelle une augmentation d'angiopoiétine résulte ultimement en une diminution du BMPR1A.

Des altérations dans la dégradation de la matrice extracellulaire pourraient également contribuer au développement de l'HTP primaire. En effet, la dégradation de la matrice extracellulaire par la sérine élastase ainsi que par les MMPs libère simultanément des facteurs de croissance pouvant stimuler la prolifération des cellules musculaires lisses et des fibroblastes (254;255). De plus, comme mentionné précédemment la MMP-2 peut cliver la big-ET-1 et ainsi contribuer à la formation d'ET-1 (81). Deux études de Cowan et Rabinovitch (2000) ont d'ailleurs récemment démontré que l'inhibition de la MMP-2 ainsi que celle de la sérine élastase améliorait de façon significative la survie, les pressions pulmonaires et l'épaississement de la média des artères pulmonaires chez le modèle de rats MCT (256;257).

Plus récemment, des études électrophysiologiques ont permis d'associer des canaux ioniques à l'HTP primaire. Effectivement, chez les patients avec HTP primaire il a été démontré qu'il y avait diminution des niveaux de l'ARNm des canaux potassiques "Kv1.5" dans les cellules musculaires lisses pulmonaires (258). Il fut d'ailleurs démontré que les courants potassiques étaient

significativement diminués chez les patients avec HTP primaire comparé à ceux atteints d'HTP secondaire (259). Une diminution du courant potassique retarde la repolarisation du potentiel d'action amenant ainsi une augmentation de la contraction et contribue par conséquent au développement de l'HTP. Une diminution d'activité des canaux potassiques activés par le  $Ca^{2+}$  fut également démontrée dans le modèle de rats MCT (260). Dans un modèle d'HTP hypoxique, le groupe de Sato et al. (2000) a démontré que l'ET-1 supprimait l'activité des canaux potassiques dépendants de l'ATP " $K_{ATP}$ " via le récepteur  $ET_A$  (261). L'augmentation des niveaux d'ET-1 dans l'HTP primaire pourrait donc contribuer au développement de l'hypertension en partie par l'inhibition de canaux potassiques.

#### *1.3.4-Traitements de l'HTP primaire*

Malgré les différents traitements d'HTP primaire le pronostic demeure très sombre. Puisque la mortalité de ces patients est souvent associée à la défaillance cardiaque droite, les traitements utilisés dans l'insuffisance cardiaque gauche ont premièrement été investigués (262). L'utilisation chronique de digitale a été rapportée efficace chez certains patients sans toutefois affecter de façon importante la mortalité (263).

#### *1.3.4.1-Inhibiteurs de l'ECA*

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ECA) ont également été utilisés avec toutefois peu de succès. Différentes études animales chez le modèle de rats MCT ont démontré des résultats contradictoires. En effet, bien que le groupe de Molteni et al. ait démontré que les antagonistes de l'ECA étaient efficaces pour réduire le remodelage des artères pulmonaires, l'étude de van Suylen et al. (1998) démontre que le captopril n'a aucun effet sur le remodelage de ces artères (264-266). De plus, puisque les effets des inhibiteurs de l'ECA ne sont pas sélectifs pour la circulation pulmonaire, des problèmes d'hypotension systémique peuvent se présenter. D'ailleurs, l'une des rares études cliniques utilisant un inhibiteur de l'ECA dans le traitement de l'HTP primaire chez sept femmes atteintes de cette pathologie a démontré une diminution significative de la pression et de la résistance vasculaire systémique trois mois après le début du traitement sans toutefois avoir d'effets sur les pressions et résistances vasculaires pulmonaires (267). Les inhibiteurs de l'ECA interfèrent également avec la dégradation de la bradykinine pouvant ainsi créer une forte toux.

#### *1.3.4.2-Bloqueurs des canaux calciques*

Les bloqueurs de canaux  $Ca^{2+}$  ont été démontrés efficaces pour améliorer les pressions pulmonaires, le débit cardiaque ainsi que la mortalité chez les patients atteints d'HTP primaire. L'étude de Rich et al. (1987) a démontré

qu'un traitement de 24 heures avec de fortes doses de nifédipine et de diltiazem réduisait de 48% la pression de l'artère pulmonaire et de 60% la résistance vasculaire pulmonaire chez 8 de leur 13 patients (268). Les 5 patients retirés de l'étude ne répondaient pas aux bloqueurs de canaux calciques ou éprouvaient des effets secondaires tels de l'hypotension systémique, des nausées, des vomissements et de l'agitation. Par la suite, 5 des 8 patients ayant répondu à la nifédipine et le diltiazem furent enrôlés dans une étude d'une année. 80% de ceux-ci démontraient une amélioration significative de la pression de l'artère pulmonaire, de la résistance vasculaire pulmonaire ainsi que de l'hypertrophie du ventricule droit après un an. En 1992, une autre étude de Rich et al. démontrait que seulement 26% de 64 patients enrôlés dans l'étude répondaient au traitement aigu avec le diltiazem (269). Cinq ans après le début de l'étude le taux de survie chez les patients répondant à la thérapie anti-calcique se situait à 94% alors qu'il n'était que de 55% chez les non-traités. Il est donc important de noter que bien que différentes études aient démontré des effets positifs de la thérapie anti-calcique, peu de patients atteints d'HTP primaire répondent à cette thérapie. De plus, l'hypotension systémique provoquée par les bloqueurs de canaux calciques peut causer des réflexes de tachycardies, de l'œdème pulmonaire, la défaillance cardiaque droite et la mort subite. Une diminution de la fonction ventriculaire suite à des effets inotropes négatifs à également été démontrée suite à l'utilisation de bloqueurs de canaux calciques (270).

#### *1.3.4.3-Anticoagulants*

Comme mentionné précédemment, l'HTP primaire est associée avec une activation plaquettaire importante suggérant ainsi que les inhibiteurs de plaquettes et les anticoagulants pourraient avoir des effets bénéfiques chez ces patients. Des anticoagulants tel la warfarine (Coumadin<sup>®</sup>) utilisés de façon chronique ont d'ailleurs été démontrés efficaces pour améliorer les symptômes et la survie dans l'HTP primaire. Fuster et al. (1984) ont effectué une étude rétrospective à long terme chez 120 patients atteints d'HTP primaire (271). Seulement 21% de ces patients étaient toujours vivants 5 ans après que l'HTP primaire ait été diagnostiquée. Chez 56 de ces patients décédés, une autopsie des tissus pulmonaires révéla que 57% d'entre eux présentaient des lésions de types thromboemboliques et que 32% présentaient des lésions telles l'artériopathie plexogénique. Ceci suggère donc que plusieurs des patients classifiés comme hypertendus pulmonaires primaires présentaient des problèmes thromboemboliques dans cette étude et que l'utilisation d'anticoagulants pourrait s'avérer efficace dans le cas échéant. Dans cette même étude, les investigateurs ont analysé rétrospectivement l'effet de warfarine sur la survie de ces patients. Un patient ayant été placé sous thérapie à la warfarine pendant les 12 premiers mois suivant le diagnostic d'HTP primaire était considéré comme traité alors que les autres constituaient le groupe témoin. Sur une période de trois ans, ils ont noté que le taux de survie chez les patients ayant reçu la warfarine était

augmentée de 19% à 46% ( $p=0.02$ ). Une étude rétrospective de Frank et al. (1997) a également démontré l'amélioration de la survie et de la qualité de vie chez des patients avec HTP artériolaire ayant reçu de la warfarine (272).

#### *1.3.4.4-Analogues de prostacycline*

Puisqu'il y a augmentation du rapport thromboxane  $A_2/$   $PGI_2$  dans l'HTP primaire l'utilisation d'analogues de la  $PGI_2$  fut naturellement contemplée. Le traitement de patients souffrants d'HTP primaire avec des analogues de la  $PGI_2$  est d'ailleurs le plus courant et le plus efficace. L'epoprostenol (Flolan), donné en infusion intraveineuse, améliore la tolérance à l'exercice, les pressions pulmonaires et la survie chez ces patients. En effet, Barst et al. (1996) ont démontré que des patients ayant une HTP primaire avec une classe fonctionnelle NYHA III et IV et recevant de l'epoprostenol pour 12 semaines en plus de la thérapie conventionnelle (anticoagulants, vasodilatateurs oraux, diurétiques, glycosides) démontraient une amélioration de leur capacité à l'exercice suite au test de 6 minutes de marche comparé aux patients recevant uniquement la thérapie conventionnelle (273). Douze semaines après le début du traitement, les patients recevant l'epoprostenol marchait 47 m de plus alors que les patients recevant seulement la thérapie conventionnelle marchait 66 m de moins. Dans la même étude, les investigateurs ont noté une amélioration significative de la pression pulmonaire moyenne, de la résistance vasculaire pulmonaire ainsi que du



taux de survie chez les patients recevant l'epoprostenol. Une étude subséquente, dans laquelle les patients étaient suivis jusqu'à trois ans après le début du traitement avec l'epoprostenol, a démontré une amélioration significative de la survie à 1, 2 et 3 ans (274). Le traitement de patients atteints d'HTP primaire avec l'epoprostenol a également amélioré le rapport entre la clairance et la relâche d'ET-1 pulmonaire ainsi que la réponse au NO exogène (275;276). Toutefois, il fut démontré que les patients recevant l'epoprostenol développaient de la tolérance aux effets de la PGI<sub>2</sub> ainsi que des infections au site d'implantation des cathéters d'administration (273). Des défauts transitoires du système d'administration pourraient également priver le patient de sa médication pour un certain temps. De plus, l'epoprostenol peut causer de nombreux effets secondaires comme des diarrhées, des thrombocytopénies, des infections alvéolaires et des insuffisances diastoliques du ventricule droit (277;278).

L'iloprost, un analogue de prostacycline disponible en inhalation qui devrait offrir une sélectivité pulmonaire avec effets systémiques minimaux, est présentement à l'étude. Hooper et al. (2000) ont récemment démontré que des patients atteints d'HTP primaire avec une classe fonctionnelle NYHA III et IV et recevant l'iloprost en inhalation à une dose de 100-150 µg avaient une amélioration de leur capacité à l'exercice ainsi que de leurs pressions et résistances pulmonaires 12 mois après le début de la médication (279). Ces patients pouvaient marcher en moyenne 85 m de plus en six minutes. La

courte demi-vie de l'iloprost nécessite toutefois de nombreuses inhalations. Dans l'étude de Hoeper, les patients devaient prendre en moyenne de 6 à 8 inhalations d'iloprost par jour. De plus, une fluctuation de la capacité à l'exercice ainsi que des pressions pulmonaires entre chacune des inhalations a été notée. L'iloprost cause de la toux lors des inhalations ainsi que des maux de tête (279). Une diminution significative des pressions et résistances vasculaires systémiques apparaît également chez les patients recevant l'iloprost, suggérant ainsi que ce vasodilatateur n'est pas seulement spécifique pour la circulation pulmonaire (279).

Des analogues de prostacycline qui possèdent une demi-vie plus longue et qui sont administrés par voie sous-cutanée ont également été développés. En effet, Simonneau et al. (2002) ont récemment démontré que l'administration de Treprostinil, un analogue de prostacycline administré de façon sous-cutané, chez 470 patients atteints d'HTP artériolaire améliorerait de façon significative l'hémodynamie, l'indice de dyspnée et la tolérance à l'exercice après 12 semaines de traitements (280). Plusieurs patients (85%) de cette étude ont toutefois ressentis des douleurs au site d'infusion et trois patients ont été victimes d'hémorragies gastro-intestinales. Le Treprostinil fut récemment approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour le traitement de l'HTP artérielle (281).

Le beraprost, un analogue de la prostacycline disponible oralement, a démontré des résultats préliminaires encourageant en améliorant

l'hémodynamie et la tolérance à l'exercice chez les patients atteints d'HTP primaire. Dans l'étude de Vizza et al. (2001), treize patients atteints d'HTP sévère dont neuf d'HTP primaire ont reçu le beraprost pour un an (282). Après un mois d'étude, 11 de ces patients démontraient une amélioration significative de leur capacité à l'exercice évalué selon le test de 6 minutes de marche (63 m de plus) ainsi qu'une diminution non-significative de 8 mmHg de la pression de l'artère pulmonaire. D'autre part, Nagaya et al. (1999) ont démontré, dans une étude rétrospective, une amélioration significative de la survie chez les patients avec HTP primaire recevant le beraprost comparé à ceux recevant la thérapie conventionnelle (283). La survie à 1, 2 et 3 ans des patients traités avec le beraprost était augmentée à 96%, 86% et 76% comparé à 77%, 47% et 44% chez les patients ayant reçus la thérapie conventionnelle. Le beraprost cause des effets secondaires tels que des rougeurs de la peau, de la diarrhée et des douleurs musculaires (282). De plus, puisque le beraprost possède une courte demi-vie un dosage fréquent est nécessaire. Les résultats de l'étude ALPHABET (*Arterial Pulmonary Hypertension and Beraprost European Study Group*), une étude traitant 130 patients avec HTP artériolaire pendant 12 semaines avec le beraprost, ont récemment été publiés (284). Une amélioration de la tolérance à l'exercice et de l'indice de dyspnée fut notée alors que l'hémodynamie cardiopulmonaire et la classe fonctionnelle NYHA n'ont pas été modifiées de façon significative.

#### *1.3.4.5-Monoxyde d'azote*

Le NO, pour sa part, est surtout utilisé pour tester la réponse vasodilatatrice des patients atteints d'HTP primaire, tout comme la prostacycline. Une réponse positive au test du NO (ou de la PGI<sub>2</sub>) suggère fréquemment que ce patient répondra favorablement aux bloqueurs de canaux calciques (285). Toutefois, le NO en inhalation pourrait être un traitement chronique efficace de l'HTP primaire puisque la vasodilatation serait plus spécifique pour la circulation pulmonaire. Perez-Penate et al. (2001) ont d'ailleurs rapporté un cas de traitement chronique au NO en inhalation chez un patient avec HTP primaire (286). Après un an de traitement, on pouvait noter chez ce patient une amélioration de sa classe fonctionnelle NYHA de IV à II, une disparition de l'œdème pulmonaire ainsi qu'une réduction de 9% de la pression moyenne de l'artère pulmonaire. Notons cependant que la très courte demi-vie du NO nécessite un système d'administration sophistiqué, coûteux et limitant la mobilité des patients. De plus, une augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire a été notée chez des patients avec le Syndrome de Détresse Respiratoire de l'Adulte après l'interruption d'un traitement avec le NO en inhalation (287).

#### *1.3.4.6-Inhibiteurs de phosphodiésterases*

Les inhibiteurs de phosphodiésterases (PDE) empêchent la dégradation du GMPc qui permettra l'ouverture de canaux potassiques dépendants du Ca<sup>2+</sup>

"K<sub>Ca</sub>" au niveau de la cellule musculaire lisse et induira ainsi la relaxation de cette cellule. L'efficacité d'un traitement chronique de l'HTP primaire aux inhibiteurs de PDE reste toutefois à être démontrée. Le sildenafil (Viagra) qui est un inhibiteur de PDE5 a démontré des effets positifs chez quelques patients. Un patient de 21 ans souffrant d'HTP primaire et ayant une pression systolique de l'artère pulmonaire de 128 mmHg a été placé sous 100 mg de sildenafil cinq fois par jour (288). Trois mois après le début du traitement, ce patient avait amélioré sa capacité à l'exercice et présentait maintenant une pression systolique de l'artère pulmonaire de 90 mmHg. Une autre patiente de 4 ans souffrant également d'HTP primaire avec une pression systolique de l'artère pulmonaire de 79 mmHg et une pression systolique systémique de seulement 55 mmHg fut placée sous 2 mg/kg de sildenafil 4 fois par jour (289). Trois mois après le début de cette étude, cette patiente avait amélioré sa capacité à l'exercice et avait maintenant une pression systolique de l'artère pulmonaire de 76 mmHg et une pression systolique systémique de 87 mmHg. Le traitement avec le sildenafil semble donc prometteur et avoir peu d'effets secondaires. De plus grandes études prospectives randomisées sont toutefois nécessaires afin d'évaluer l'efficacité et la sécurité d'un tel traitement.

#### *1.3.4.7-Transplantation et Septostomie*

Face à un échec du traitement médical chez les patients de classe IV, la transplantation pulmonaire ou la septostomie auriculaire peut être

considérée. La transplantation pulmonaire a habituellement lieu chez des patients avec classe NYHA III ou IV et ayant une pression artérielle pulmonaire supérieure à 55 mmHg et une pression auriculaire droite moyenne supérieure à 15 mmHg (290). Les patients ayant subis une transplantation pulmonaire, qu'il s'agisse de transplantation cœur-poumon, de transplantation pulmonaire simple ou double démontrent un taux de survie de 61, 55 et 44% à respectivement 1, 2 et 5 ans après la chirurgie (291).

La septostomie auriculaire a également été démontrée efficace pour améliorer la survie des patients atteints d'HTP primaire (292;293). Sandoval et al. (1998) ont démontré que la septostomie auriculaire améliorait la pression télédiastolique du ventricule droit, l'index cardiaque, la classe fonctionnelle NYHA, la tolérance à l'exercice et la survie de 15 patients avec HTP primaire (293). En effet, les patients ayant subis la septostomie auriculaire marchait 110 mètres de plus, tel qu'évalué par le test de six-minutes de marche, trois ans après l'opération. La survie des patients ayant subis la septostomie à 1, 2 et 3 ans était de 92% alors qu'elle n'était que de 73%, 59% et 52% chez les patients n'ayant pas été opérés.

#### *1.3.4.8-Antagonistes de l'ET*

Les antagonistes des récepteurs de l'ET représentent une nouvelle avenue dans le traitement de l'HTP primaire. Comme mentionné précédemment (section 1.2.9.4), les niveaux plasmatiques et tissulaires d'ET-1 sont

augmentés chez les patients atteints d'HTP primaire (131;132). Les niveaux d'ET-1 et de big-ET-1 corrélaient même avec les pressions et résistances vasculaires pulmonaires chez ces patients (186). Le bosentan, qui fut récemment approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour le traitement d'HTP artérielle et par Santé Canada pour le traitement de l'HTP secondaire à la sclérodémie, a été démontré efficace pour améliorer la classe fonctionnelle WHO, la dyspnée et la tolérance à l'exercice chez 213 patients (207). Récemment, un antagoniste sélectif pour les récepteurs ET<sub>A</sub>, le sitaxsentan, fut également démontré efficace pour améliorer la tolérance à l'exercice et les pressions et résistances vasculaires pulmonaires chez 20 patients avec HTP primaire (206).

#### *1.3.4.9-Perspectives futures*

Au cours des prochaines années, la thérapie génique pourrait nous permettre de réguler l'expression d'un gène dans un organe spécifique. Par exemple, la surexpression pulmonaire de la eNOS ou de la PGI<sub>2</sub> synthase pourrait être bénéfique aux patients atteints d'HTP primaire. De façon similaire, l'administration d'antisense contre les récepteurs AT<sub>1</sub> ou ET<sub>A</sub> pourraient également améliorer l'HTP chez de tels patients. Dans le modèle de rats MCT, Nagaya et al. (2000) ont démontré que le transfert intratrachéal du gène de la PGI<sub>2</sub> synthase humaine diminuait de façon significative les pressions et résistances vasculaires pulmonaires, l'hypertrophie médiale des artères pulmonaires et l'hypertrophie ventriculaire droite après trois semaines

(294). Campbell et al. (2001) ont pour leur part démontré que le transfert de cellules musculaires lisses surexprimant le VEGF dans le poumon de rats MCT améliorerait de façon significative les pressions pulmonaires, l'hypertrophie médiale et l'hypertrophie ventriculaire droite après quatre semaines (295). La possibilité de réactions inflammatoires et immunitaires en réponse aux différents vecteurs utilisés devra toutefois être éliminée avant d'utiliser la thérapie génique.

La combinaison de plusieurs traitements devrait aussi être envisagée afin d'optimiser l'effet de plusieurs classes de médicaments. Chez le rat MCT, la combinaison du beraprost et du TA-0201, un antagoniste sélectif pour les récepteurs ET<sub>A</sub>, s'est démontrée supérieure à l'administration seule de l'un ou l'autre de ces traitements pour améliorer les pressions pulmonaires, l'hypertrophie ventriculaire droite et l'épaississement médiale des artères pulmonaires (296). L'effet aigu de la combinaison de sildenafil et d'iloprost fut également testé chez cinq patients avec HTP primaire (297). Bien que l'administration de sildenafil ou d'iloprost diminue de façon significative la pression moyenne de l'artère pulmonaire chez ces patients, la combinaison des deux traitements s'est démontrée supérieure pour réduire ces pressions.

L'utilisation de statines, des inhibiteurs de HMG-CoA réductase, fut également démontrée efficace dans le modèle de rats MCT avec pneumonectomies (298). En effet, l'administration de simvastatin dans ce modèle améliore de façon significative la pression de l'artère pulmonaire, la



pression systolique du ventricule droit, l'hypertrophie ventriculaire droite, la présence de lésions occlusives néo-intimales et l'expression pulmonaire de eNOS (298). Les auteurs de cette étude suggèrent que le simvastatin améliore l'HTP par des effets anti-proliférateurs, des effets anti-inflammatoires et l'augmentation d'expression de eNOS.

### *1.3.5- Modèles animaux d'HTP*

Plusieurs modèles animaux d'HTP ont été développés au cours des années, notamment les modèles hypoxiques, infarctus et monocrotaline (MCT).

#### *1.3.5.1-Modèle hypoxique*

Le modèle hypoxique représente surtout l'HTP reliée à la haute altitude et consiste à placer les animaux dans des conditions hypobariques en diminuant la pression partielle d'oxygène dans l'air inspiré. Les changements morphologiques principaux consistent en l'apparition de cellules musculaires lisses dans les artères non-musculaires et en la différenciation de péricytes et/ou cellules intermédiaires pré-existants en cellules musculaires lisses dans les artères partiellement musculaires (299). Ces changements mènent donc à l'épaississement de la média des artères pulmonaires ainsi qu'au développement d'HTP et d'hypertrophie ventriculaire droite. Notons cependant que cette muscularisation des artères pulmonaires ainsi que l'HTP et l'hypertrophie ventriculaire droite qui s'ensuivent peuvent être renversées

si l'animal est replacé en conditions atmosphériques normales (300-302). L'activation du système ET fut démontrée dans ce modèle d'HTP. En effet, plusieurs études ont démontré l'augmentation plasmatiques et tissulaires d'ET-1 chez le rat hypoxique (178;303). Ces études ont également démontré l'augmentation d'expression des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> à la fois dans les artères pulmonaires et dans le ventricule droit. De plus, comme mentionné précédemment (section 1.2.9.4) les antagonistes de l'ET, autant sélectifs que non-sélectifs se sont démontrés efficaces pour prévenir et renverser le développement d'HTP et d'hypertrophie ventriculaire droite chez le modèle de rats hypoxiques (93;191;192).

#### *1.3.5.2-Modèle infarctus*

Puisque la cause d'HTP secondaire la plus importante chez l'humain est l'insuffisance cardiaque gauche, le modèle infarctus est très représentatif de l'HTP secondaire ou veineuse. Ce modèle consiste à effectuer une ligature autour de l'artère coronaire inter-ventriculaire antérieure (IVA). L'occlusion de l'IVA provoque l'infarctus du myocarde ventriculaire gauche suivi de l'augmentation des pressions de remplissage du ventricule gauche et des pressions pulmonaires. Une activation du système ET fut démontrée dans ce modèle. En effet, une augmentation des niveaux plasmatiques et tissulaires d'ET-1 et de big-ET-1 fut démontrée chez le rat avec HTP secondaire à l'infarctus (179;304). Une diminution des récepteurs ET<sub>B</sub> pulmonaires fut également notée chez ce modèle de rat (179). Les antagonistes de l'ET,

comme mentionné précédemment (section 1.2.9.4) ont été démontrés efficaces pour diminuer l'HTP chez ce modèle d'infarctus. Nguyen et al. (1998) et Lucas et al. (2001) ont démontré l'efficacité d'antagonistes sélectifs ET<sub>A</sub> pour réduire les niveaux pulmonaires d'ET-1, l'HTP et l'hypertrophie du ventricule droit chez le rat infarctus (196;305). Notons toutefois que certaines études ont démontré des effets adverses des antagonistes de l'ET sur la fonction et le remodelage ventriculaire gauche (305-307). En effet, l'initiation précoce d'un traitement avec les antagonistes de l'ET semble interférer avec le remodelage ventriculaire et favoriser l'expansion de la cicatrice et la dilatation du ventricule gauche. Il est donc important de débiter un tel traitement seulement quelques jours (7-10 jours) après la ligature de l'artère coronaire.

#### *1.3.5.3-Modèle monocrotaline*

Le modèle à la monocrotaline est un modèle facilement reproductible résultant en une HTP et une hypertrophie ventriculaire droite marquées et mimant l'HTP artériolaire humaine. Lorsque injectée de façon intrapéritonéale, la MCT, un alcaloïde pyrrole isolé de la plante *Crotalaria spectabilis*, est tout d'abord transformée en déhydro-monocrotaline (DMCT) par une enzyme oxydante du foie. La DMCT passe par la suite dans la circulation pulmonaire où elle cause un dommage endothélial diffus aigu. Les lésions aiguës causées par la MCT s'apparentent au syndrome de détresse respiratoire de l'adulte chez l'humain. Les lésions pulmonaires aux stades

avancés ressemblent cependant beaucoup à celles de l'HTP primaire. Des altérations ultrastructurales des alvéoles pulmonaires telles de l'œdème alvéolaire interstielle, l'épaississement des cellules endothéliales, la formation de thrombus dans les petites artères et l'augmentation du nombre de mastocytes semblent précéder le développement d'HTP puisque celles-ci furent démontrées seulement quelques heures après l'injection de MCT chez le rat (308). Meyrick et al (1980) ont par la suite bien décrit le développement temporel de ce type d'HTP (309). L'apparition de cellules musculaires lisses dans les petites artères pulmonaires est premièrement détectée de façon concomitante avec l'augmentation de l'index cardiaque et de la consommation en oxygène suivie respectivement de l'augmentation des pressions de l'artère pulmonaire, de l'épaississement de la média des petites artères pulmonaires, de l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires, de l'épaississement de la média des grosses artères pulmonaires et du développement d'hypertrophie ventriculaire droite (309). Une activation du système ET dans ce modèle d'HTP artériolaire fut démontrée à maintes reprises. En effet, plusieurs études ont démontré l'augmentation des niveaux plasmatiques et tissulaires d'ET-1 chez ce modèle (175;176;193;310). Une augmentation de l'expression de l'ET-1 et des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> dans le ventricule droit fut démontrée chez le rat MCT (190). Une diminution de l'expression pulmonaire du récepteur ET<sub>B</sub> fut toutefois constatée chez ce modèle de rat HTP (175). De plus, comme mentionné précédemment (section 1.2.9.4), les antagonistes de l'ET autant sélectifs pour le récepteur ET<sub>A</sub> que non-sélectifs se sont démontrés efficaces

pour prévenir et renverser le développement d'HTP et d'hypertrophie ventriculaire droite chez le rats MCT (193-195). Ce modèle d'HTP artériolaire sévère facilement reproductible et dans lequel le système ET est activé représente donc un modèle de choix pour effectuer une étude comparative des antagonistes de l'ET.

Notons également qu'il fut démontré qu'une pneumonectomie chez le rat MCT provoquait une HTP artérielle encore plus marquée avec prolifération intinale et oblitération des petites artérioles pulmonaires (298;311). La combinaison de MCT et de pneumonectomie permet donc d'obtenir des lésions identiques à celles des patients atteints d'HTP artérielle.

**Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de modèles animaux d'HTP**

	Hypoxique	Infarctus	Monocrotaline
<b>Type d'HTP</b>	HTP associée à l'hypoxémie	HTP veineuse	HTP artérielle
<b>Changements morphologiques</b>	-Apparition de cellules musculaires lisses dans les artères non-musculaires -Différentiation de péricytes et/ou cellules intermédiaires pré-existantes en cellules musculaires lisses dans les artères partiellement musculaires -Epaississement de la média des artères pulmonaires	-Apparition et prolifération de myofibroblastes (péricytes) dans les septa alvéolaires. -Epaississement des septa alvéolaires	-Apparition de cellules musculaires lisses dans les petites artères pulmonaires -Epaississement de la média des artères pulmonaires
<b>Niveaux d'ET-1 plasmatiques et tissulaires</b>	↑	↑	↑
<b>Expression pulmonaire du récepteur ET<sub>A</sub></b>	↑	-----	-----
<b>Expression pulmonaire du récepteur ET<sub>B</sub></b>	↑	↓	↓
<b>Expression du récepteur ET<sub>A</sub> dans le ventricule droit</b>	↑	?	↑
<b>Expression du récepteur ET<sub>B</sub> dans le ventricule droit</b>	↑	?	↑
<b>Efficacité d'un traitement précoce aux antagonistes de l'ET</b>	Oui	Non	Oui
<b>Efficacité d'un traitement tardif aux antagonistes de l'ET</b>	Oui	Oui	Oui

## 2.0- RATIONNELLE

Le double rôle des récepteurs  $ET_B$  mentionné précédemment soulève une problématique importante à savoir s'il est préférable ou non de bloquer ces récepteurs. Puisque les récepteurs  $ET_B$  provoquent une vasodilatation et sont responsables de la clairance de l'ET-1 circulante, leurs blocages pourraient s'avérer néfaste. En effet, plusieurs études ont démontré le rôle protecteur des récepteurs  $ET_B$  (203;312). Ce récepteur serait responsable de l'atténuation de l'augmentation des pressions pulmonaires chez les modèles d'HTP induite par la DMCT et d'insuffisance cardiaque induite par tachycardie chez le chien (203;312). Cependant, puisque les récepteurs  $ET_B$  provoquent également une vasoconstriction et sont impliqués dans la prolifération de différents types cellulaires, leurs blocages pourraient s'avérer favorable. En effet, certaines études ont démontré qu'il était nécessaire de bloquer les deux types de récepteurs ( $ET_A$  et  $ET_B$ ) pour contrer complètement l'action vasoconstrictrice de l'ET-1 (313;314). De plus, le récepteur  $ET_B$  fut impliqué dans la fibrose cardiaque et la relâche de  $TxA_2$  (121;122).

Le **premier objectif** de cette thèse est donc d'évaluer le rôle du récepteur  $ET_B$  lors d'HTP artériolaire. L'implication du récepteur  $ET_B$  dans la régulation du tonus vasculaire pulmonaire et la clairance de l'ET-1 fut premièrement investiguée à la fois chez des rats normaux et des rats avec HTP induite par injection de MCT (**Article # 1**). L'activation cardiopulmonaire du système ET

ainsi que la densité des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> cardiaques et pulmonaires furent également évalués dans ce même modèle de rats (**Article # 2**).

L'efficacité d'un antagoniste sélectif pour les récepteurs ET<sub>A</sub>, le LU135252, à la fois dans la prévention et la régression de l'HTP induite par la MCT fut bien établie (193;194). De façon similaire, le bosentan, un antagoniste non sélectif, fut également démontré efficace pour prévenir et régresser le développement d'HTP suite à l'administration de MCT (195). Même si un antagoniste non-sélectif semble efficace, il n'y a cependant aucune étude comparant directement son efficacité à celle d'un antagoniste sélectif ET<sub>A</sub>. Ainsi, même si l'effet net du blocage des récepteurs ET<sub>B</sub> endothéliaux et musculaires lisses semble favorable, on ignore toujours s'il est supérieur ou inférieur au blocage isolé de l'ET<sub>A</sub>.

Le **deuxième objectif** de cette thèse est donc d'évaluer l'effet chronique du blocage des récepteurs ET<sub>B</sub> et d'ainsi départager s'il est préférable d'utiliser un antagoniste sélectif ET<sub>A</sub> ou un antagoniste non-sélectif dans le traitement chronique de l'HTP. Ceci fut réalisé en effectuant une étude comparative directe entre un antagoniste sélectif ET<sub>A</sub> (LU135252) et un antagoniste non-sélectif (BSF420627) dans le traitement d'HTP induite par MCT (**Article # 3**).

Les effets du système ET peuvent donc être inhibés soit par le blocage de ses récepteurs ou encore par l'inhibition de la synthèse d'ET. Comme mentionné précédemment, l'ECE est majoritairement responsable de la



production d'ET. Le poumon possède un contenu élevé en ECEs localisées à la fois à l'intérieur de la cellule et à la surface de l'endothélium (315). Plusieurs études ont démontré que la big-ET-1 humaine pouvait être hydrolysée par le poumon de différentes espèces (316-318). Cette hydrolyse pourrait donc avoir lieu à l'intérieur de la cellule et/ou à la surface de l'endothélium.

Le **troisième objectif** de cette thèse est donc de quantifier l'activité des ECEs luminales dans le poumon isolé de rats en utilisant les principes de la technique de courbes de dilutions à indicateurs multiples. La quantification précise de l'activité des ECEs pourrait par la suite servir à la comparaison de différents inhibiteurs de l'ECE (**Article # 4**).

### **3.1-ARTICLE # 1**

#### **Importance of Local Production of Endothelin-1 and of the ET<sub>B</sub> Receptor in the Regulation of Pulmonary Vascular Tone**

J. Dupuis\*, J.F. Jasmin, S. Prié, P. Cernacek

Montreal Heart Institute, Department of Medicine, 5000 Belanger Street East,  
Montreal, Quebec H1T 1C8, Canada

**Pulm Pharmacol Ther. 2000; 13 (3): 135-140**

## ABSTRACT

**Background:** Interaction between locally released endothelin-1 (ET-1) and the endothelial ET<sub>B</sub> receptor could modulate pulmonary vascular tone. We evaluated pulmonary ET-1 clearance and ET-1-ET<sub>B</sub> receptor interaction in the modulation of pulmonary vascular tone.

**Methods and Results:** Controls and rats with Monocrotaline (MCT)-induced pulmonary hypertension (PH) were studied. Lungs were isolated and perfused under constant pressure. The effect of the selective ET<sub>B</sub> antagonist BQ-788 ( $10^{-12}$ - $10^{-8}$  mole) on perfusion flow rate and <sup>125</sup>I-ET-1 extraction was determined. Baseline <sup>125</sup>I-ET-1 extraction was reduced from 62±5% in controls to 49±10% in PH ( $P=0.012$ ). BQ-788 inhibited extraction with a higher half-inhibitory dose in the MCT group (-Log ID<sub>50</sub>= 8.9±0.4 vs. 9.5±0.1,  $P=0.03$ ). BQ-788 induced a mild reduction in perfusion flow rate of 0.7±0.3 ml/min in controls. In the MCT group, this occurred at a lower dose and was more pronounced with a maximal reduction of 3.3±0.7 ml/min ( $P<0.01$  vs. control). ET-1 was undetectable in the effluent at baseline but was present in similar concentrations in both groups after ET<sub>B</sub> blockade. Addition of 2 pg/ml ET-1 to lung perfusate did not modify pulmonary ET-1 clearance or the effect of BQ788 on perfusion flow rate in control lungs.

**Conclusion:** In normal rat lungs, the ET<sub>B</sub> receptor plays a minor regulatory role on vascular tone. In MCT hypertension however, despite a reduction in ET<sub>B</sub> mediated extraction, luminal production of ET-1 attenuates the increase in pulmonary vascular tone.

**Key Words:** Endothelins; Endothelium; Pulmonary circulation; Endothelial receptors; Vasoactive agent

## INTRODUCTION

The potent vasoconstrictor peptide endothelin-1 (ET-1) contributes to the regulation of pulmonary vascular tone through the activation of two distinct receptor subtypes.<sup>1</sup> The ET<sub>A</sub> receptors are predominantly located on vascular smooth muscle cells where they mediate vasoconstriction.<sup>2</sup> The ET<sub>B</sub> receptors are located on both endothelial and smooth muscle cells where they respectively mediate vasodilation<sup>3</sup> and vasoconstriction.<sup>4</sup> The pulmonary endothelial ET<sub>B</sub> is also responsible for circulating ET-1 clearance, with close to 50% removal during the pulmonary transit in man.<sup>5</sup>

ET-1 is mainly produced by the vascular endothelium and preferentially released towards the underlying smooth muscle cells in a paracrine fashion.<sup>6</sup> A measurable amount of ET-1 is however also released into the circulation<sup>7</sup> in a so-called luminal fashion. The previously demonstrated absence of,<sup>5-8</sup> or minimal arteriovenous ET-1 gradient across the pulmonary circulation<sup>9</sup> despite substantial clearance suggests that a significant proportion of pulmonary ET-1 production is released toward the luminal side. Circulating levels of ET-1 are increased in all forms of pulmonary hypertension and correlate well with the severity of the disease.<sup>9-10</sup>

The objectives of this study were to define the interactions between pulmonary production of ET-1 and the endothelial ET<sub>B</sub>, and their importance in the regulation of pulmonary vascular tone in control rats and in rats with Monocrotaline (MCT)-induced pulmonary hypertension.

## **MATERIAL AND METHODS**

Male Sprague-Dawley rats weighing between 275-375 g (Charles River, Saint-Constant, Quebec, Canada) were randomly assigned into the control or the MCT group. The animals received an intraperitoneal (i.p.) injection of either 0.5 ml, 0.9% NaCl or 0.5 ml, 60 mg/kg MCT.

### **Experimental protocol**

After 3 weeks, the animals were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) followed by 2000 units of i.p. Heparin (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO). To confirm the presence of pulmonary hypertension, a catheter (0.97 mm outer diameter, 0.58 mm inner diameter) was advanced into the right ventricle through the right jugular vein for the measurement of right ventricular pressure using a polygraph and recorder (Gould TA4000). The trachea was cannulated and connected to a rodent ventilator (Harvard Apparatus) and ventilated with room air with a tidal volume of 1 ml and 2 cm H<sub>2</sub>O positive end-expiratory pressure.

A midline sternotomy was performed to expose the heart and lungs and the pulmonary artery was cannulated through an incision in the right ventricle. Another cannula was inserted into the left atrium through an incision in the left ventricle to collect the effluent from the lungs. The non-recirculating lung perfusion was initiated by infusing Krebs solution supplemented with Heparin (100 units/ml) at 2.0 ml/min. The Krebs solution had the following composition (mM): NaCl 120, NaHCO<sub>3</sub> 25, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18, MgSO<sub>4</sub> 1.17, CaCl<sub>2</sub> 2.5 and glucose 5.5. The Krebs solution was bubbled with 95%

O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> to maintain a pH of 7.4. The lungs were then rapidly isolated and suspended in a chamber maintained at 37°C to be perfused by constant pressure with the Krebs solution supplemented with albumin (3%) and kept in a warmed (37°C) water-jacketed reservoir. The constant perfusion pressure was set to maintain a similar flow rate of 9-10 ml/min in both control and MCT rat lungs. The pulmonary flow was continuously measured with a Transonic flow probe (Transonic, New York, NY) connected to a Transonic flow meter (model 208).

### **Effects of BQ-788 on pulmonary removal of circulating ET-1**

These experiments were performed in eight control and 5 MCT rat lungs. Once the flow rate had reached a plateau, a 10-min stabilization period was permitted before performing indicator-dilution experiments in each lung. The ET<sub>B</sub> antagonist BQ-788 was injected into the pulmonary arterial line as a 100 μl-bolus of increasing doses (10<sup>-12</sup>-10<sup>-8</sup> mole). After each dose of BQ-788, single bolus indicator-dilution experiments were carried out by injecting a bolus in the perfusion cannula immediately proximal to the lungs and simultaneously collecting the lung effluent in a linear fraction collector containing 30 glass tubes with a collection time of 28 sec. The indicator-dilution technique was utilized to quantify the pulmonary extraction of ET-1 as previously described in detail.<sup>8</sup> Briefly, a bolus containing trace doses of <sup>125</sup>I-ET-1 and a non-metabolizable vascular reference (Evans' blue dye bound to albumin) are injected in the pulmonary circulation and timed sequential outflow samples are collected. The quantity of both tracers in each of the

collected sample is determined and normalized to the total amount of activity injected to obtain the fractional recovery of each tracer per ml of lung effluent. The fractional recoveries can then be plotted as a function of time to construct the indicator-dilution curve.

Tracer  $^{125}\text{I}$ - ET-1 extraction is calculated by the following equation:

$$\text{Extraction} = 1 - \frac{\int_0^{\infty} ET(t)dt}{\int_0^{\infty} Alb(t)dt}$$

where the right term represents the difference in the areas of the fractional recovery vs. time curves of tracer ET-1 and albumin. Each tracer curve is analyzed from appearance of tracer up to the time at which the concentration of tracer albumin represents <2% of the curves' peak. The injection mixture was prepared by adding 0.5  $\mu\text{Ci}$   $^{125}\text{I}$ -ET-1 (specific activity 2200 Ci/M, NEN, Boston, MA) to 0.5 ml Evans' blue dye (5 mg/ml) and 1.5 ml, 0.9 NaCl. Bovine serum albumin was then added at a concentration of 4% (Sigma Chemical Co). A volume of 100  $\mu\text{l}$  of the mixture was injected. Dilutions of the remaining bolus (1:100) were prepared to serve as standards for the construction of the dilution curve. The tubes containing the lung effluent were processed by adding 2.0 ml, 0.9 NaCl to each and vortexing. A 1-ml aliquot from each tube was placed in a gamma counter to measure  $^{125}\text{I}$  activity. In another 1 ml aliquot, Evans' blue dye absorbance (620 nm minus 740 nm) was measured. The fractional recovery of each tracer in each sample was then determined and the indicator-dilution curves were constructed.



### **Effects of BQ-788 on the pulmonary perfusion flow rate**

Experiments were performed in six control and seven MCT isolated rat lungs as described above. The effect of increasing doses of BQ-788 on perfusion flow rate was assessed after a 10-min stabilization period and with 5-min intervals between bolus injections. Pulmonary flow rate was continuously recorded and the maximal variation in flow after each dose was noted. Only one dose-response curve was obtained for each lung.

### **Measurement of immunoreactive ET-1 in plasma and lung perfusate**

After anesthesia, blood samples (2.5-3.0 ml) from eight control and seven MCT rats were simultaneously collected from the left carotid artery and right ventricle in EDTA-containing tubes. All blood samples were immediately centrifuged at 1800 g for 20 min and the plasma was stored at -80°C for measurement of plasma immunoreactive ET-1. The lungs were then isolated as above and effluent samples (3 ml) from six control and six MCT lungs were collected before and after bolus injection of  $10^{-8}$  mole BQ-788 to measure endogenous luminal production of ET-1 by the perfused lung.

Immunoreactive ET-1 in plasma and lung perfusate was measured using a previously described radioimmunoassay.<sup>5</sup> The limit of detection of irET-1 was 0.12 pg/tube (95% confidence). The intra- and interassay coefficients of variation were 9% and 12% respectively, at the midpoint of the standard curve. Heparin in concentrations exceeding those achieved in pharmacologic use did not interfere with the assay. High-pressure liquid chromatography of

the plasma extract showed a dominant peak of immunoreactive ET-1 co-eluting with synthetic endothelin-1.

### **Effect of the addition of ET-1 to the lung perfusate on pulmonary removal of ET-1 and on BQ788-induced variations in perfusion flow rate**

To determine if the presence of ET-1 in the lung perfusate, reproducing in vivo situation, could influence clearance and vascular reactivity, additional experiments were performed in 5 control rats. Lungs were isolated as described above, but perfused in a recirculating fashion. A first indicator-dilution study was performed to determine pulmonary ET-1 clearance. Synthetic ET-1 was then added to the perfusate to a concentration of 2 pg/ml and 15 minutes later a second study was performed. Cumulative dose-response curves were then obtained by injecting increasing doses of BQ-788.

### **Drugs**

MCT was purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). The ET<sub>B</sub> antagonist BQ-788 and synthetic ET-1 were purchased from American Peptide Company (Sunnyvale, CA). The MCT was dissolved in 1.0 N HCl and the pH was adjusted to 7.4 with 0.5 N NaOH. The ET<sub>B</sub> antagonist BQ-788 was dissolved in methanol (0.5 mg/ml).

### **Statistical analysis**

The effects of BQ-788 on pulmonary perfusion flow rate and <sup>125</sup>I-ET-1 extraction were evaluated by repeated-measures analysis of variance

followed by multiple comparisons using Bonferroni correction. Dose-response curves for  $^{125}\text{I}$ -ET-1 extraction were fitted using a five-parameter logistic function with Sigmaplot curve-fitting software to determine the amount of BQ-788 inhibiting ET-1 removal by 50% ( $\text{ID}_{50}$ ). Where appropriate, two-tailed unpaired  $t$  tests were used to compare parameters between the control and pulmonary hypertension groups. Paired  $t$  tests were used to compare aortic and mixed venous ET-1 levels within each experimental group. All values are presented as mean $\pm$ SD. A  $P$  value of less than 0.05 was considered significant.

## RESULTS

The animals treated with MCT developed pulmonary hypertension as reflected by a markedly elevated right ventricular systolic pressure of  $56\pm 11$  mm Hg compared to the normal value of  $27\pm 1.9$  mm Hg found in controls ( $P<0.01$ ).

### Effect of BQ-788 on pulmonary removal of $^{125}\text{I}$ -ET-1

At baseline, isolated lungs from control rats removed  $62\pm 5\%$  of  $^{125}\text{I}$ -ET-1. This was reduced in the MCT group to  $49\pm 10\%$  ( $P=0.012$ , Fig. 1). The specific  $\text{ET}_B$  antagonist BQ-788 dose-dependently reduced percent extraction in both groups reaching, at the highest dose of  $10^{-8}$  mole, values of  $4\pm 3\%$  and  $8\pm 9\%$  in the control and MCT groups respectively. The half-inhibitory dose was slightly but significantly higher in the MCT group (-

Log ID<sub>50</sub>=8.9±0.4) compared to the control group (-Log ID<sub>50</sub> =9.5±0.1, *P*=0.03).

### **Effect of BQ-788 on pulmonary flow rate**

In the control group, the specific ET<sub>B</sub> antagonist BQ-788 did not modify flow until the highest dose of 10<sup>-8</sup> mole was reached (Fig. 2). At this dose, a mild flow reduction of 0.7±0.3 ml/min occurred, *P*=0.02 vs. 10<sup>-8</sup>. In the MCT group, BQ-788 caused a significant reduction in flow beginning at the lower dose of 10<sup>-9</sup> mole (*P*=0.04), and a marked reduction of 3.3±0.7 ml/min (*P*<0.01) at the highest dose of 10<sup>-8</sup> mole.

### **Plasma ET-1 levels and production by the lungs**

Mean venous and aortic ET-1 levels more than doubled with the development of pulmonary hypertension (Fig. 3). The arterial levels tended to be lower than the mixed venous levels in both groups, causing a negative ET-1 gradient of 22% and 23% across the control and MCT lungs respectively. The net ET-1 gradient across the lungs was 0.16±0.54 pg/ml in the control group and 0.42±0.92 pg/ml in the MCT group (*P*=0.53). Before the infusion of BQ-788, endothelin-1 levels were not detectable in the isolated lung effluent of both control and MCT animals. After the injection of 10<sup>-8</sup> mole BQ-788 however, they became detectable at a concentration of 0.12±0.02 pg/ml in controls and 0.12±0.03 pg/ml in the MCT group.

### **Effect of the addition of ET-1 in the lung perfusate**

Addition of 2 pg/ml ET-1 in the lung perfusate to reproduce in vivo situation did not modify  $^{125}\text{I}$ -ET-1 removal which was  $54.2\pm 1.6\%$  before and  $54.0\pm 2.1\%$  after,  $P=\text{NS}$ . BQ-788 caused a significant reduction in perfusion flow rate which was apparent after the first dose ( $10^{-12}$  mole). The reduction was of  $0.46\pm 0.09$  ml/min ( $P<0.01$ ) and was not modified with increasing doses of BQ-788. The change in flow induced by BQ-788 was not different from that in the control group in the absence of synthetic ET-1 in the perfusate ( $P=0.14$ ).

### **DISCUSSION**

This study provides new insights into the roles and interactions between the pulmonary endothelial  $\text{ET}_B$  receptor and the local production of ET-1. It further supports a protective role for the endothelial  $\text{ET}_B$  receptor in pulmonary hypertension.

#### **Role of the pulmonary $\text{ET}_B$ as a clearance receptor**

The pulmonary circulation is a major site for ET-1 clearance in all mammals studied to date, including man with a  $\approx 50\%$  ET-1 removal during a single pulmonary transit time.<sup>5</sup> This clearance is mediated by the endothelial  $\text{ET}_B$  receptor as it can be completely blocked by administration of the specific  $\text{ET}_B$  antagonist BQ-788.<sup>11</sup> In the present study, we more precisely characterize for the first time the kinetics of the removal process and demonstrate its alterations in MCT-induced pulmonary hypertension. Animals with pulmonary

hypertension showed a reduced baseline pulmonary ET-1 clearance. The dose-response curves demonstrated gradual inhibition of ET-1 removal as the dose of BQ-788 was increased, with almost complete inhibition at the highest dose of  $10^{-8}$  mole in both groups. The dose inhibiting 50% of  $^{125}\text{I}$ -ET-1 removal (-Log  $\text{ID}_{50}$ ) was mildly higher in the MCT group. These data confirm the unique role of the  $\text{ET}_B$  receptor in the removal process and demonstrate a reduced capacity for ET-1 clearance in the MCT model of pulmonary hypertension. A reduced capacity of the lung to clear ET-1 from the circulation is however not unique to this model. It was also found in rats with myocardial infarction and mild pulmonary hypertension<sup>12</sup> as well as in humans with pulmonary hypertension of various etiologies.<sup>10</sup>

The findings of reduced  $\text{ET}_B$  expression in the lung tissue from both MCT<sup>13</sup> and infarct rats<sup>14</sup> suggest that reduced  $\text{ET}_B$  receptor density is a contributing mechanism. The pulmonary medial hypertrophy observed in the MCT model<sup>15</sup> could indeed reduce the vascular surface area available for ET-1 clearance. Reduced receptor affinity may also contribute since dogs with pulmonary hypertension secondary to tachycardia-induced heart failure also demonstrate a reduced pulmonary ET-1 clearance with markedly depressed ET-receptor binding affinity in the lung tissue.<sup>16</sup> Our findings of reduced baseline ET-1 clearance together with a higher  $\text{ID}_{50}$  suggests that both mechanisms are operative in the MCT model of pulmonary hypertension.

## **Role of the endothelial ET<sub>B</sub> receptor in the regulation of pulmonary vascular tone**

In control animals, blockade of the ET<sub>B</sub> receptor had minimal effect on pulmonary blood flow. Only at the highest dose of BQ-788, almost completely blocking the receptor as assessed from ET-1 removal, did we find a modest reduction in perfusion flow rate. Experiments performed with addition of 2 pg/ml ET-1 in the lung perfusate did not significantly modify the variation in flow rate after BQ-788, with the exception that the effect was observed after the first dose of 10<sup>-12</sup> mole. Since those additional experiments were performed in a recirculating circuit, saturation of the ET<sub>B</sub> by recirculating BQ-788 may explain this lower threshold effect with no subsequent reductions in flow rate at higher doses.

In the MCT-treated group there was a mild reduction of flow at a lower dose of 10<sup>-9</sup> mole but a marked reduction of close to 30% at the highest dose of 10<sup>-8</sup> mole. Of note, is that even though the reduction of flow was greater in pulmonary hypertension, a high degree of ET<sub>B</sub> blockade was necessary since clearance studies using <sup>125</sup>I-ET-1 demonstrated that more than 50% of clearance had to be blocked before any effect could be detected. Our results therefore demonstrate that the endothelial ET<sub>B</sub> plays a minor role in the regulation of pulmonary vascular tone in the absence of pulmonary hypertension; at least as it can be estimated during an acute blockade. With pulmonary hypertension however, the ET<sub>B</sub> receptor plays a protective role by attenuating the increase in pulmonary vascular tone. It does not appear, however, that the ET<sub>B</sub> is a sensitive regulatory mechanism since more than

50% of clearance needs to be blocked before a significant effect is detected. This potential protective role of the ET<sub>B</sub> receptor in conditions of increased pulmonary vascular tone has also been suggested in vivo by attenuation of the increase in pulmonary pressure of beagles with dehydromonocrotaline-induced pulmonary hypertension<sup>17</sup> and of dogs with tachycardia-induced heart failure.<sup>18</sup>

### **Role of local production of ET-1 by the lungs**

ET-1 levels were not detectable in the effluent of isolated lungs. Yet they became measurable after ET<sub>B</sub> blockade in both controls and MCT-treated lungs. Thus, although luminal release of ET-1 is quantitatively small, we demonstrate for the first time that ET-1 produced by the pulmonary vasculature binds to the adjacent ET<sub>B</sub> in a paracrine fashion to modulate pulmonary vascular tone. Our results also suggest that the increase in circulating ET-1 levels found after non-specific ET<sub>A/B</sub> or specific ET<sub>B</sub> blockade may not only result from reduced ET-1 clearance, but also by displacement of locally produced ET-1 from the endothelial ET<sub>B</sub>. The respective importance of these two mechanisms in various models or conditions associated with pulmonary hypertension remains to be demonstrated.

In the normal humans there is minimal<sup>9</sup> or no<sup>5</sup> arteriovenous ET-1 gradient across the lungs despite substantial clearance of ET-1 of close to 50% suggesting that an amount of ET-1 quantitatively similar to the amount extracted is released into the systemic circulation by the lungs. In the present study, we found arteriovenous differences in ET-1 levels of 22% and 23% in



the control and MCT animals respectively. Single pass ET-1 extraction was however much higher in the isolated lungs at 62% and 49% respectively: thus, one has to postulate a significant release of ET-1 from the lungs to the systemic circulation to account for this difference. Consequently, these suggest that the lumenally released ET-1 binds in a paracrine fashion to the local endothelial ET<sub>B</sub> as well as being released in the systemic circulation.

## **CONCLUSION**

### **Should the ET<sub>B</sub> be left alone in pulmonary hypertension?**

The dichotomous role of the ET<sub>B</sub> receptor is presently fueling a debate concerning the use of mixed ET<sub>A/B</sub> versus specific ET<sub>A</sub> antagonist for the therapy of heart failure and pulmonary hypertension. In this study we have shown that the ET<sub>B</sub>, through stimulation by locally released ET-1, has little regulatory role on the pulmonary vasculature of normal rats. Although there is reduced ET<sub>B</sub> activity (demonstrated by reduced ET-1 clearance) in MCT-induced pulmonary hypertension, its regulatory role in the attenuation of pulmonary tone becomes more important in that condition. The high degree of ET<sub>B</sub> blockade needed (more than 50% reduction in ET-1 clearance) to induce an effect on the pulmonary circulation, however suggest that the ET<sub>B</sub> is not a very sensitive regulator of pulmonary vascular tone in that model. Our conclusions are however only applicable to acute blockade of the ET<sub>B</sub> and studies with longer durations of ET<sub>B</sub> blockade are necessary before definitive conclusions can be done. Since the mixed ET receptor antagonists have widely different ET<sub>A</sub> vs. ET<sub>B</sub> selectivity, head to head comparisons with

knowledge of the proportion of ET<sub>B</sub> blocked are therefore required to define the optimal approach to the therapy of pulmonary hypertension of various etiologies.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by the Medical Research Council of Canada, the Fonds de la recherche en santé du Québec and the Fonds de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal. The authors would like to thank Nathalie Ruel for her expert clinical assistance.

## REFERENCES

1. Masaki T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 235-255.
2. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348: 730-732.
3. Warner T D, Mitchell J A, de Nucci G, Vane J R. Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13: S85-S88.
4. Seo B, Luscher T F.  $ET_A$  and  $ET_B$  receptors mediate contraction to endothelin-1 in renal artery of aging SHR. Effects of FR139317 and bosentan. *Hypertension* 1995; 25: 501-506.
5. Dupuis J, Stewart D J, Cernacek P, Gosselin G. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation* 1996; 94: 1578-1584.
6. Wagner O F, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny P J, Schneider B, Waldhausl W, Binder B R. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 16066-16068.
7. Ando K, Hirata Y, Shichiri M, Emori T, Marumo F. Presence of immunoreactive endothelin in human plasma. *FEBS Lett* 1989; 245: 164-166.

8. Dupuis J, Goresky C A, Stewart D J. Pulmonary removal and production of endothelin in the anesthetized dog. *J Appl Physiol* 1994; 76: 694-700.
9. Stewart D J, Levy R D, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* 1991; 114: 464-469.
10. Dupuis J, Cernacek P, Tardif J C, Stewart D J, Gosselin G, Dyrda I, Bonan R, Crepeau J. Reduced pulmonary clearance of endothelin-1 in pulmonary hypertension. *Am Heart J* 1998; 135: 614-620.
11. Dupuis J, Goresky C A, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ET<sub>B</sub> receptors. *J Appl Physiol* 1996; 81: 1510-1515.
12. Dupuis J, Rouleau J L, Cernacek P. Reduced pulmonary clearance of endothelin-1 contributes to the increase of circulating levels in heart failure secondary to myocardial infarction. *Circulation* 1998; 98: 1684-1687.
13. Yorikane R, Miyauchi T, Sakai S, Sakurai T, Yamaguchi I, Sugishita Y, Goto K. Altered expression of ET<sub>B</sub>-receptor mRNA in the lung of rats with pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: 336-338.

14. Kobayashi T, Miyauchi T, Sakai S, Maeda S, Yamagushi I, Goto K, Sugishita Y. Down-regulation of ET<sub>B</sub> receptor, but not ET<sub>A</sub> receptor, in congestive lung secondary to heart failure. *Life Sci* 1998; 62: 185-193.
15. Prié S, Leung TK, Cernacek P, Ryan JW, Dupuis J. The orally active ET(A) receptor antagonist (+)-(S)-2-(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-yloxy)-3-methoxy-3,3-diphenyl-propionic acid (LU 135252) prevents the development of pulmonary hypertension and endothelial metabolic dysfunction in monocrotaline-treated rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282: 1312-1318.
16. Dupuis J, Moe GW, Cernacek P. Reduced pulmonary metabolism of endothelin-1 in canine tachycardia-induced heart failure. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 609-616.
17. Okada M, Yamashita C, Okada K. Role of endothelin-1 in beagles with dehydromonocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 1995; 92: 114-119.
18. Wada A, Tsutamoto T, Fukai D, Ohnishi M, Maeda K, Hisanaga T, Maeda Y, Matsuda Y, Kinoshita M. Comparison of the effects of selective endothelin ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptor antagonists in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 1385-1392.

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1** Effect of increasing doses of the specific ET<sub>B</sub> receptor antagonist BQ-788 on pulmonary ET-1 removal in controls and in rats with MCT-induced pulmonary hypertension. \*  $P < 0.05$  vs. control; ‡  $P < 0.05$  vs.  $10^{-12}$ .

**Figure 2** Variation of perfusion flow rate with increasing doses of the specific ET<sub>B</sub> receptor antagonist BQ-788 in isolated lungs from controls and MCT-induced pulmonary hypertensive rats. \*\*  $P < 0.01$  vs. control; †  $P < 0.05$  and ‡  $P < 0.01$  vs.  $10^{-12}$ .

**Figure 3** Immunoreactive ET-1 levels measure in plasma taken from the right ventricle (venous) and the aorta (arterial) of controls and of rats with MCT-induced pulmonary hypertension. \*\*  $P < 0.01$  vs. control.

Figure 1

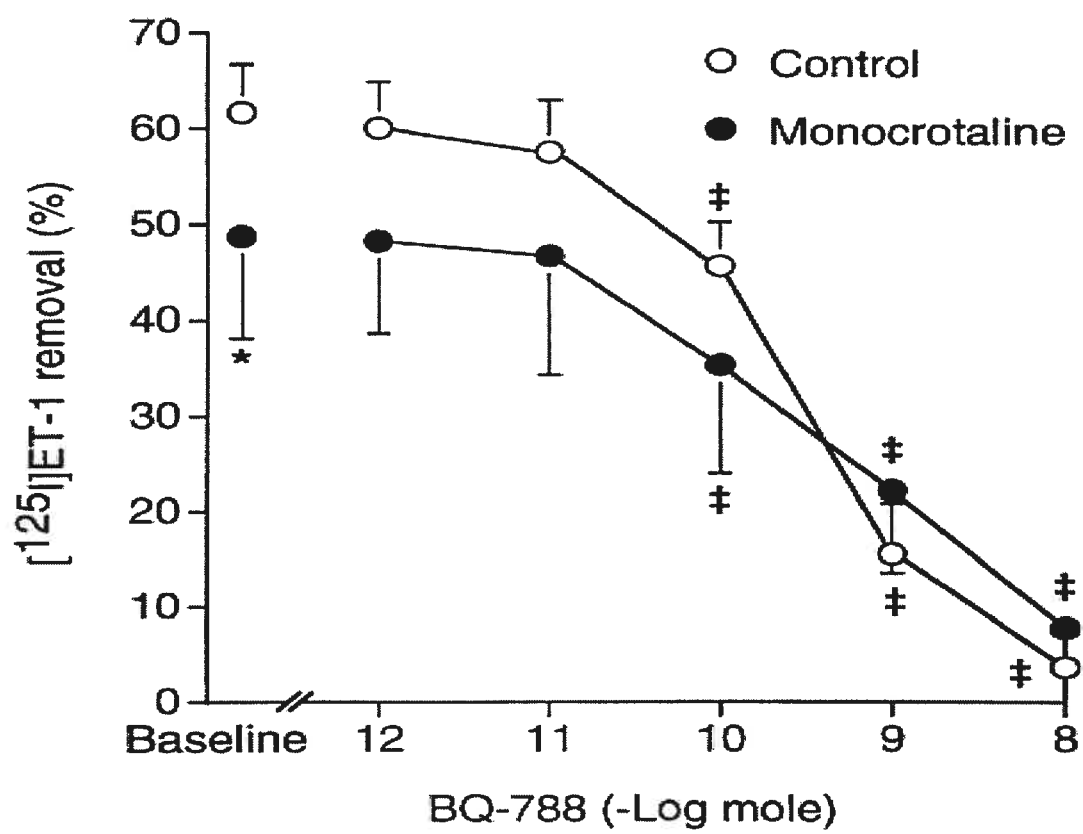


Figure 2

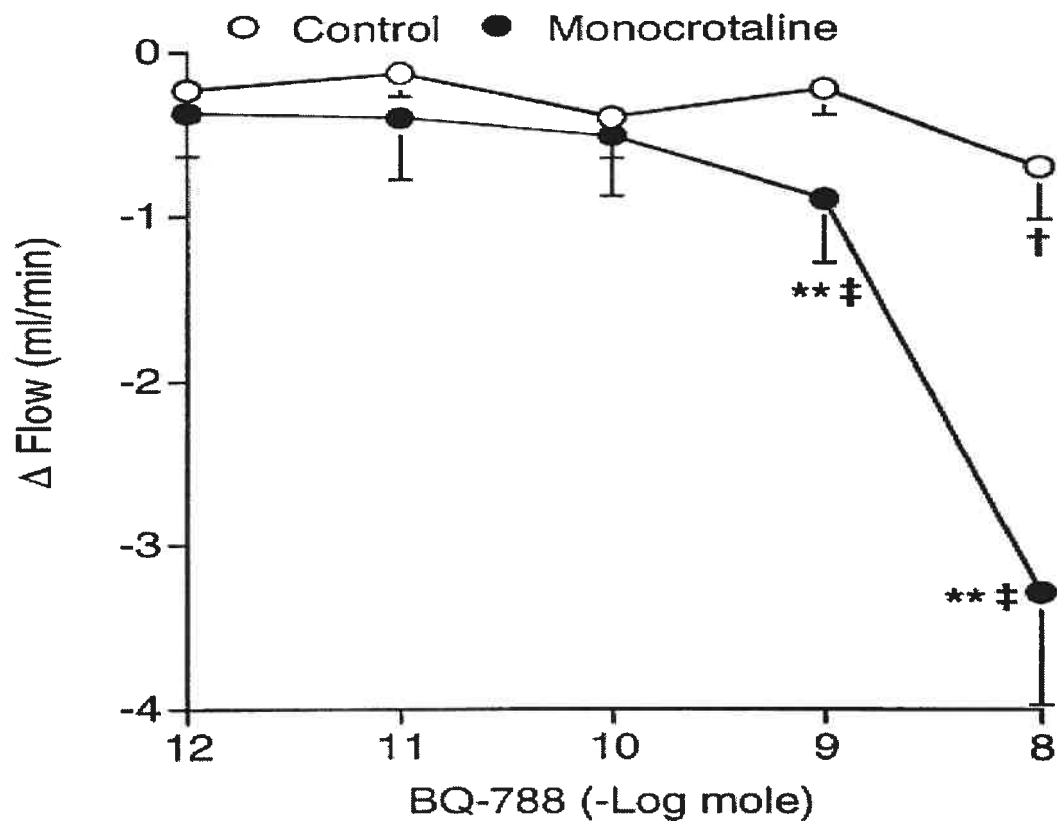
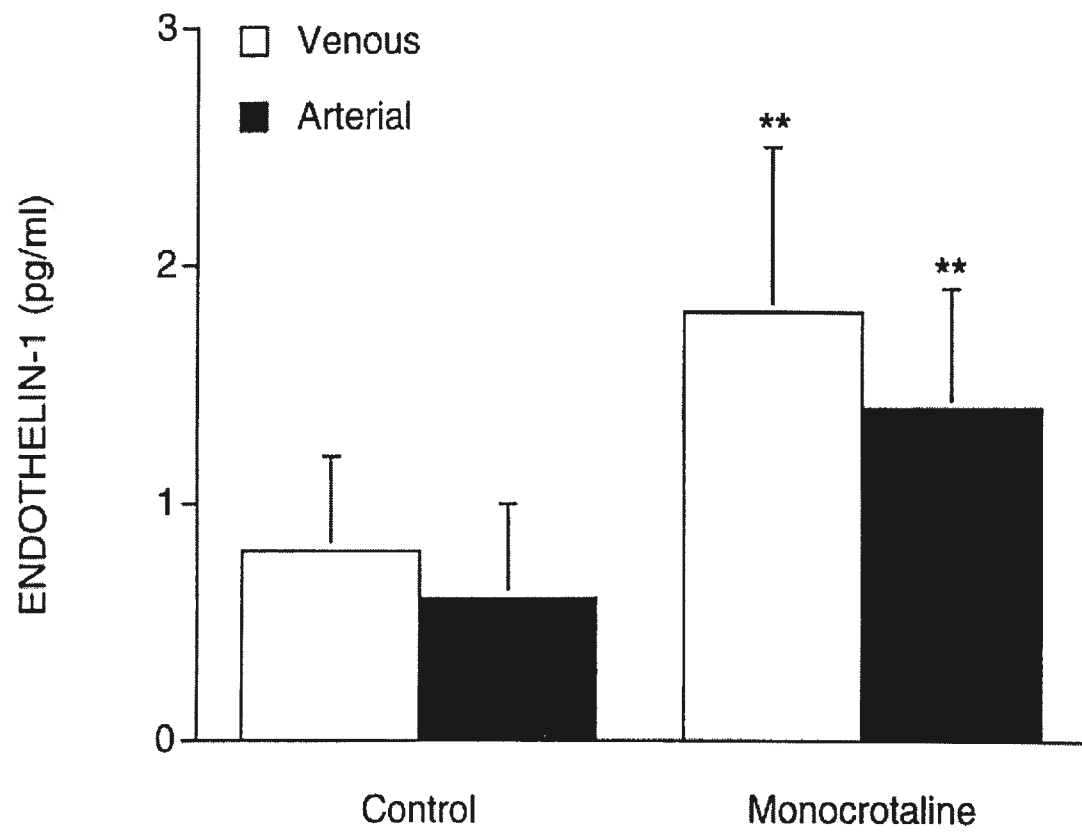




Figure 3



### **3.2-ARTICLE # 2**

#### **Activation of the right ventricular endothelin system in pulmonary arterial hypertension: Response to chronic ET<sub>A</sub> receptor blockade**

Jean-François Jasmin, Peter Cernacek, Jocelyn Dupuis

Research Center, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, H1T 1C8,  
Canada

**Clin Sci (Lond). 2003; 105(6): 647-653**

## ABSTRACT

**Objectives:** Although activation of the endothelin system contributes to pulmonary arterial hypertension, modifications of the cardiopulmonary endothelin system, and its responses to chronic endothelin receptor blockade are not well known.

**Methods and Results:** Rats were injected with monocrotaline (60 mg/kg i.p.) or saline, followed with treatment with the selective ET<sub>A</sub> receptor antagonist LU135252 (50 mg/kg/day) or with saline. After 3 weeks, hemodynamics, cardiac hypertrophy, ET-1 levels, and cardiopulmonary endothelin receptor binding profile were evaluated. Monocrotaline ( $n=7$ ) elicited marked pulmonary arterial hypertension and right ventricular hypertrophy compared to controls ( $n=8$ ). Both variables were substantially attenuated by LU135252 therapy ( $n=8$ ,  $P<0.05$  for both). After monocrotaline, right ventricular ET-1 levels were significantly more increased than in the left ventricle (+198% versus +127%,  $P<0.05$ ). ET<sub>B</sub> receptor density was augmented (3 fold) in the right ventricle while that of ET<sub>A</sub> receptors was not affected. LU135252 treatment also significantly attenuated these alterations ( $P<0.05$ ). In the lungs, ET-1 levels were not increased after monocrotaline, while the balance of ET<sub>B</sub> versus ET<sub>A</sub> receptors was altered, with a trend toward a lower percentage of ET<sub>B</sub> than in the control rats. LU135252 treatment did not affect these variables in the lungs.

**Conclusions:** Monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension and right ventricular hypertrophy are associated with upregulation of ET-1 and ET<sub>B</sub> receptors in the right ventricle. These alterations are attenuated with the

reduction of pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy after chronic blockade of the ET<sub>A</sub> receptors, supporting the role of the endothelin system in right ventricular hypertrophy.

**Keywords:** Cardiac hypertrophy; Endothelin; Endothelin receptors; Pulmonary arterial hypertension

## INTRODUCTION

Plasma levels of endothelin-1 (ET-1), a potent vasoconstrictor and pro-mitogenic peptide, are elevated in patients with primary and secondary pulmonary hypertension [1-4], and in experimental models of these conditions such as chronic hypoxia [5], administration of monocrotaline (MCT) [6,7], or infarction-induced congestive heart failure (CHF) [8,9]. This is usually associated with an increased expression of ET-1 in the lungs [9-11]. Moreover, we and others have shown that ET-1 importantly contributes to the pathophysiology of pulmonary hypertension as chronic ET receptor antagonism markedly reduced both pulmonary pressures and right ventricular hypertrophy in pulmonary hypertension induced by hypoxia [5], MCT [6,7,12] or infarction-induced CHF [13]. However, the alterations of ET-1 and of its receptors in the lung and heart in pulmonary hypertension, as well as the responses of the cardiopulmonary ET system to chronic ET receptor blockade, are not well known in this setting.

The effects of ET are mediated by two distinct receptors termed ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> [14,15]. The ET<sub>A</sub> receptors are localized on vascular smooth muscle cells and mediate the constrictive and proliferative effects. The ET<sub>B</sub> receptors are mainly expressed on vascular endothelium and mediate vascular relaxation as well as clearance of circulating ET-1 [16]. More recently, ET<sub>B</sub> receptors were also demonstrated on vascular smooth muscle cells where their occupancy has a constrictor effect [17]. In the cardiomyocytes, over 90% of ET receptors belong to the ET<sub>A</sub> subtype [18,19] and their stimulation has a positive inotropic effect. However, the role of cardiac ET<sub>B</sub> receptors

remains unclear. During cardiac hypertrophy, they may contribute to cardiac fibrosis [20,21]. Interestingly, increased gene expression of both ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptor in the right ventricle (RV) was shown in animal models such as MCT and hypoxia-induced pulmonary hypertension [22,23].

In the present experiments we studied the alterations of ventricular and pulmonary ET, its receptors, as well as their responses to chronic treatment with the selective ET<sub>A</sub> receptor antagonist LU135252 (LU) in rats with MCT-induced pulmonary arterial hypertension (PAH).

## **METHODS**

This study comply with the guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (Canadian Council for Animal Care) and was approved by the Animal Research Committee of the Montreal Heart Institute. Male Sprague-Dawley rats (275-375 g, Charles River) were randomly assigned to received an i.p. injection of either 0.5 ml 0.9% saline or 0.5 ml of MCT (60 mg/kg). This was followed by twice daily gavage with either 1 ml 0.9% saline or 1 ml of LU (50 mg/kg/day), starting 48 hrs before i.p. injection and continued for 3 weeks. This resulted in four groups: control+saline (Ctr,  $n=8$ ), control + LU ( $n=7$ ), MCT+saline (MCT,  $n=7$ ), and MCT+LU ( $n=8$ ). The MCT was dissolved in 1 N HCl, and its pH adjusted to 7.4 with 0.5 N NaOH. LU was dissolved in 1 N NaOH, and its pH adjusted to 7.4 with 0.5 N HCl. LU was generously donated by Dr. M. Kirchengast, Knoll AG, Germany.

### **Experimental Protocol**

Gavages were stopped 48 h before anesthesia with xylazine (10 mg/kg) and ketamine (50 mg/kg). The right jugular vein and carotid artery were then isolated, incised and polyethylene catheters (PE 50; 0.97 mm OD, 0.58 mm ID) were advanced in the right and left ventricles (RV and LV). RV and LV pressures were measured and recorded using a polygraph (Gould TA 4000). Blood samples were then collected from the RV and from the carotid artery to measure plasma ET-1 levels.

### **Measurement of ET-1 levels**

Plasma ET-1 was measured with a radioimmunoassay after extraction on SepPak C18 cartridges (Waters Limited) as previously described [9]. To measure tissue (ventricles, lung) ET-1, dissected ventricles and lungs were briefly rinsed in ice-cold saline and immediately frozen in liquid nitrogen to be stored at -80°C. Pieces of ventricles (approximately 100 mg) and lungs (30-50 mg) were then processed as previously described [24]. In brief, the samples were homogenized with Polytron (Brinkman) in 4 M guanidine thiocyanate/0.1% trifluoroacetic acid, an aliquot taken for protein determination, and the homogenate centrifuged at 5000 g for 20 min at 4°C. The supernatant was loaded on a SepPak C18-cartridge. After washing with 4 ml of H<sub>2</sub>O and 4 ml of 20% methanol, the absorbed peptides were eluted with 4 ml of 90% ethanol. Recovery of the whole procedure was 66% as assessed with tissue samples spiked with native ET-1. ET-1 content is

expressed in fg/mg wet tissue weight (ventricles), or in pg/mg wet tissue weight (lungs).

### **ET receptor assessment by radioligand binding**

Tissue samples were homogenized on ice in 2 ml of TRIS buffer (in mM: 25 TRIS.HCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 250 sucrose, 5 HEPES, pH 7.4) with Polytron at 13,000 rpm with six bursts of 15 s each. Membranes were then prepared and experiments performed as previously described [25]. In brief, the homogenate was centrifuged at 1000 g for 10 min at 4°C, the supernatant collected and centrifuged at 35,000 g for 30 min at 4°C. The pellet was resuspended in TRIS buffer, aliquoted and stored at -80°C. The membrane protein was determined by the dye-binding method (Biorad) with bovine serum albumin (BSA) as the standard. The density, type, and affinity of ET receptors were assessed by competitive binding experiments. Radioiodinated ET-1 (<sup>125</sup>I-ET1) (50 µl, 12-25 pM) was added to each tube containing 50 µl of Tris buffer or increasing concentrations of unlabeled ET-1 (3×10<sup>-11</sup> M to 3×10<sup>-9</sup> M), a selective ET<sub>A</sub>-antagonist (BQ123, 10<sup>-11</sup>-10<sup>-5</sup> M) or a selective ET<sub>B</sub>-antagonist (sarafotoxin S6c, 10<sup>-12</sup>-10<sup>-6</sup> M). Non-specific binding was determined at the saturating concentration of ET-1 (2×10<sup>-7</sup> M) and it was always <1.5% of the total radioactivity. The reaction was started by adding 100 µl of the membrane protein (0.8-1 µg for the lungs, 4-6 µg for the ventricles). After 3 h at room temperature, the reaction was stopped by the addition of 1 ml of ice-cold phosphate-buffered saline with 0.5% BSA and a rapid centrifugation at 12,000 g for 3 min. Radioactivity of the resulting



pellets was counted in an automated gamma-counter. The dissociation constant ( $K_d$ ) and maximum binding capacity ( $B_{max}$ ) were obtained using an iterative non-linear regression analysis of bound and free radioactivity data (Inplot, Graphpad Software Inc.).  $^{125}\text{I}$ -ET-1 was purchased from Perkin Elmer Life Sciences. Unlabeled ET-1, BQ-123 and Sarafotoxin were purchased from American Peptide Company.

### **Statistical analysis**

All results are presented as mean $\pm$ S.E.M. The comparisons among groups were performed with ANOVA followed by Bonferroni correction. The comparisons of ET-1 levels and ET receptor binding data between the RV and LV, as well as plasma ET-1 levels in venous and arterial samples were performed with paired Student's *t*-test or Wilcoxon non-parametric test as applicable. Statistical significance was assumed when  $P < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Hemodynamics and cardiac morphology**

Similarly as in our previous studies [7,13,26], right ventricular systolic pressure (RVSP) was markedly increased 3 weeks after the administration of MCT (Fig. 1) documenting severe PH in this group. This was associated with a marked RV (but not LV) hypertrophy as assessed by RV and LV weight (Table 1) and by the ratio of RV/LV+ septum (S) weight (Fig. 1). The increases in both RVSP and RV/LV+S ratio were significantly attenuated by LU treatment in the MCT rats, while this treatment had no effect in the Ctr

group (Fig. 1). Systolic blood pressure was equivalent in all four groups, while heart rate was higher in MCT+LU than in Ctr+LU ( $P<0.02$ , Table 1).

### **Plasma ET-1 levels**

Both venous and arterial ET-1 levels were significantly higher (2.1-fold and 2.6-fold, respectively) in MCT rats than in Ctr rats (Fig. 2). The high ET-1 levels in MCT rats were not affected by LU treatment. In each of the four groups, there was a negative concentration gradient across the lungs suggesting a net pulmonary extraction of ET-1. This however, achieved significance only in Ctr rats ( $P=0.047$ ).

### **Cardiac ET system**

ET-1 levels in the RV and LV are presented in Fig. 3A. MCT administration led to a marked increase in LV ET-1 (+127% as compared to Ctr rats), and RV ET-1 (+198%). After MCT, RV ET-1 was significantly higher than LV ET-1. In no other group was there any difference between the LV and RV ET-1 levels. The increases in ventricular ET-1 were significantly attenuated by LU treatment in the RV, but not in the LV. In the competition binding experiments, affinity of ET receptors to ET-1 ( $K_d$ ) was equivalent in all four groups, both in the RV and LV (Table 2). As well, the density ( $B_{max}$ ) of  $ET_A$  was not different among the groups in the LV and RV. In contrast, the density of  $ET_B$  was significantly increased after MCT in RV but not in LV, and this was markedly attenuated with LU treatment. The selective increase in RV  $ET_B$  receptors was even more evident when their density was expressed as the

percentage of the total ET binding sites (Table 2). In the control ventricles, ET<sub>B</sub> receptors represented only 6-9% of ET binding sites. In the MCT rats, this increased 3-fold in the RV, without any change in the LV. This increased relative density of ET<sub>B</sub> in the RV was also attenuated by LU treatment though the difference vs. MCT failed to achieve the level of significance ( $P=0.076$ ).

### **Pulmonary ET system**

In both groups of rats which received MCT (with or without LU treatment), there was a tendency to lower pulmonary ET-1 levels, without achieving the level of significance (Fig. 3B). ET-1 levels were not affected by LU treatment in either group. The ET<sub>A</sub> receptor density (Table 2) tended to be higher in both MCT groups, without achieving the levels of significance, and without a change in ET<sub>B</sub> receptor density. Thus, the percentage of ET<sub>B</sub> receptors was lower in both MCT groups, without any effect of the LU treatment.

### **DISCUSSION**

The major findings of this study are that in the MCT model of PAH and RV hypertrophy; 1) ventricular ET-1 is markedly increased in the hypertrophic RV but much less so in the non-hypertrophic LV; 2) RV hypertrophy is associated with an increase in local ET<sub>B</sub> receptors density; 3) both RV ET-1 levels and ET<sub>B</sub> receptor density are reduced by chronic ET<sub>A</sub> antagonist therapy with concomitant reduction of PAH and RV hypertrophy; 4) pulmonary ET-1 levels and the relative density of pulmonary ET<sub>B</sub> receptors tend to be lower after

MCT, and neither of these parameters is affected by the chronic LU treatment in spite of the significant reduction of PAH.

The ET system is activated in cardiac hypertrophy of various origins, such as pressure-overload, norepinephrine administration, or coronary ligation-induced CHF [9,27-29]. Furthermore, studies in which these conditions were improved by chronic administration of ET receptor antagonists confirmed the direct role of this paracrine/autocrine system in the development of cardiac hypertrophy [8,28-30]. Our present results in which ET-1 and ET<sub>B</sub> receptors were selectively augmented in the hypertrophied RV strongly supports this concept. Furthermore, we now show that the regression of cardiac hypertrophy is associated with attenuation or normalization of the alterations in the ventricular ET system. In cardiac hypertrophy induced by infarction, hypoxia or MCT, in addition to ET-1 [9,22,23,29,31,32], both ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors were found to be augmented [22,23,29,31,32]. In the present study, we have observed a selective increase in RV ET<sub>B</sub> receptors. In the ventricles of the control rats, the proportion of ET<sub>B</sub> was low (<10%), in very good agreement with the results of others in the rat ventricular membranes [33] and in the rat or human isolated cardiomyocytes [18,19]. Whether the selective increase in the RV ET<sub>B</sub> receptors is a specific feature of the MCT model remains to be clarified. The role of ventricular ET<sub>B</sub> receptors is not clear. Those expressed in the cardiomyocytes may contribute to the hypertrophic and inotropic effects of ET [34,35], while ET<sub>B</sub> receptors of cardiac fibroblasts appear to be involved in the regulation of collagen metabolism [20]. Interestingly, in the hypertrophied

ventricle, chronic blockade of ET<sub>B</sub> but not of ET<sub>A</sub> receptors could attenuate interstitial and perivascular fibrosis [21] typically associated with cardiac hypertrophy and remodeling. Since RV ET<sub>B</sub> receptor density was reduced by a selective ET<sub>A</sub> receptor antagonist, it suggests that this effect was secondary to RV pressure overload and that the reduction in RV ET<sub>B</sub> density was not a direct myocardial effect of the drug. However, since LU is not a highly selective ET<sub>A</sub> antagonist (K<sub>i</sub> of 1,4 nM for ET<sub>A</sub> versus 184 nM for ET<sub>B</sub> receptor) we cannot exclude that some of the effect could have been drug dependent. Comparison of more selective ET<sub>A</sub> antagonists and non-selective antagonists would be needed to resolve this issue.

In the lungs, we have found strikingly similar ET-1 levels as those reported by Miyauchi et al. [6] although the method of extraction and the assay technique were quite different (RIA vs. a sandwich-type enzyme immunoassay). In both of these studies, pulmonary ET-1 levels were not increased after MCT, yet the chronic administration of an ET<sub>A</sub> antagonist markedly reduced pulmonary pressure. In the present study, we have also analyzed the profile of pulmonary ET receptors in MCT-induced pulmonary hypertension. In the whole-lung membranes of the control rats, the proportion of ET<sub>B</sub> receptors was 39%, strikingly similar to the proportions of 45% and 41% that we previously observed in the isolated rat pulmonary arteries and veins, respectively [25]. This suggests that the whole-lung membrane preparation represents reasonably well the ET receptor profile in the pulmonary vascular bed. After MCT, the proportion of ET<sub>B</sub> receptors was lower although the absolute density of either receptor subtype was not

significantly altered. Functional importance of this altered  $ET_B$  to  $ET_A$  balance remains unclear, as it may reflect a lower  $ET_B$  expression in the pulmonary vascular endothelium, vascular smooth muscle cells, or in the tracheobronchial tree, as well as a higher expression of the vascular  $ET_A$  receptors. As the contractile response of the pulmonary vasculature to ET-1 is reduced in this model of PH [6], it is possible that a lower expression of the constrictor  $ET_B$  receptors on the pulmonary vascular smooth muscle would contribute to it.

The pulmonary  $ET_B$  receptor is the main pathway of the clearance of ET-1 in the lungs [16]. Thus, its lower relative density in pulmonary endothelium after MCT may well contribute to the reduced pulmonary clearance of ET-1 that we recently observed in this model [36], and in fact, to the increases in circulating ET-1 levels.

In conclusion, MCT-induced PH which elicits a selective RV hypertrophy is associated with a selective increase in right ventricular ET-1 and in  $ET_B$  receptors. Chronic treatment with LU135252 which reduced pulmonary hypertension and RV hypertrophy, markedly attenuated these alterations in the cardiac ET system, thus supporting a significant role of the ET system in right ventricular hypertrophy. MCT-induced PH is also associated with an altered balance of  $ET_B$  vs.  $ET_A$  receptors in the lungs, which may contribute to the abnormal pulmonary vascular reactivity and the reduced ET-1 clearance in this setting.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

Excellent technical assistance of Ms. Nathalie Ruel and Mr. Luigi Franchi is gratefully acknowledged. This work was supported by the Canadian Institute of Health Research, the "Fonds de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal" and the Canadian Heart and Stroke Foundation. Dr. Jocelyn Dupuis is a senior scholar from the "Fonds de la recherche en santé du Québec".

**REFERENCES**

- [1] Stewart DJ, Levy R, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* 1991;114:464-469.
- [2] Stewart DJ, Cernacek P, Costello K, Rouleau J. Elevated endothelin-1 in heart failure and loss of normal response to postural change. *Circulation* 1992;85:510-517.
- [3] Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ et al. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* 1994;89:1580-1586.
- [4] Dupuis J, Cernacek P, Tardif JC et al. Reduced pulmonary clearance of endothelin-1 in pulmonary hypertension. *Am Heart J* 1998;135:614-620.
- [5] DiCarlo VS, Chen SJ, Meng QC et al. ET<sub>A</sub>-receptor antagonist prevents and reverses chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rat. *Am J Physiol* 1995;269:L690-L697.
- [6] Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S et al. Contribution of endogenous endothelin-1 to progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 1993;73:887-897.
- [7] Prié S, Leung TK, Cernacek P, Ryan JW, Dupuis J. Orally active ET<sub>A</sub> receptor antagonist LU 135252 prevents the development of pulmonary hypertension and endothelial metabolic dysfunction in monocrotaline-treated rats. *J Pharm Exp Ther* 1997;282:1312-1318.



- [8] Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T et al. Endogenous endothelin-1 production participates in maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure. *Circulation* 1996;93:1214-1222.
- [9] Nguyen QT, Cernacek P, Calderone A et al. Endothelin-A receptor blockade causes adverse left ventricular remodeling but improves pulmonary artery pressure after infarction in the rat. *Circulation* 1998;98:2323-2330.
- [10] Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993;328:1732-1739.
- [11] Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T et al. Pulmonary hypertension caused by congestive heart failure is ameliorated by long-term application of an endothelin receptor antagonist. Increased expression of endothelin-1 immunoreactivity in the lungs in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:1580-1588.
- [12] Okada M, Yamashita C, Okada M, Okada K. Endothelin receptor antagonists in a beagle model of pulmonary hypertension: contribution to possible potential therapy? *J Am Coll Cardiol* 1995;25:1213-1217.
- [13] Lucas M, Jasmin JF, Dupuis J. Effect of ET<sub>A</sub> receptor antagonists on pulmonary hypertension and vascular reactivity in rats with congestive heart failure. *Pulm Pharmacol Ther* 2001;14:307-314.
- [14] Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990;348:730-732.

- [15] Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y et al. Cloning of a cDNA encoding a non isopeptide selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990;348:732-735.
- [16] Dupuis J, Goresky CA, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol* 1996;81:1510-1515.
- [17] Bird JE, Waldron TL. Incomplete inhibition of endothelin-1 pressor effects by an endothelin ETA receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1993;240:295-298.
- [18] Fareh J, Touyz RM, Schiffrin EL, Thibault G. Endothelin-1 and angiotensin II receptors in cells from rat hypertrophied heart. *Circ Res* 1996;78:302-311.
- [19] Modesti PA, Vanni S, Paniccia R et al. Characterization of receptor subtypes in isolated human cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;34:333-339.
- [20] Katwa LC, Guarda E, Weber KT. Endothelin receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1993;27:2125-2129.
- [21] Hocher B, George I, Rebstock J et al. Endothelin system-dependent cardiac remodeling in renovascular hypertension. *Hypertension* 1999;33:816-822.
- [22] Ueno M, Miyauchi T, Sakai S, Kobayashi T, Goto K, Yamaguchi I. Effects of physiological or pathological pressure load in vivo on myocardial expression of ET-1 and receptors. *Am J Physiol* 1999;277:R1321-R1330.

- [23] Li H, Elton TS, Chen YF, Oparil S. Increased endothelin receptor gene expression in hypoxic rat lung. *Am J Physiol* 1994;266:L553-L560.
- [24] Forbes RDC, Cernacek P, Zheng S, Gomersall M, Guttmann RD. Increased endothelin expression in rat cardiac allograft model of chronic rejection vasculopathy. *Transplantation* 1996;61:791-797.
- [25] Shi W, Cernacek P, Fu H, Michel R. Pulmonary vascular reactivity and endothelin receptor profile in post-obstructive pulmonary vasculopathy. *Am J Physiol* 1997;273:H2558-H2564.
- [26] Prié S, Stewart DJ, Dupuis J. Endothelin A receptor blockade improves nitric oxide-mediated vasodilation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 1998;97:2169-2174.
- [27] Arai M, Yoguchi A, Iso T et al. Endothelin-1 and its binding sites are upregulated in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol* 1995;268:H2084-H2091.
- [28] Kaddoura S, Firth JD, Boheler KR, Sugden PH, Poole-Wilson PA. Endothelin-1 is involved in norepinephrine-induced ventricular hypertrophy in vivo. *Circulation* 1996;93:2068-2079.
- [29] Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita S. Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long term survival in heart failure. *Nature* 1996;384:353-355.
- [30] Mulder P, Richard V, Derumeaux G et al. Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation* 1997;96:1976-1982.

- [31] Oie E, Vinge LE, Tonnessen T et al. Transient, isopeptide selective induction of myocardial endothelin-1 mRNA in congestive heart failure rats. *Am J Physiol* 1997;273:H1727-H1736.
- [32] Kobayashi T, Miyauchi T, Sakai S et al. Expression of endothelin-1, ETA and ET<sub>B</sub> receptors, and ECE and distribution of endothelin-1 in failing rat heart. *Am J Physiol* 1999;276:H1197-H1206.
- [33] Thibault G, Arguin C, Garcia R. Cardiac endothelin-1 content and receptor subtypes in spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:2327-2336.
- [34] Beyer M, Slesak G, Hovelborn T, Kazmaier S, Nerz S, Hoffmeister HM. Inotropic effect of endothelin-1. Interaction with molsidomine and BQ610. *Hypertension* 1999;33:145-152.
- [35] MacCarthy PA, Grocott-Mason R, Prendergast BD, Shah AM. Contrasting inotropic effects of endogenous endothelin in the normal and failing human heart. Studies with intracoronary ETA receptor antagonist. *Circulation* 2000;101:142-147.
- [36] Dupuis J, Jasmin JF, Prie S, Cernacek P. Importance of local production of endothelin-1 and of the ETB receptor in the regulation of pulmonary vascular tone. *Pulm Pharmacol Ther* 2000;13:135-140.

**Table 1****Morphologic and hemodynamic parameters**

	Ctr	Ctr+LU	MCT	MCT+LU
<i>n</i>	8	7	7	8
Body weight, g	320.5±6.8	321±12	316±9.2	287±5.9 <sup>a</sup>
Heart rate, bpm	359±21	303±12	340±19.6	384±13.3 <sup>c</sup>
SBP, mmHg	108±11	85±3.2	116±9	110±9.4
RV weight, mg	234±14	225±6.8	520±34 <sup>a</sup>	226±24.7 <sup>b</sup>
LV weight, mg	889±31	819±37	745±33.5	675±34.2

All data are mean±S.E.M. "*n*" indicates, number of rats in each group; Ctr, control; LU, LU135252; MCT, monocrotaline; SBP, systolic blood pressure; RV, right ventricle; LV, left ventricle. <sup>a</sup>Significantly different from Ctr. <sup>b</sup>Significantly different from MCT. <sup>c</sup>Significantly different from Ctr+LU.

**Table 2****Kinetic parameters of  $^{125}$ I-ET-1 binding in cardiac ventricles and in the lungs**

	Ctr	Ctr+LU	MCT	MCT+LU
<b>Right ventricle</b>				
$K_d$ , pM	197±24	188±11.8	197±13.9	197±20.6
ET <sub>A</sub> , B <sub>max</sub> , fM/mg	1453±159	1328±233	1421±116	1341±253
ET <sub>B</sub> , B <sub>max</sub> , fM/mg	94±22	123±16	309±62 <sup>a</sup>	163±30 <sup>b</sup>
ET <sub>B</sub> , % of total	5.9±0.8	9.2±1.2	17.8±3.1 <sup>a</sup>	11.3±1.1 <sup>a</sup>
<b>Left ventricle</b>				
$K_d$ , pM	189±15	192±14	195±15	186±14
ET <sub>A</sub> , B <sub>max</sub> , fM/mg	1250±180	1495±190	1522±280	1561±265
ET <sub>B</sub> , B <sub>max</sub> , fM/mg	115±28	142±35	156±36 <sup>c</sup>	168±32
ET <sub>B</sub> , % of total	8.4±0.9	8.7±1.0	9.3±1.0 <sup>c</sup>	9.7±1.2
<b>Lungs</b>				
$K_d$ , pM	167±13.4	169±11.1	169±4.7	189±18.2
ET <sub>A</sub> , B <sub>max</sub> , fM/mg	2636±190	2909±196	3271±295	3792±181
ET <sub>B</sub> , B <sub>max</sub> , fM/mg	1693±128	1734±105	1572±166	1470±118
ET <sub>B</sub> , % of total	39.2±3.0	38±0.5	32.8±4.2	27.8±0.9 <sup>d</sup>

All data are presented as mean±S.E.M. Ctr indicates, control; LU, LU135252; MCT, monocrotaline;  $K_d$ , dissociation constant. "n" is 5 to 6 for the ventricles, 4 to 5 for the lungs. <sup>a</sup>Significantly different from Ctr. <sup>b</sup>Significantly different from MCT. <sup>c</sup>Significantly different from the corresponding value in the right ventricle. <sup>d</sup>Significantly different from Ctr+LU.

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1.** Right ventricular systolic pressure (panel A), and the ratio RV/LV+S (panel B), in control rats (empty bars,  $n=8$ ), control rats treated with LU (dotted bars,  $n=7$ ), MCT rats (full bars,  $n=7$ ), and LU-treated MCT rats (hatched bars,  $n=8$ ). \*Significantly different from control; + significantly different from MCT.

**Figure 2.** Venous (dotted bars) and aortic (full bars) plasma ET-1 levels in Ctr ( $n=7$ ), Ctr+LU ( $n=6$ ), MCT ( $n=7$ ), and MCT+LU ( $n=6$ ) rats. & Significantly different from venous; \* Significantly different from Ctr; + significantly different from Ctr+LU.

**Figure 3.** Ventricular (panel A) and pulmonary (panel B) ET-1 levels. Panel A: Left (empty bars) and right (hatched bars) ventricular ET-1 in control rats (Ctr,  $n=8$ ), LU-treated control rats (Ctr+LU,  $n=6$ ), MCT rats (MCT,  $n=7$ ), and LU-treated MCT-rats (MCT+LU,  $n=8$ ). \* Significantly different from Ctr; + significantly different from MCT; & significantly different from left ventricle. Panel B: Pulmonary ET-1 in Ctr ( $n=7$ ), Ctr+LU ( $n=8$ ), MCT ( $n=7$ ), and MCT+LU rats ( $n=8$ ).

Figure 1

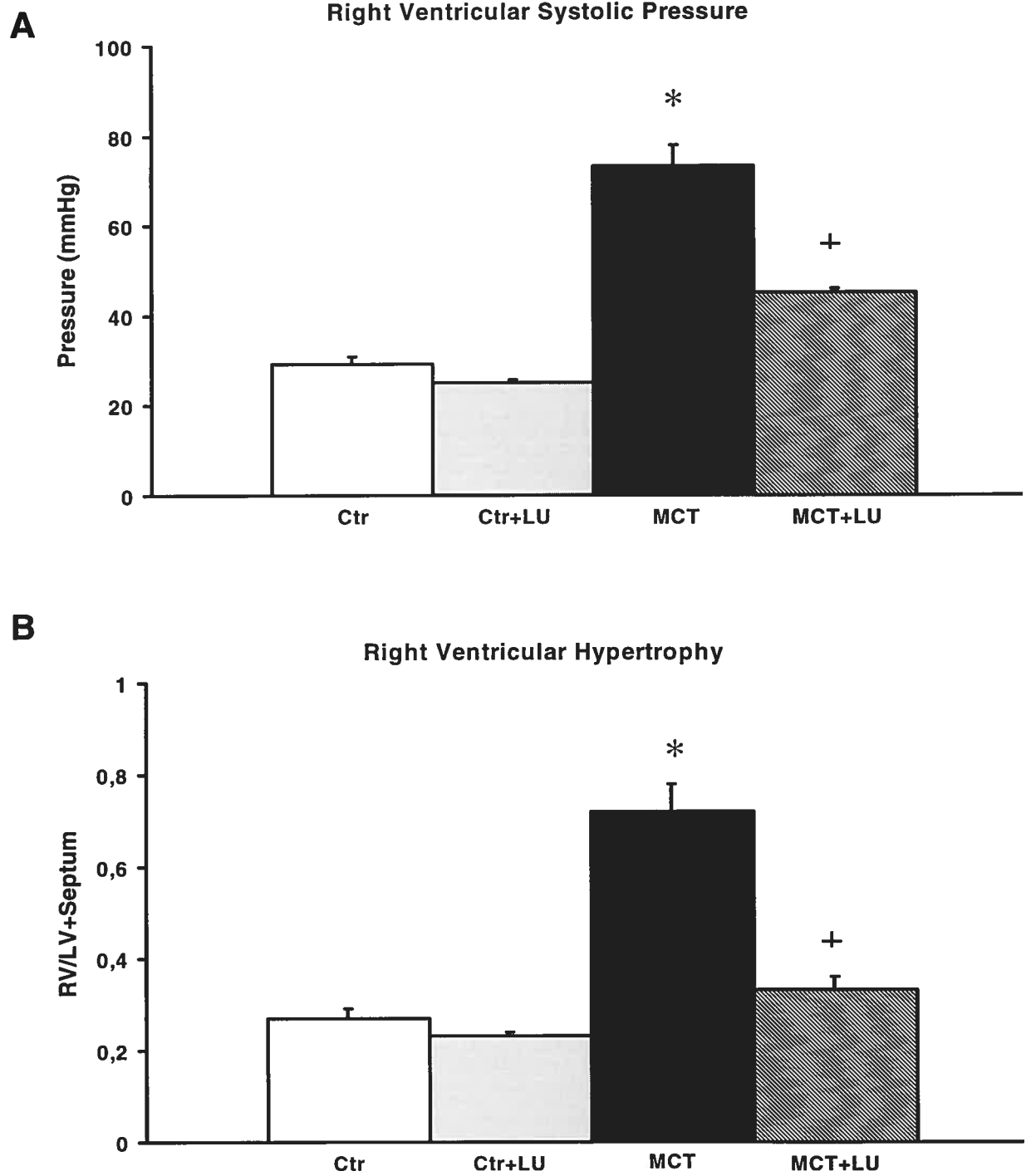




Figure 2

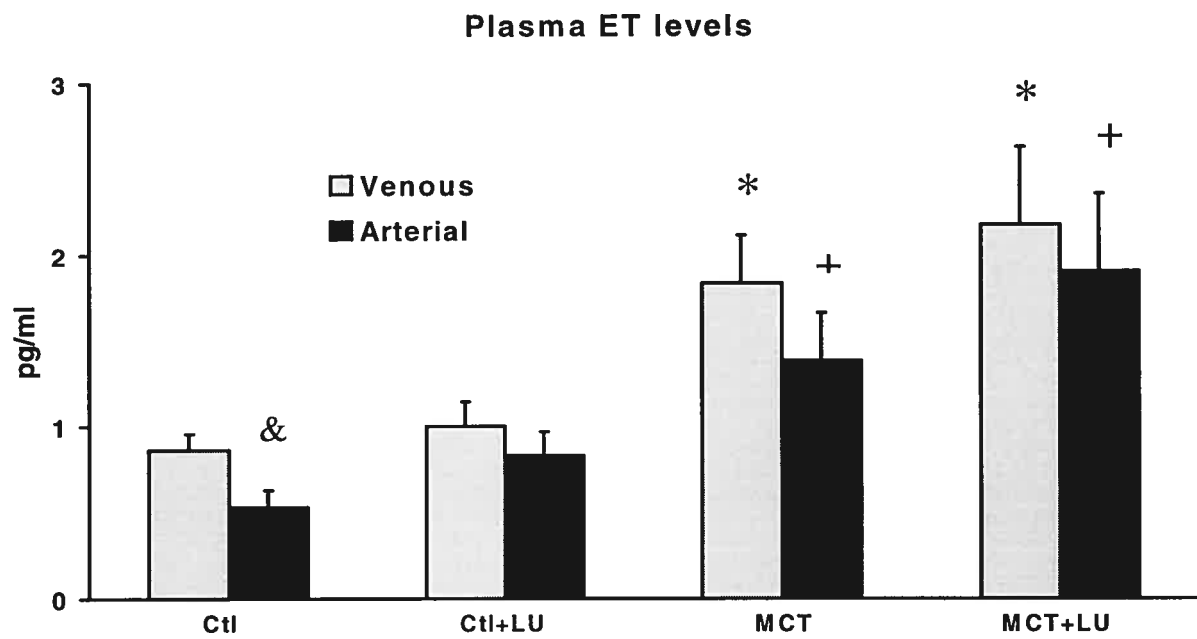
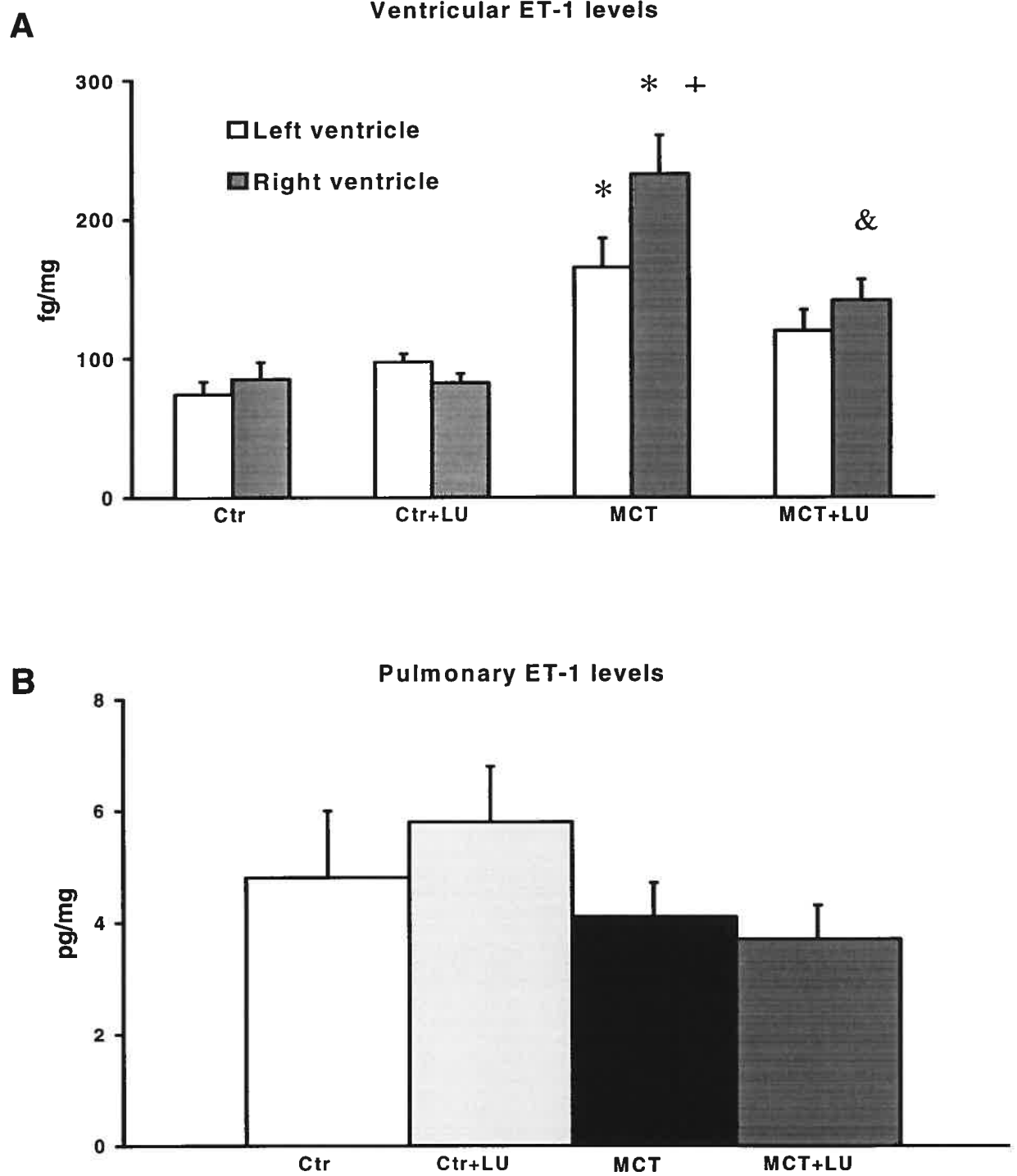


Figure 3



### **3.3-ARTICLE # 3**

#### **Effectiveness of a Non-Selective ET<sub>A/B</sub> and a Selective ET<sub>A</sub> Antagonists in Rats With Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension**

Jean-François Jasmin, Martin Lucas, Peter Cernacek, MD; Jocelyn Dupuis,  
MD, PhD

**Circulation. 2001; 103: 314-318**

## ABSTRACT

**Background:** Both non-selective ET<sub>A/B</sub> receptor and selective ET<sub>A</sub> receptor antagonists can reduce pulmonary hypertension (PH) and right ventricular hypertrophy (RVH) in various animal models. Depending on their net effects after blockade of endothelial and smooth muscle ET<sub>B</sub> receptors, non-selective ET<sub>A/B</sub> antagonists could be more or less effective than selective ET<sub>A</sub> antagonists.

**Methods and Results:** Two weeks after injection of saline or 60 mg/kg monocrotaline (MCT), rats received 50 mg/kg/day of a selective (LU135252) or non-selective (BSF420627) antagonist for 3 weeks. This resulted in four groups; control (n=15), MCT (n=60), MCT+ET<sub>A</sub> (n=39) and MCT+ET<sub>A/B</sub> (n=40). Five weeks survival was 35% in the MCT group; this was increased to 56% in MCT+ET<sub>A</sub> group ( $P=0.10$ ) and to 67% in the MCT+ET<sub>A/B</sub> group ( $P=0.0015$ ). Drug administration was stopped 48 hours before hemodynamic measurements to evaluate chronic effects of therapy: PH in the MCT group (RV systolic pressure:  $87\pm 1$  mm Hg) was similarly improved in both MCT+ET<sub>A</sub> and MCT+ET<sub>A/B</sub> groups [ $72\pm 3$  mm Hg and  $70\pm 3$  mm Hg, respectively ( $P<0.05$ )]. Severe RVH in the MCT group (RV/Left Ventricle+Septum weight ratio:  $73\pm 1\%$ ) was not affected by the selective antagonist ( $70\pm 2\%$ ) but reduced to  $54\pm 2\%$  in the MCT+ET<sub>A/B</sub> group ( $P<0.01$ ). Pulmonary resistive properties, assessed from isolated lungs pressure-flow relationships, were similarly improved in survivors from both treated groups.

**Conclusions:** Both the non-selective ET<sub>AB</sub> antagonist BSF420627 and the selective ET<sub>A</sub> antagonist LU135252 are effective in this model of PH. Similar direct comparative studies in other models of pulmonary hypertension and with various dosage regimens are warranted to define the optimal pharmacological approach of PH when using ET receptor antagonists.

**Key Words:** receptors, pulmonary hypertension, pulmonary heart disease, endothelium-derived factors

**CONDENSED ABSTRACT**

The selective ET<sub>A</sub> antagonist (LU135252) and a non-selective ET<sub>A/B</sub> antagonist (BSF420627) were evaluated in the treatment of monocrotaline (MCT) pulmonary hypertension (PH). Survival was increased from 35 to 56% in the MCT+ET<sub>A</sub> group ( $P=0.10$ ) and to 67% in the MCT+ET<sub>A/B</sub> group ( $P=0.0015$ ). In survivors, the 2 antagonists provided similar improvement of PH and isolated lungs pressure-flow curves, but only the non-selective ET<sub>A/B</sub> antagonist reduced right ventricular hypertrophy ( $P<0.01$ ). We conclude that both drugs were effective in this model of PH. Further studies are needed to compare the effectiveness of selective versus non-selective antagonists.

## INTRODUCTION

The endothelin (ET) system is activated in human pulmonary hypertension of various etiologies.<sup>1-4</sup> ET-1 could contribute to the development of human pulmonary hypertension through its strong vasoconstrictive and pro-mitogenic properties. The effectiveness of ET receptor antagonists has been convincingly demonstrated in various animal models of pulmonary hypertension.<sup>5-7</sup> The interpretation of these studies is however complicated by the pharmacology of the ET system consisting of 2 receptor subtypes demonstrating opposite actions.

The ET<sub>A</sub> receptors are located on smooth muscle cells where they mediate vasoconstrictive<sup>8</sup> and proliferative effects.<sup>9</sup> The ET<sub>B</sub> receptor is the only sub-type found predominate on the vascular endothelium where it promotes vasodilation through the release of nitric oxide and prostacyclin.<sup>10</sup> There is also evidence that the ET<sub>B</sub> receptor indirectly modulates ET-1 synthesis through negative feedback under the action of nitric oxide.<sup>11</sup> The endothelial ET<sub>B</sub> receptor is also responsible for the clearance of circulating ET-1.<sup>12</sup> In man, the pulmonary circulation clears 50% of circulating ET in a single pulmonary transit time.<sup>13</sup> Acute selective ET<sub>B</sub> receptor blockade causes adverse hemodynamic effects in animals with pulmonary hypertension<sup>14,15</sup> suggesting that this receptor attenuates the severity of pulmonary hypertension. The ET system is further complicated by the presence of smooth muscle ET<sub>B</sub> receptors which, like the ET<sub>A</sub> receptors, cause vasoconstriction upon stimulation.<sup>16</sup> The ET<sub>B</sub> receptor is therefore

present on both the endothelium and on the smooth muscle where it mediates opposite effects.

The endothelin receptor antagonists demonstrate various affinities and selectivities for the ET<sub>A</sub> and the ET<sub>B</sub> receptors.<sup>17</sup> Both selective ET<sub>A</sub> and non-selective ET<sub>AB</sub> receptor antagonists have been shown effective in the therapy of pulmonary hypertension in animal models. However, no direct comparison of a selective versus a non-selective antagonist has been accomplished. The net effect of non-selective ET<sub>AB</sub> antagonists could be to provide greater benefits by blocking all of the ET-1 induced vasoconstriction, or less benefit by removing the potentially protective role of the endothelial ET<sub>B</sub> receptor. Since ET antagonists are presently under clinical development for conditions associated with pulmonary hypertension, it becomes important to resolve this issue. This study was designed to directly compare the effectiveness of a selective ET<sub>A</sub> (LU135252) versus a non-selective ET<sub>AB</sub> (BSF420627) receptor antagonist in treatment of rats with established pulmonary hypertension. To facilitate comparison, we used the monocrotaline model of pulmonary hypertension since it causes severe pulmonary hypertension with high reproducibility.

## **METHODS**

Male Sprague-Dawley rats (Charles-River, St-Constant, Quebec, Canada) weighing between 150 to 200 g received an intraperitoneal (i.p.) injection of either 0.5 mL 0.9% saline or 0.5 mL 60 mg/kg MCT. Two weeks later, they were randomly assigned to receive oral therapy with either the selective ET<sub>A</sub>



antagonist LU135252 (50 mg/kg/day) or the non-selective ET<sub>A/B</sub> antagonist BSF420627 (50 mg/kg/day) for a 3-week period. The antagonists were mixed with rat chow. This resulted in the following 4 groups: Control (n=15), MCT (n=60), MCT+ET<sub>A</sub> (n=39) and MCT+ET<sub>A/B</sub> (n=40).

### **Experimental Protocol**

Forty-eight hours after stopping active treatment, surviving rats were anesthetized with xylazine (10 mg/kg)-ketamine (50 mg/kg) followed by 2000 units of heparin (Sigma Chemicals, St-Louis, Missouri). Study drugs were stopped 48 hours before hemodynamic measurements in order to obtain an evaluation of the chronic effect of therapy with no active medications in plasma. After stable anesthesia was obtained, the right jugular vein and the right carotid artery were isolated and incised, polyethylene catheters (PE 50; 0.97 mm OD, 0.58 mm ID) were advanced in the right and left ventricles for hemodynamic measurements. The right and left ventricular pressures were measured and recorded by a polygraph (Gould TA 4000, Valley View, Ohio). Venous blood samples were collected for circulating ET levels determination as previously described in detail.<sup>13</sup>

The trachea was then cannulated with tubing connected to a rodent ventilator (Harvard Apparatus, South Natick, Massachusetts) and ventilated with room air at a tidal volume of 1 mL and a 2 cm H<sub>2</sub>O positive end-expiratory pressure. Following a midline sternotomy, the heart and lungs were exposed. The pulmonary artery was cannulated through an incision in the upper portion of the right ventricle. The lungs were initially perfused with

Krebs solution supplemented with 100 U/mL heparin at 2.0 mL/min. The Krebs solution had the following composition (mmol/L) : NaCl 120, NaHCO<sub>3</sub> 25, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> 1.18, MgSO<sub>4</sub> 1.17, CaCl<sub>2</sub> 2.5 and glucose 5.5. This solution was bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> and pH adjusted to 7.4. The lungs were rapidly removed and suspended in a water-jacketed chamber maintained at 37°C. Lung perfusions were performed with Krebs solution supplemented with 3% albumin. Following a 10-minute equilibration period, the relationship between perfusion pressure and flow rate was assessed by increasing the flow rate in the range 5 to 25 mL/min and recording the corresponding perfusion pressure (P-Q curves). After completing the in vitro experiments, the heart was dissected and weighted to determinate right ventricular hypertrophy [right ventricle/(left ventricle+septum) weight]. To evaluate the presence of pulmonary oedema, the right lower lobe was gravity drained and weighted to determine its wet weight, and then set aside for later determination of dry weight.

### **Drugs**

The MCT was purchased from Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO). The MCT was dissolved in 1.0 N HCL and the pH was adjusted to 7.4 with 1.0 N NaOH. The endothelin receptor antagonists LU135252 and BSF420627 were kindly provided by Dr. M. Kirchengast (Knoll AG, BASF Pharma, Ludwigshafen, Germany). The Ki for LU135252 is 1.4 nM for the ET<sub>A</sub> receptor and 184 nM for the ET<sub>B</sub> receptor. The Ki for BSF420627 is 2.2 nM for the ET<sub>A</sub> receptor and 5.8 nM for the ET<sub>B</sub> receptor.

## Statistical Analysis

All values were expressed as mean $\pm$ SEM. Differences in Kaplan-Meier survival curves between groups were evaluated by using the Log-Rank test. Differences between all other parameters for the 4 groups were evaluated by analysis of variances followed by multiple group's comparisons using the Bonferroni correction. Pressure-flow relationships were compared using repeated measures analysis of variance. The individual P-Q relationships for each group were fitted using linear regression to determine their slope and intercept. Statistical significance was assumed at  $P<0.05$ .

## RESULTS

### Effect of ET Receptor Antagonists on Survival

There were no deaths in the control rats (Figure 1). Five weeks survival was only 35% in the MCT group with 21 rats alive out of 60. Chronic ET receptor antagonist therapy started 2 weeks after MCT injury non-significantly increased survival to 56.4% in the MCT+ET<sub>A</sub> group (n=22/39,  $P=0.10$ ) but further and significantly improved survival to 66.7% in the MCT+ET<sub>AB</sub> group (n=27/40,  $P=0.0015$ ).

### Chronic Hemodynamic and Morphologic Effects of ET Receptor Antagonists

The MCT group developed severe PH with a right ventricular systolic pressure (RVSP) of 86.5 $\pm$ 0.4 mm Hg compared to 24.7 $\pm$ 0.5 mm Hg in the

control group ( $P<0.01$ , Figure 2). Both MCT+ET<sub>A</sub> and MCT+ET<sub>AB</sub> groups demonstrated a significant and similar improvement in RVSP with  $72.1\pm 2.5$  mm Hg and  $69.7\pm 2.4$  mm Hg respectively ( $P<0.01$ ). This translated into higher right ventricular end-diastolic pressure in the MCT group ( $8.5\pm 0.1$  mm Hg) compared to the control group ( $1.9\pm 0.2$  mm Hg,  $P<0.01$ ), which was also significantly and similarly reduced to  $5.9\pm 0.3$  mm Hg in the MCT+ET<sub>A</sub> group and to  $5.5\pm 0.5$  mm Hg in the MCT+ET<sub>AB</sub> group ( $P<0.01$ , Table 1). Central venous pressure and indices of right ventricular contractility (dP/dt) behaved similarly with an increase in the MCT group which was similarly reduced in both groups receiving the ET antagonists (Table 1).

The MCT group developed severe right ventricular hypertrophy manifested by a RV/(LV+Septum) ratio of  $73\pm 1\%$  compared to  $24\pm 1\%$  in the control group ( $P<0.01$ , Figure 3). This marked right ventricular hypertrophy was not modified by the selective ET<sub>A</sub> antagonist ( $70\pm 2\%$ ) but was significantly reduced to  $54\pm 2\%$  in the MCT+ET<sub>AB</sub> group ( $P<0.01$  versus MCT and MCT+ET<sub>A</sub> groups).

Systemic hemodynamic parameters are also presented in Table 1. Heart rate did not differ between the 4 groups. Mean arterial pressure (MAP) was lowered to  $66\pm 4$  mm Hg in the MCT group compared to  $120\pm 4$  mm Hg in the control group ( $P<0.01$ ). The MAP non-significantly increased to  $77\pm 6$  mm Hg in the MCT+ET<sub>A</sub> group but was significantly higher at  $88\pm 7$  mm Hg in the MCT+ET<sub>AB</sub> group ( $P<0.05$  versus MCT). Indices of left ventricular contractility and relaxation were significantly depressed only in the MCT

group. There was no evidence of pulmonary oedema as assessed by the dry/wet lung weight ratio in any of the groups.

Immunoreactive ET-1 levels measured in a subset of the animals were non-significantly elevated in the MCT group as well as in both ET antagonists groups (Table 1).

### **Effects of ET Receptor Antagonists on Vascular Resistive Properties of Isolated Lungs**

A common source of difficulty in the evaluation of pulmonary vascular resistance using single time points resides in the passive variation induced by modifications in pulmonary blood flow and pressure. Analysis of numerous points with construction of the P-Q relationships provides greater insight into pulmonary vascular resistive properties. The P-Q relationship of isolated lungs from the MCT group was shifted upward with an increase in both the slope ( $2.34 \pm 0.13$  mm Hg/mL/s versus  $0.44 \pm 0.13$  mm Hg/mL/s in controls,  $P < 0.01$ ) and the intercept ( $6.28 \pm 0.62$  mm Hg versus  $-0.10 \pm 0.60$  mm Hg,  $P < 0.01$ ). In the animals treated with the ET antagonists, there was a similar improvement in the P-Q relationship with lowering of the slope to  $1.69 \pm 0.13$  mm Hg/mL/s in the ET<sub>A</sub>-group and  $1.59 \pm 0.13$  mm Hg/mL/s in the ET<sub>AB</sub> group ( $P < 0.05$  versus MCT). In these 2 groups, the intercept was similar to that in the MCT group.

## DISCUSSION

We evaluated the efficacy of a selective ET<sub>A</sub> (LU135252) and non-selective ET<sub>A/B</sub> (BSF420627) antagonist in the treatment of MCT-induced PH in rats. Our results demonstrate for the first time the efficacy of both treatment strategies in a side by side comparison.

Although both selective ET<sub>A</sub> and non-selective ET<sub>A/B</sub> receptor antagonists have been successfully used in the treatment of pulmonary hypertension in various animal models, no direct comparison of the 2 strategies had been performed. Because of its dichotomous role, blockade of the ET<sub>B</sub> receptor could theoretically provide more or less benefit in addition to ET<sub>A</sub> receptor blockade. Studies supporting a protective role demonstrate that acute selective ET<sub>B</sub> blockade increases pulmonary pressures in dogs with dehydromonocrotaline-induced PH<sup>14</sup> and with tachycardia-induced heart failure.<sup>15</sup> Another concern with chronic ET<sub>B</sub> antagonist therapy is the inhibition of ET-1 clearance, which is mediated by the endothelial ET<sub>B</sub> receptor,<sup>12</sup> since the ultimate physiological significance and impact of this function is presently unknown. There is also evidence that the ET<sub>B</sub> receptor indirectly modulates ET-1 synthesis through negative feedback under the action of nitric oxide.<sup>11</sup> We have previously shown that chronic ET<sub>A</sub> blockade with LU135252 in the MCT model not only improved pulmonary hypertension, but also improved endothelium-dependent pulmonary vasodilation to acetylcholine.<sup>18</sup> This additionally suggests potentially important interactions between the ET-1 and the nitric oxide system to which the endothelial ET<sub>B</sub> receptor may contribute.

On the other hand, other studies have shown that blockade of both  $ET_A$  and  $ET_B$  receptors are necessary to achieve optimal inhibition of ET-1 induced vasoconstriction in both systemic<sup>19,20</sup> and pulmonary<sup>16,21</sup> vascular beds. Since these studies used acute administration of the ET antagonists, they fail to provide accurate insight into the role of the  $ET_B$  receptor in the development of pulmonary hypertension which is usually a slow and chronic process. From previous studies using chronic administration of either selective or non-selective ET antagonists, it is evident that both strategies are effective in various models of PH. In the MCT model, the selective  $ET_A$  antagonists LU135252 and BQ123<sup>5,22</sup> as well as the non-selective  $ET_{A/B}$  antagonist Bosentan<sup>23</sup> have shown their efficacy. The net effect after  $ET_B$  receptor blockade therefore seems favourable, but the points raised above suggest that combined blockade could provide more or less benefits than selective  $ET_A$  blockade. The present study was designed to try to resolve this issue.

In certain aspects, our results demonstrate differences in the effect of a non-selective  $ET_{A/B}$  versus a selective  $ET_A$  antagonist in the treatment of MCT-induced PH. The non-selective antagonist doubled survival compared to the untreated animals and increased it by 10% compared to the animals receiving the selective antagonist. There was also a reduction of right ventricular hypertrophy only in the animals receiving the non-selective antagonist. These 2 findings were however not accompanied by a greater reduction of right ventricular systolic pressure measured in vivo in the surviving animals. Additionally, the pressure-flow curves, which are a very

accurate way of evaluating the resistive properties of the lungs, were similarly improved in both treated groups. We cannot therefore conclude that one agent is clearly superior to the other.

The MCT model of PH is associated with initial severe damage to the pulmonary vascular endothelium. Thus, it could be argued that blockade of the remaining and possibly non-functional endothelial ET<sub>B</sub> would have very little pharmacological effect. This is however not supported by studies in dogs with dehydromonocrotaline PH since endogenous ET attenuates the increase in pulmonary pressure through the ET<sub>B</sub> receptor.<sup>14</sup> Recent data from our laboratory also support functionality of the endothelial ET<sub>B</sub> after monocrotaline injury since pulmonary ET-1 clearance is only slightly reduced but maintained.<sup>24</sup> We have also recently demonstrated preservation of endothelium-dependant pulmonary vasodilation to acetylcholine 3 weeks after MCT injury in rats.<sup>18</sup> These therefore suggest at least partial preservation of some endothelial functions after MCT injury, including that of the ET<sub>B</sub> receptor.

Many studies suggest an important role of the ET<sub>B</sub> in ET-1 induced pulmonary vasoconstriction. Combination of the selective ET<sub>A</sub> antagonist BQ123 and the selective ET<sub>B</sub> antagonist BQ788 inhibits ET-1 induced pulmonary vasoconstriction more effectively than BQ123 alone.<sup>21</sup> The selective ET<sub>B</sub> agonist IRL-1620 caused pulmonary vasoconstriction and edema, both of which were completely inhibited by BQ788.<sup>21</sup> ET-1 is a potent thromboxane-dependent pulmonary constrictor in the guinea pig lung<sup>25</sup> with



an important role of the ET<sub>B</sub> in thromboxane A<sub>2</sub> release in the normal guinea pigs<sup>26</sup> and in endotoxin treated rats.<sup>27</sup>

### **Limitations of this Study**

The MCT model of pulmonary hypertension has no human equivalent. Activation of the ET system is however present in all forms of human pulmonary hypertension and in all animal models, including the MCT model. We choose the MCT model because of the severe and reproducible PH obtained that more easily allows comparison of 2 treatment regimens.

The ET<sub>A</sub> selective antagonist LU135252 (K<sub>i</sub> ET<sub>A</sub> 1.4 nM, K<sub>i</sub> ET<sub>B</sub> 184 nM) has a bioavailability of 86% with a plasma half-life of 10 hours (Knoll Investigator's Brochure). The non-selective ET<sub>A/B</sub> antagonist BSF420627 (K<sub>i</sub> ET<sub>A</sub> 2.2 nM, K<sub>i</sub> ET<sub>B</sub> 5.8 nM) has a 60% bioavailability with a 2-hour half-life (knoll Investigator's Brochure). The lower bioavailability and half life of BSF420627 may have resulted in lower plasma concentrations of the non-selective antagonist. Our results therefore cannot be generalized to other endothelin antagonists as well as to other models of PH.

### **CONCLUSIONS**

Chronic administration of the non-selective ET<sub>A/B</sub> antagonist BSF420627 or the selective antagonist LU135252 is effective in the treatment of MCT-induced PH. Similar direct comparative studies in other models of pulmonary hypertension and with various dosage regimens are warranted to define the

optimal pharmacological approach of PH when using ET receptor antagonists.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Medical Research Council of Canada, the Heart and Stroke Foundation of Canada and the Fonds de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Dr. Jocelyn Dupuis is a scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. The authors would like to thank Nathalie Ruel for her expert technical assistance.

**REFERENCES**

1. Cody RJ, Haas GJ, Binkley PF, Capers Q, Kelley R. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation*. 1992;85:504-509.
2. Giaid A, Michel RP, Stewart DJ, Sheppard M, Corrin B, Hamid Q. Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet*. 1993;341:1550-1554.
3. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1993;328:1732-1739.
4. Yoshibayashi M, Nishioka K, Nakao K, Saito Y, Matsumura M, Ueda T, Temma S, Shirakami G, Imura H, Mikawa H. Plasma endothelin concentrations in patients with pulmonary hypertension associated with congenital heart defects. Evidence for increased production of endothelin in pulmonary circulation. *Circulation*. 1991;84:2280-2285.
5. Prie S, Leung TK, Cernacek P, Ryan JW, Dupuis J. The orally active ET(A) receptor antagonist (+)-(S)-2-(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-yloxy)-3-methoxy-3,3-diphenyl-propionic acid (LU 135252) prevents the development of pulmonary hypertension and endothelial metabolic dysfunction in monocrotaline-treated rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;282:1312-1318.

6. DiCarlo VS, Chen SJ, Meng QC, Durand J, Yano M, Chen YF, Oparil S. ETA receptor antagonist prevents and reverses chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rat. *Am J Physiol.* 1995;269:L690-L697.
7. Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, Yamaguchi I, Kobayashi M, Goto K, Sugishita Y. Pulmonary hypertension caused by congestive heart failure is ameliorated by long-term application of an endothelin receptor antagonist. Increased expression of endothelin-1 messenger ribonucleic acid and endothelin-1-like immunoreactivity in the lung in congestive heart failure in rats. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28:1580-1588.
8. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature.* 1990;348:730-732.
9. Zamora MA, Dempsey EC, Walchak SJ, Stelzner TJ. BQ123, an ETA receptor antagonist, inhibits endothelin-1-mediated proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Resp Cell Mol Biol.* 1993;9:429-433.
10. de Nucci G, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:9797-9800.
11. Gratton JP, Cournoyer G, Loffler BM, Sirois P, D'Orleans-Juste P. ET(B) receptor and nitric oxide synthase blockade induce BQ-123-

- sensitive pressor effects in the rabbit. *Hypertension*. 1997;30:1204-1209.
12. Dupuis J, Goresky CA, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol*. 1996;81:1510-1515.
  13. Dupuis J, Stewart DJ, Cernacek P, Gosselin G. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation*. 1996;94:1578-1584.
  14. Okada M, Yamashita C, Okada K. Role of endothelin-1 in beagles with dehydromonocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 1995;92:114-119.
  15. Wada A, Tsutamoto T, Fukai D, Ohnishi M, Maeda K, Hisanaga T, Maeda Y, Matsuda Y, Kinoshita M. Comparison of the effects of selective endothelin ETA and ETB receptor antagonists in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:1385-1392.
  16. McCulloch KM, MacLean MR. Endothelin B receptor-mediated contraction of human and rat pulmonary resistance arteries and the effect of pulmonary hypertension on endothelin responses in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;26(suppl 3):S169-S76.
  17. Battistini B, Dussault P. Blocking of the endothelin system: the development of receptor antagonists. *Pulm Pharmacol Ther*. 1998;11:97-112.

18. Prie S, Stewart DJ, Dupuis J. Endothelin A receptor blockade improves nitric oxide-mediated vasodilation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 1998;97:2169-2174.
19. Haynes WG, Strachan FE, Gray GA, Webb DJ. Forearm vasoconstriction to endothelin-1 is mediated by ETA and ETB receptors in vivo in humans. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;26(suppl 3):S40-S43.
20. Haynes WG, Strachan FE, Webb DJ. Endothelin ETA and ETB receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation*. 1995;92:357-363.
21. Sato K, Oka M, Hasunuma K, Ohnishi M, Kira S. Effects of separate and combined ETA and ETB blockade on ET-1-induced constriction in perfused rat lungs. *Am J Physiol*. 1995;269:L668-L672.
22. Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, Yano M, Yamaguchi I, Sugishita Y, Goto K. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res*. 1993;73:887-897.
23. Hill NS, Warburton RR, Pietras L, Klinger JR. Nonspecific endothelin receptor antagonist blunts monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol*. 1997;83:1209-1215.
24. Dupuis J, Jasmin JF, Prie S, Cernacek P. Importance of local production of endothelin-1 and of the ET<sub>B</sub> receptor in the regulation of pulmonary vascular tone. *Pulm Pharmacol Ther* 2000 (in press).

25. Horgan MJ, Pinheiro JM, Malik AB. Mechanism of endothelin-1-induced pulmonary vasoconstriction. *Circ Res.* 1991;69:157-164.
26. Lewis K, Cadieux A, Rae GA, D'Orleans-Juste P. L-NAME potentiates endothelin-stimulated thromboxane release from guinea pig lung. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31(suppl 1):S109-S111.
27. Curzen NP, Griffiths MJ, Evans TW. Contraction to endothelin-1 in pulmonary arteries from endotoxin-treated rats is modulated by endothelium. *Am J Physiol.* 1995;268:H2260-H2266.



**TABLE 1. Hemodynamic and Morphologic Parameters**

Parameters	Control (n=15)	MCT (n=20)	MCT+ET <sub>A</sub> (n=22)	MCT+ET <sub>AB</sub> (n=27)
CVP (mm Hg)	1.5±0.9	7.8±0.4 <sup>†</sup>	5.5±0.5 <sup>†</sup>	5.2±0.4 <sup>†</sup>
RVEDP (mm Hg)	1.9±0.2	8.5±0.5 <sup>†</sup>	5.9±0.3 <sup>†</sup>	5.5±0.4 <sup>†</sup>
RV(+)-dP/dt (mm Hg/s)	1460±29	3688±112 <sup>†</sup>	2938±99 <sup>†</sup>	2815±108 <sup>†</sup>
RV(-)-dP/dt (mm Hg/s)	906±25	2732±72 <sup>†</sup>	2305±78 <sup>†</sup>	2190±86 <sup>†</sup>
Heart Rate (beats/min)	262.9±4.6	275.7±3.4	266.2±4.3	273.0±7.6
MAP (mm Hg)	120±4	66±4 <sup>†</sup>	77±7 <sup>†</sup>	88±7 <sup>†*</sup>
LVEDP (mm Hg)	10±2	8±1	7±1	6±1
LV(+)-dP/dt (mm Hg/s)	7415±337	5656±253 <sup>‡</sup>	6211±549	6156±435
LV(-)-dP/dt (mm Hg/s)	4801±322	3375±212 <sup>‡</sup>	3438±374	4594±475
5 weeks BW (g)	447±9	319±10 <sup>†</sup>	323±9 <sup>†</sup>	330±13 <sup>†</sup>

**TABLE 1. Hemodynamic and Morphologic Parameters (cont'd)**

Parameters	Control (n=15)	MCT (n=20)	MCT+ET <sub>A</sub> (n=22)	MCT+ET <sub>AB</sub> (n=27)
LUNG (dry/wet weight)	0.201±0.002	0.203±0.003	0.202±0.002	0.211±0.006
ET-1 (pg/mL)	1.6±0.3 (n=7)	3.4±1.2 (n=9)	4.1±0.7 (n=9)	3.1±0.6 (n=9)

CVP indicates central venous pressure; RVEDP, right ventricular end-diastolic pressure; MAP, mean arterial pressure; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; BW, body weight; Pulm Art, pulmonary artery.

‡ $P < 0.05$  vs Control, † $P < 0.01$  vs Control, \* $P < 0.05$  vs MCT, † $P < 0.01$  vs MCT.

For ET-1, the number of samples analysed is indicated for each group.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1** Kaplan Meier Survival curves of controls and monocrotaline (MCT) pulmonary hypertensives treated with a selective ET<sub>A</sub> (LU135252) or non-selective ET<sub>AB</sub> (BSF420627) antagonist.

**Figure 2** Effects of selective ET<sub>A</sub> and non-selective ET<sub>AB</sub> antagonists on the Right Ventricular Systolic Pressure (RVSP) of monocrotaline (MCT)-induced pulmonary hypertensive rats. †*P*<0.01 versus Control, \*\**P*<0.01 versus MCT.

**Figure 3** Effects of selective ET<sub>A</sub> and non-selective ET<sub>AB</sub> antagonists on the Right Ventricular Hypertrophy (RVH) of monocrotaline (MCT)-induced pulmonary hypertensive rats. †*P*<0.01 versus Control, \*\**P*<0.01 versus MCT, §*P*<0.01 versus MCT+ET<sub>A</sub>.

**Figure 4** Relationship between the perfusion pressure and the flow rate in isolated lungs of controls rats and monocrotaline (MCT) pulmonary hypertensive rats treated with a selective ET<sub>A</sub> (LU135252) or non-selective ET<sub>AB</sub> (BSF420627) antagonist. †*P*<0.01 versus Control, \**P*<0.05 versus MCT.

Figure 1

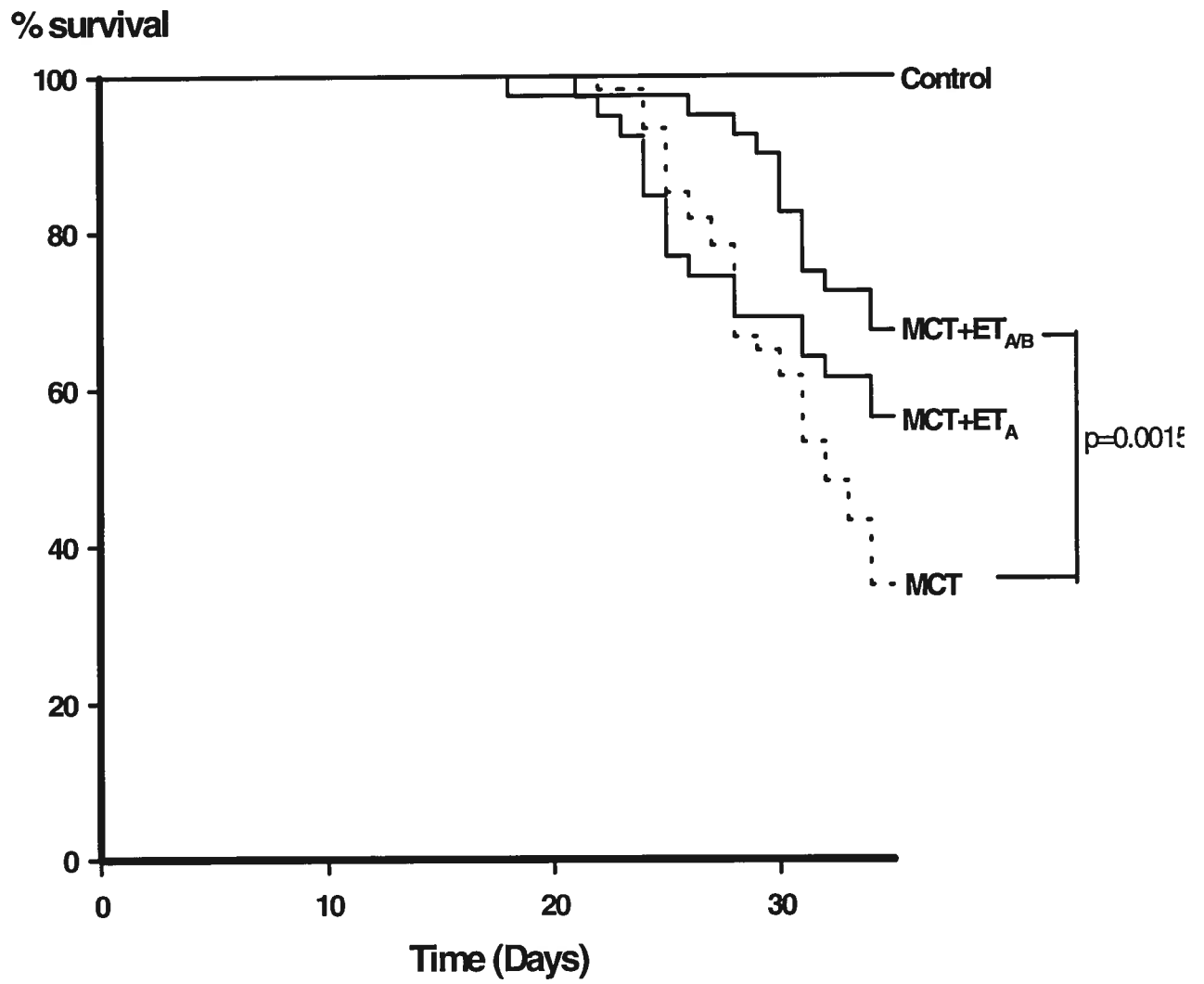


Figure 2

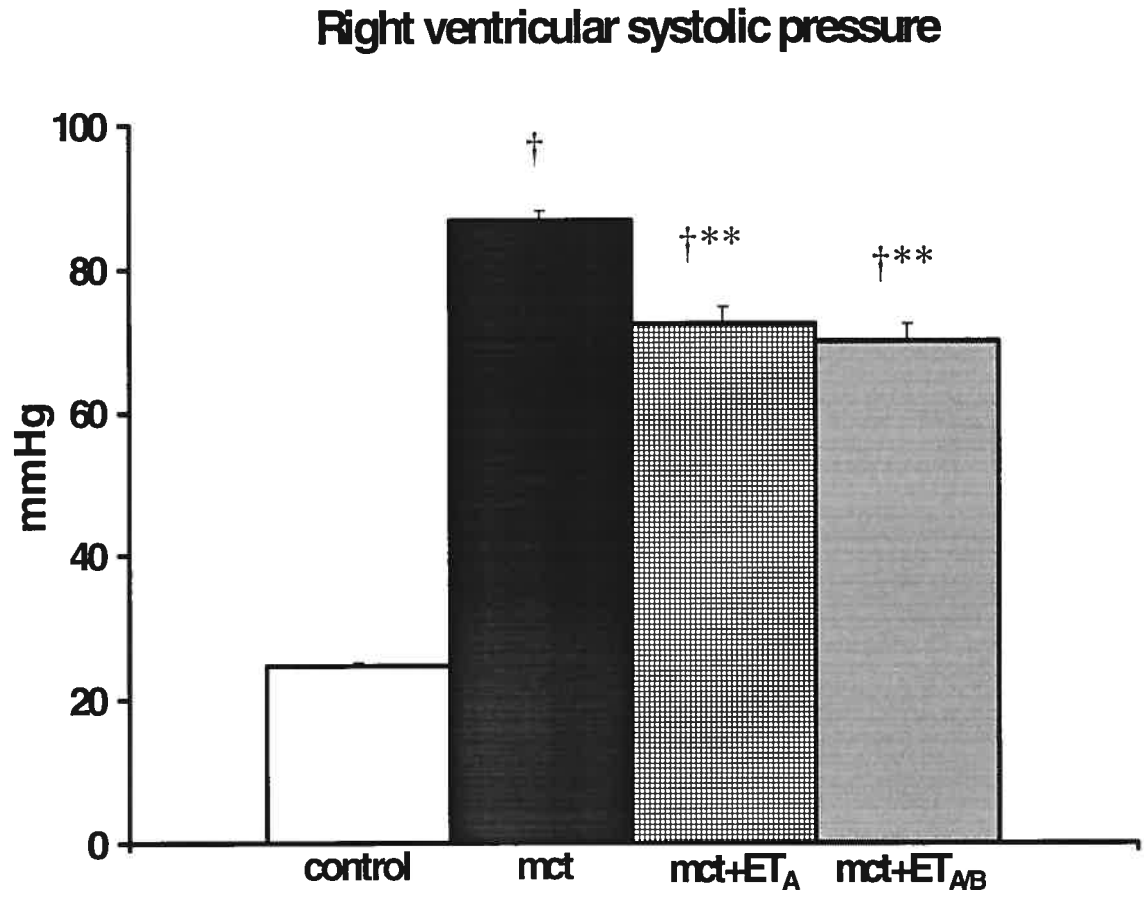


Figure 3

RV/(LV+Septum)  
weight

## Right ventricular hypertrophy

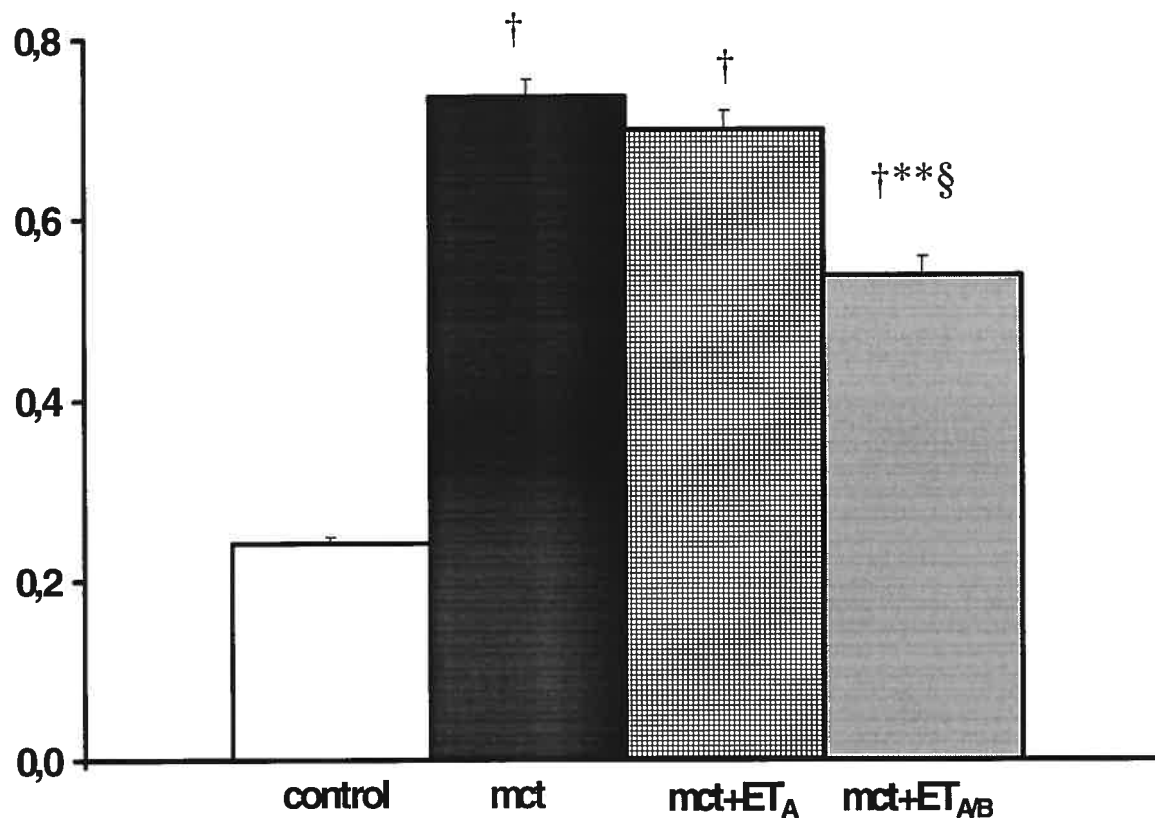
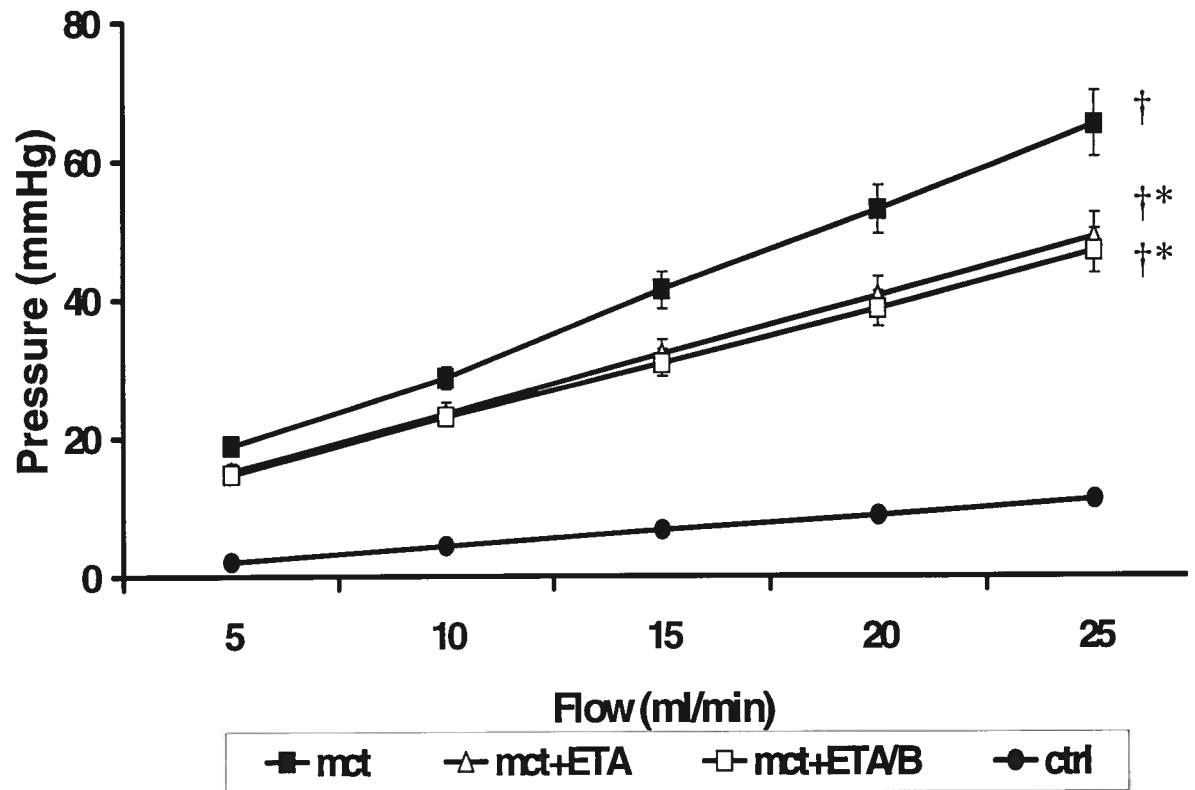


Figure 4

## Pressure-Flow curves



### **3.4-ARTICLE # 4**

#### **Evaluation of luminal endothelin-converting enzyme activity in the pulmonary and coronary circulations**

Jean-François Jasmin<sup>a,b</sup>, Jocelyn Dupuis<sup>a,b,c\*</sup>

<sup>a</sup>Research Center, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada

<sup>b</sup>University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>c</sup>Department of Medicine, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada

**J Cardiovasc Pharmacol. 2004; 43(1): 23-25**



## ABSTRACT

**Objectives:** The endothelin-converting enzymes are distributed on both the surface of the endothelium and intracellularly. Whether circulating big-endothelin-1 can be hydrolyzed in plasma by lumen-bound endothelin-converting enzymes is unknown. The lung is the major site for hydrolysis of angiotensin-I to angiotensin-II by the angiotensin-converting enzyme: because of its high content in endothelin-converting enzymes, we hypothesized that the lung could similarly hydrolyze circulating big-endothelin-1. Since big-endothelin-1 produced by the lung can modulate coronary vascular tone, the heart may also have the capacity to hydrolyze circulating big-endothelin-1.

**Methods:** Isolated lungs and hearts from Sprague-Dawley rats were perfused at 10 ml/min. Clearance of trace doses of human  $I^{125}$ big-endothelin-1 was quantified using the indicator-dilution curves technique with labeled albumin as a vascular reference. Single-pass hydrolysis was assessed by bolus injection of human big-endothelin-1 (24 fmol) followed by serial ELISA determinations of big-endothelin-1 and endothelin-1 levels in effluent samples. To exclude possible uptake of produced endothelin-1,  $10^{-6}$  M BQ788 was added to the perfusate.

**Results:** The injections had no effect on perfusion pressures. There was no detectable clearance of  $I^{125}$ big-endothelin-1 in the lung, however the heart extracted  $14 \pm 1\%$  of the injected tracer. There was no detectable big-endothelin-1 hydrolysis in the pulmonary as well as in the coronary circulations.

**Conclusions:** The pulmonary circulation does not clear or hydrolyze circulating big-endothelin-1 suggesting that endothelin-converting enzymes are predominantly used for intracellular conversion of locally produced big-endothelin-1. Mild coronary uptake of big-endothelin-1 suggests that this circulating peptide could modulate coronary vascular tone.

**Keywords:** Experimental, vasculature, organ, pharmacology, Endothelial function, endothelins, pulmonary circulation, pharmacokinetics, microcirculation

## INTRODUCTION

Endothelins (ET) are potent vasoconstrictors. These 21 amino acid peptides, which also display pro-mitogenicity for various cells types, were first identified by Yanagisawa in 1988 from bovine aortic endothelial cells [1]. The ETs exist in three distinct isoforms named ET-1, 2 and 3. ET-1 is considered the most important in the cardiovascular system and is activated in several cardiovascular diseases as evidenced by increased circulating levels in congestive heart failure, myocardial infarction, atherosclerosis, essential hypertension and pulmonary hypertension [2-10].

The precursor of ET-1, prepro-ET-1, is a 212 amino acid peptide cleaved by endopeptidases and carboxypeptidases to pro-ET-1, more commonly called big-ET-1 (38 amino acid) [11]. Big-ET-1 is subsequently cleaved by the ET-converting enzymes (ECEs) into the active peptide known as ET-1. There are several types of ECEs distinguished by their localization and their optimal pH for activity. ECE-1 was first purified from pulmonary microsomes of rats [12]. ECE-1 is a type II integral membrane protease which preferentially cleaves big-ET-1. The gene for ECE-1 encodes four different isoforms formed by four alternative promoters [13,14]. ECE-1a, ECE-1c and ECE-1d are predominantly located at the surface of the endothelial cells whereas ECE-1b is mainly located into intracellular compartments, probably in close association with the Golgi apparatus. An ECE-2 has also been purified; it also preferentially cleaves big-ET-1 and is located in intracellular compartments with an optimal pH activity of 5.5 [15].

More recently, an ECE-3, which preferentially hydrolyze big-ET-3, has been purified from bovine iris microsomes [16].

Because of its important vascular surface area receiving the whole cardiac output, the lung plays an important role in the modulation of circulating levels of numerous vasoactive peptides. For example, Angiotensin-1 is converted into Angiotensin-II by the angiotensin-converting enzyme present at the luminal surface of the pulmonary vascular endothelium. This process is very fast and can be detected within a single pulmonary transit time in vivo [17,18]. Whether luminal big-ET-1 hydrolysis could occur within a single pulmonary transit time and could modulate circulating ET-1 levels is however currently unknown. Big-ET-1 levels are increased in cardiovascular pathology. Interestingly, in heart failure they may even better predict prognosis than ET-1 levels [19,20]. The lung has a high ECEs content located both intracellularly and at the luminal surface of the endothelium [21]. In vitro as well as in vivo studies have shown that human big-ET-1 can be hydrolyzed by pulmonary ECEs of several species [22-24]. Thus, big-ET-1 hydrolysis could occur either at the luminal surface of the pulmonary endothelial cells or intracellularly.

The capacity to hydrolyze circulating big-ET-1 may not be limited to the lung. Investigators have also shown that pulmonary big-ET-1 present in the effluent of isolated rabbit lung induced a decrease in coronary blood flow as well as an increase in coronary ET-1 production in isolated rabbit hearts. This would suggest that the coronary circulation could also cleave circulating big-ET-1 and modulate circulating ET-1 levels [25].

Therefore, the aim of this study was to quantify the clearance and the hydrolysis of circulating big-ET-1 during a single transit time in both pulmonary and coronary circulations.

## **MATERIAL AND METHODS**

Male sprague-dawley rats (Charles River) weighing between 450-550 g were anesthetized with xylazine (10 mg/kg) and ketamine (50 mg/kg) followed by 2000 U of heparin (Sigma Chemical Co.). After stable anesthesia, either the lung or the heart was isolated. The study protocol was approved by the animal ethics and research committee of the Montreal Heart Institute and conducted according to guidelines from the Canadian council for the care of laboratory animals.

### **Isolated lung preparation**

The trachea was cannulated and connected to a rodent ventilator (Harvard Apparatus). Lungs were ventilated with room air at a tidal volume of 1 ml and a positive end-expiratory pressure of 2 cm H<sub>2</sub>O. After a midline sternotomy, the pulmonary artery was isolated, incised and cannulated. The lungs were initially perfused with Krebs solution (NaCl 120 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, KCl 4.7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> 1.18 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.17 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, glucose 5.5 mM, 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and pH 7.4) supplemented with 100 U/ml heparin at 2.0 ml/min. Then the lungs were rapidly removed and suspended in a water-jacketed chamber maintained at 37°C. Lungs were perfused with Krebs solution supplemented with 3% albumin at a constant flow of 10 ml/min.

### **Isolated heart preparation**

After tracheal intubation and ventilation, a midline sternotomy was made and the heart exposed. The aorta was isolated, incised and cannulated while the pulmonary artery was incised to avoid overstretching of the right ventricle by continuous blood flow. The heart was initially perfused with Krebs solution (NaCl 120 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, KCl 4.7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> 1.18 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.17 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.25 mM, glucose 5.5 mM, 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and pH 7.4) supplemented with 100 U/ml heparin at 3.0 ml/min. Then the heart was rapidly removed and suspended in a water-jacketed chamber maintained at 37°C and retrogradely perfused with Krebs solution at a constant perfusion pressure between 65 and 70 mmHg.

### **Clearance of big-ET-1 by the pulmonary and coronary circulations**

Pulmonary and coronary clearances of circulating human big-ET-1 were quantified using the single bolus dual label indicator-dilution curve technique. A bolus made of 1.0 µCi of human I<sup>125</sup>big-ET-1 (Peninsula Laboratories), 0.5 ml of bovine serum albumin (Sigma Diagnostics) labeled with evans-blue dye (EBD) as a vascular reference and 1.5 ml of 0.9% saline was prepared. One hundred µl of this mixture was injected into either the pulmonary artery of isolated lungs ( $n=8$ ) or the aorta of isolated hearts ( $n=8$ ). The effluents from the lungs or the hearts were collected with an automatic linear fraction collector (30 tubes in 28 s). Afterwards, 2 ml of 0.9% saline was added to each tube and vortexed. One ml aliquot from each tube was used to

determine  $I^{125}$  activity in a *gamma* counter while the other 1 ml aliquot was used to measure EBD absorbance with a spectrophotometer. The tracers activities in standards from the injectate mixture were also determined and indicator-dilution curve were constructed by plotting the fractional recovery of each tracer, in each sample, as a function of outflow time.

### **Hydrolysis of $I^{125}$ big-ET-1 by the pulmonary and coronary circulations**

Pulmonary and coronary hydrolysis of circulating human big-ET-1 were also determined by using indicator-dilution principles. A 100  $\mu$ l bolus made of 70  $\mu$ l  $H_2O$ , 10  $\mu$ l  $I^{125}$ albumin (Perkin Elmer Life Science) and 24 fmol human big-ET-1 in 20  $\mu$ l (American Peptide Company) was injected in either the pulmonary artery ( $n=9$ ) or the aorta ( $n=9$ ). Thirty tubes were then collected over 28 s with an automatic linear collector. Afterwards, 1 ml 0.9% saline was added to each tube. The tubes were then put in a *gamma* counter to determine the shape of the curve with the help of the  $I^{125}$ albumin as a vascular reference. Afterwards, big-ET-1 and ET-1 concentrations were measured in the corresponding samples using ELISA kits (Biomedica). Those ELISA kits had a detection range of 0.05-15.6 fmol/ml for big-ET-1 and 0.05-10 fmol/ml for ET-1. The big-ET-1 ELISA kit had a cross-reactivity of 100% with human big-ET-1, <6% with rat big-ET-1 and <1% with ET-1, 2, 3 and big-ET [22-38]. The ET-1 ELISA kit had a cross-reactivity of 100% with ET-1 and ET-2, <5% with ET-3 and <1% with big-ET (1-38) and big-ET (22-38).

Prior to and during the clearance and hydrolysis experiment, the lungs and the heart were perfused with the ET<sub>B</sub> receptor antagonist BQ788 (10<sup>-6</sup> M) at a constant flow of 1 ml/min. The BQ788 was used to avoid any possible clearance of produced ET-1 by the ET<sub>B</sub> receptor since it would mask possible hydrolysis [26]. The use of BQ788 did not alter pulmonary and coronary flows and pressures. Furthermore, to avoid any hydrolysis of big-ET-1 in the collection tubes they were pretreated with the ECE inhibitor phosphoramidon (10<sup>-4</sup> M).

### **Statistical Analysis**

All values are expressed as mean±SEM. Differences between lung and heart extraction were evaluated by paired Student's *t*-test. Statistical significance was assumed at  $p<0.05$ .

## **RESULTS**

### **Big-ET-1 clearance**

Typical examples of the outflow profiles for human I<sup>125</sup>big-ET-1 and its vascular reference, EBD-labeled albumin, in lungs and heart are shown in Fig. 1A and 1B respectively. In pulmonary circulation, we found no detectable extraction of tracer I<sup>125</sup>big-ET-1 (0.03±0.01%) as demonstrated by perfect superposition with albumin curves ( $n=8$ ). However, in coronary circulation, we found 14±1% of extraction of the circulating I<sup>125</sup>big-ET-1 ( $n=8$ ,  $p<0.001$  vs lung extraction).



### **Luminal ECE activity**

Examples of big-ET-1 and ET-1 levels from outflow samples after injection of unlabeled human big-ET-1 in the lungs and the heart are shown in Fig. 2A and 2B respectively. Big-ET-1 levels were measurable in both lungs and heart and displayed a typical indicator-dilution curve shape. In the lungs, ET-1 levels were detectable at  $1.3 \pm 0.3$  fmol/ml and remained unchanged with outflow time ( $n=9$ ). In the heart, ET-1 levels were at the lower limit of detection of the assay ( $n=9$ ). There was consequently no detectable hydrolysis of human big-ET-1 during single pulmonary and coronary transit times.

### **DISCUSSION**

The present study revealed no detectable clearance and no hydrolysis of big-ET-1 during a single pulmonary transit time. In the coronary circulation we found 14% clearance but also no detectable hydrolysis of circulating big-ET-1. Therefore, the luminal ECEs present in the pulmonary and coronary circulations do not seem to convert circulating big-ET-1 and are unlikely to modulate circulating ET-1 levels through hydrolysis of circulating big-ET-1.

Endothelin-converting enzymes are membrane-bound proteases containing a single transmembrane-spanning domain, N-glycosylation sites, zinc-binding motifs, an N-terminal cytoplasmic tail and a C-terminal extracellular portion containing the catalytic domain. ECEs are present at both the surface of the endothelium and intracellularly [21]. ECE-1a, 1c and 1d are predominantly expressed on the surface of the endothelial cells with

their catalytic domain facing the luminal side while ECE-1b and ECE-2 are mainly intracellular [13,14]. ECE-1c has been shown to be expressed at higher levels than the other ECE-1 isoforms [13].

Previous studies have shown that human big-ET-1 could be converted to ET-1 and exerts pressors effects in several species including the rat [23,24]. However, in the present study, we clearly showed no detectable hydrolysis of human big-ET-1 in rat pulmonary and coronary circulations. Nevertheless, our results are not in complete contradiction with these previous reports of pharmacological effects of human big-ET-1. In these studies, release of ET-1 and pressors effects of big-ET-1 were seen after several minutes of continuous perfusion of pharmacological doses of human big-ET-1. However, in the present study we assessed the effect of a single physiological bolus of human big-ET-1 during single pulmonary and coronary transit times. This could suggest that the effects of human big-ET-1 seen in previous studies could results from slow extraction followed by intracellular hydrolysis. Interestingly, in the present study we found a small uptake but no hydrolysis of big-ET-1 by the coronary circulation, thus suggesting that the big-ET-1 could be converted intracellularly. However, the time scale of the present experiment being limited to a single coronary transit time may not allow us to detect any production of ET-1 and the subsequently pressor effects. Slow extraction of circulating big-ET-1 is also supported by a recent study showing that clearance of human  $I^{125}$ big-ET-1 was markedly slower than clearance of  $I^{125}$ ET-1 in male wistar-kyoto rats with a half life of  $3.9 \pm 0.2$  min compared to  $7.5 \pm 0.2$  s [27]. This same study reports that big-ET-1

extraction was mainly confined to the liver and kidneys and essentially non-receptor-mediated. This is compatible with a human study demonstrating that significant fractional extraction of big-ET-1 in healthy man volunteers was present mainly in the kidneys and the liver with an in vivo half life of  $6.6 \pm 0.3$  min [28].

In vitro studies support the concept that hydrolysis of big-ET-1 occurs mostly intracellularly. Incubation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) with big-ET-1 revealed a modest increase in the concentration of ET-1 after 2 h [29]. However, permeabilization of these cells with 0.1% Triton X-100 resulted in a markedly greater increase of the conversion of exogenous big-ET-1, suggesting that intracellular hydrolysis amounts for almost 85% of total ECE activity. Furthermore, Xu et al. (1994) have shown that transfection of bovine ECE-1 in chinese hamster ovary (CHO) cells secreting only big-ET-1 resulted in a conversion of 50-90% of the endogenous big-ET-1. In contrast, co-culture of CHO cells lines secreting big-ET-1 with others expressing the bovine ECE-1 resulted in only 5-10% of hydrolysis of big-ET-1, suggesting that exogenously applied big-ET-1 was less efficiently hydrolyzed than endogenous big-ET-1 [30].

Early in vivo studies also suggested that circulating blood may not be a major site of big-ET-1 conversion. After 15 min, only about 2% of an intravenous injection of big-ET-1 (2  $\mu$ g) was converted to ET-1 in rats [31]. Studies in the human forearm have also shown that conversion of big-ET-1 by local ECEs was <10% [32,33]. Furthermore, this modest conversion was

detectable only at a dose of 50 pmol/min and not at the lower doses of 5 and 15 pmol/min. Although the authors suggested that the modest increase in ET-1 could be ascribed to immediate binding of newly synthesized ET-1 with its high affinity receptor, data from the present study demonstrates that blockade of these receptors do not result in any detectable increase of ET-1. Several studies have even shown that conversion of big-ET-1 could be independent of the vascular endothelium [34,35]. Indeed, removal of the vascular endothelium in isolated porcine coronary arteries do not affect the concentration-dependent contractions induced by human big-ET-1 [34].

## **CONCLUSIONS**

The pulmonary circulation does not clear or hydrolyze circulating big-ET-1 during a single transit time. Mild coronary uptake of big-ET-1 also without detectable hydrolysis however suggests that this circulating peptide could modulate coronary vascular tone. Pulmonary and coronary ECEs are therefore predominantly used for intracellular conversion of locally produced big-ET-1. This suggests that the luminal ECEs present in the lung and the heart are unlikely to convert circulating big-ET-1 in vivo. Slow extraction of circulating big-ET-1 followed by intracellular hydrolysis is more likely to explain the pressors effects of big-ET-1.

**ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by the Canadian Institute of Health Research, the "Fonds de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal" and the Canadian Heart and Stroke Foundation. Dr. Jocelyn Dupuis is a senior scholar from the "Fonds de la recherche en santé du Québec".

## REFERENCES

- [1] Yanagisawa M, Kurihawa H, Kimura S et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-415.
- [2] McMurray JJ, Ray SG, Abdullah I, Dargie HJ, Morton JJ. Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation* 1992;85:1374-1379.
- [3] Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ et al. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* 1994;89:1580-1586.
- [4] Omland T, Terje Lie R, Aakvaag A, Aarsland T, Dickstein K. Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction. *Circulation* 1994;89:1573-1579.
- [5] Lerman A, Edwards BS, Hallet JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 1991;325:997-1001.
- [6] Iwasa S, Fan J, Shimokama T, Nagata M, Watanabe T. Increased immunoreactivity of endothelin-1 and endothelin B receptor in human atherosclerotic lesions. A possible role in atherogenesis. *Atherosclerosis* 1999;146:93-100.
- [7] Lariviere R, Day R, Schiffrin EL. Increased expression of endothelin-1 gene in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension* 1993;21:916-920.
- [8] Saito Y, Nakao K, Mukoyama M, Imura H. Increased plasma endothelin level in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990;322:205.

- [9] Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* 1991;114:464-469.
- [10] Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993;328:1732-1739.
- [11] Laporte S, Denault JB, D'Orleans-Juste P, Leduc R. Presence of furin mRNA in cultured bovine endothelial cells and possible involvement of furin in the processing of the endothelin precursor. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22(Suppl 8):S7-S10.
- [12] Takahashi M, Matsushita Y, Iijima Y, Tanzawa K. Purification and characterization of endothelin-converting enzyme from rat lung. *J Biol Chem* 1993;268:21394-21398.
- [13] Schweizer A, Valdenaire O, Nelbock P et al. Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochem J* 1997;328:871-877.
- [14] Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G et al. A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter: molecular cloning and characterization. *Eur J Biochem* 1999;264:341-349.
- [15] Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* 1995;270:15262-15268.

- [16] Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T et al. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett* 1998;428:304-308.
- [17] Dupuis J, Goresky CA, Ryan JW, Rouleau JL, Bach GG. Pulmonary angiotensin-converting enzyme substrate hydrolysis during exercise. *J Appl Physiol* 1992;72:1868-1886.
- [18] Orfanos SE, Langleben D, Khoury J et al. Pulmonary capillary endothelium-bound angiotensin-converting enzyme activity in humans. *Circulation* 1999;99:1593-1599.
- [19] Hulsmann M, Stanek B, Frey B et al. Value of cardiopulmonary exercise testing and big endothelin plasma levels to predict short-term prognosis of patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:1695-1700.
- [20] Haug C, Koenig W, Hoehner M et al. Direct enzyme immunometric measurement of plasma big endothelin-1 concentrations and correlation with indicators of left ventricular function. *Clin chem* 1998;44:239-243.
- [21] Barnes K, Brown C, Turner AJ. Endothelin-converting enzyme: ultrastructural localization and its recycling from the cell surface. *Hypertension* 1998;31:3-9.
- [22] Wu-Wong JR, Budzik GP, Devine EM, Opgenorth TJ. Characterization of endothelin converting enzyme in rat lung. *Biochemical and biophysical research communications* 1990;171:1291-1296.
- [23] D'Orleans-Juste P, Lidbury PS, Warner TD, Vane JR. Intra-vascular human big-endothelin increases circulating levels of endothelin-1 and prostacyclin in the rabbit. *Biochem Pharmacol* 1990;39:R21-R22.



- [24] D'Orleans-Juste P, Lidbury PS, Telemaque S, Warner TD, Vane JR. Human big endothelin releases prostacyclin in vivo and in vitro through a phosphoramidon-sensitive conversion to endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;17(Suppl 7):S251-S255.
- [25] Stangl K, Dschietzig T, Laule M, Alexiou K, Wernecke KD, Baumann G. Pulmonary big endothelin affects coronary tone and leads to enhanced, ET<sub>A</sub>-mediated coronary constriction in early endothelial dysfunction. *Circulation* 1997;96:3192-3200.
- [26] Dupuis J, Goresky CA, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ET<sub>B</sub> receptors. *J Appl Physiol* 1996;81:1510-1515.
- [27] Burkhardt M, Barton M, Shaw S. Receptor and non-receptor-mediated clearance of big-endothelin and endothelin-1: differential effects of acute and chronic ET<sub>A</sub> receptor blockade. *J Hypertens* 2000;18:273-279.
- [28] Hemsén A, Ahlborg G, Ottosson-Seeberger A, Lundberg JM. Metabolism of Big endothelin-1 (1-38) and (22-38) in the human circulation in relation to production of endothelin-1 (1-21). *Regul Pept* 1995;55:287-297.
- [29] Davenport AP, Kuc RE, Mockridge JW. Endothelin-converting enzyme in the human vasculature; evidence for differential conversion of big endothelin-3 by endothelial and smooth-muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31:S1-S3.
- [30] Xu D, Emoto N, Giaid A et al. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 1994;78:473-485.

- [31] Watanabe Y, Naruse M, Monzen C et al. Is big endothelin converted to endothelin-1 in circulating blood? *J Cardiovas Pharmacol* 1991;17(Suppl 7):S503-S505.
- [32] Haynes WG, Webb DJ. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 basal vascular tone. *Lancet* 1994;344:852-854.
- [33] Plumpton C, Haynes WG, Webb DJ, Davenport AP. Phosphoramidon inhibition of the in vivo conversion of big endothelin-1 to endothelin-1 in the human forearm. *Br J Pharmacol* 1995;116:1821-1828.
- [34] Fukuroda T, Noguchi K, Tsuchida S et al. Inhibition of biological actions of big-endothelin-1 by phosphoramidon. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;172:390-395.
- [35] Mombouli JV, Le SQ, Wasserstrum N, Vanhoutte PM. Endothelins 1 and 3 and big endothelin-1 contract isolated human placental veins. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22(Suppl 8):S278-S281.

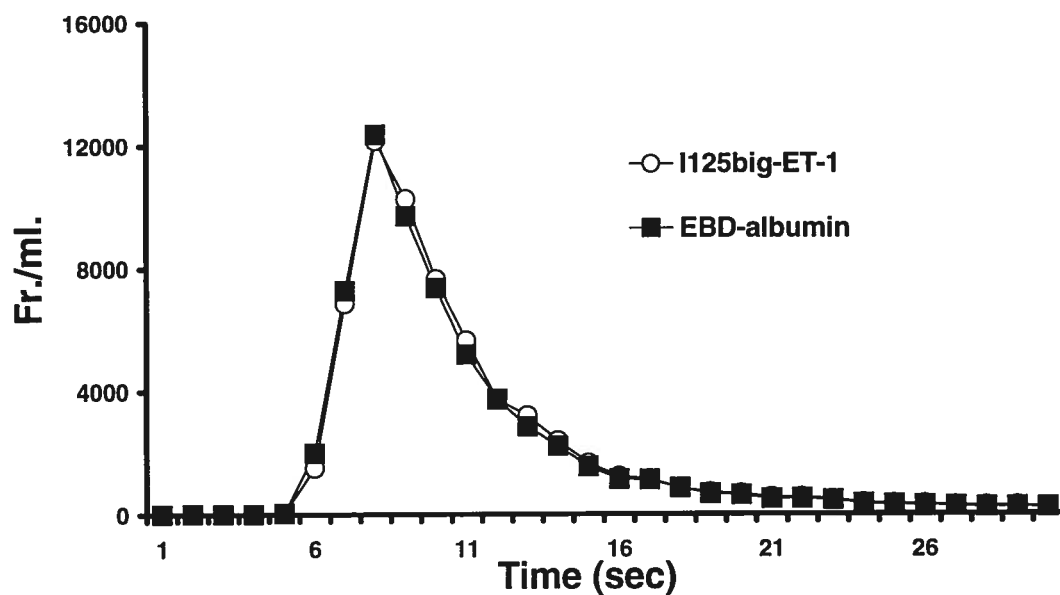
**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1** Outflow profiles of human I<sup>125</sup>big-ET-1 and its vascular reference, EBD-labeled albumin, in isolated lungs (A) and heart (B). Fr/ml is fractional recovery of tracer per ml of perfusate.

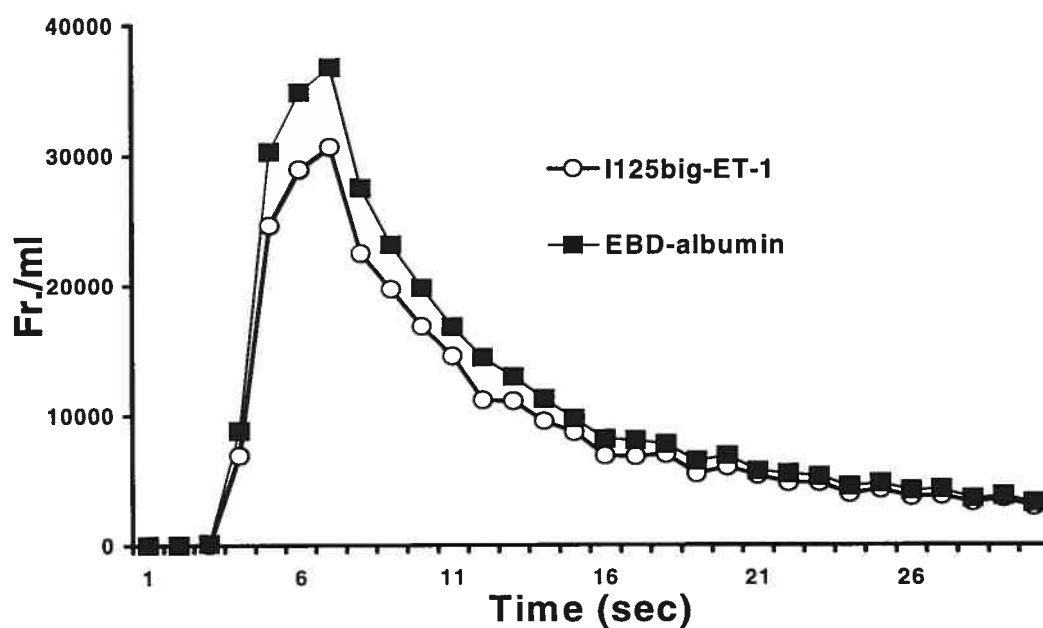
**Figure 2** Big-ET-1 and ET-1 levels from outflow samples after a bolus injection of unlabeled human big-ET-1 in isolated lungs (A) and heart (B).

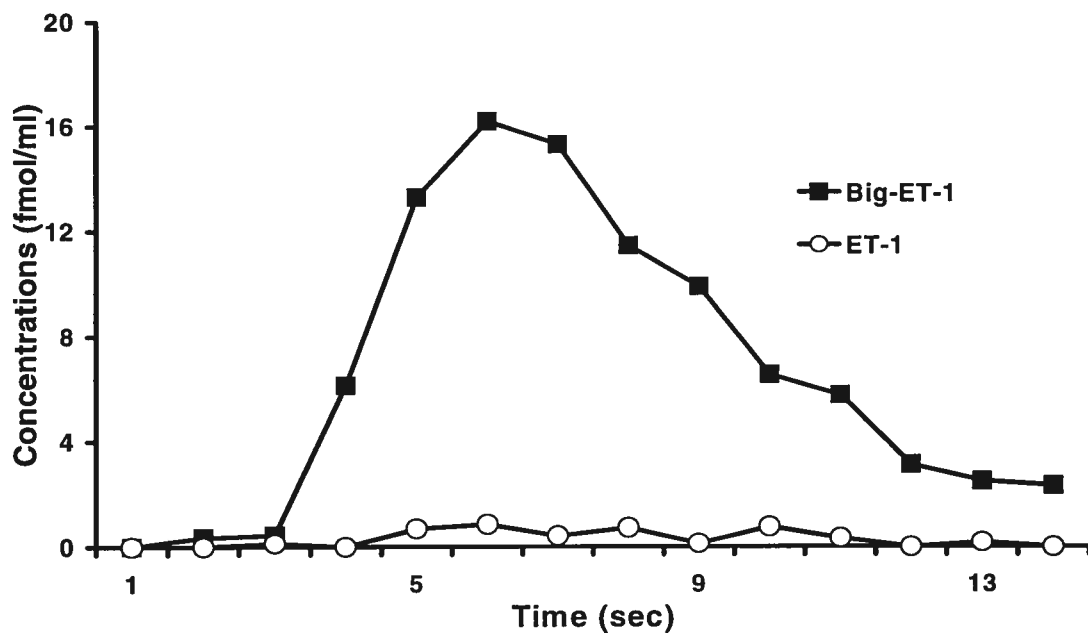
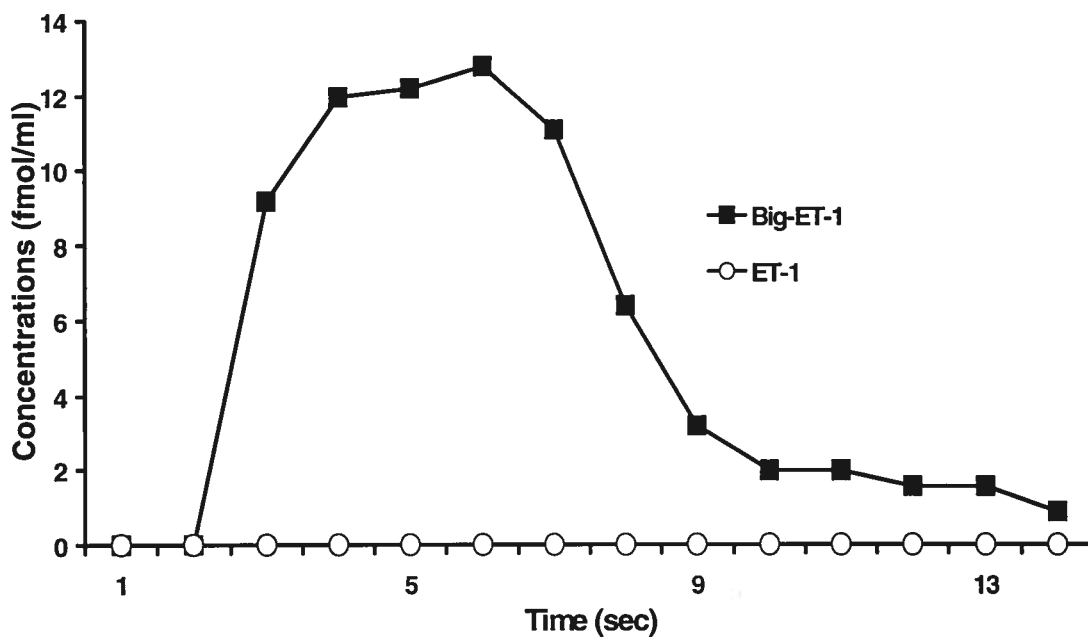
Figure 1

A

Pulmonary Extraction of I<sup>125</sup>big-ET-1

B

Coronary Extraction of I<sup>125</sup>bigET-1

**A****Pulmonary hydrolysis of big-ET-1****B****Coronary hydrolysis of big-ET-1**

## 4.0-DISCUSSION

### 4.1-Rôle du récepteur $ET_B$ dans l'HTP

#### 4.1.1-Clairance de l' $I^{125}$ ET-1

Nos résultats démontrent une clairance de l' $I^{125}$ ET-1 de  $62\pm 5\%$  chez le groupe de rats contrôles. Trois semaines après l'injection de MCT, cette clairance est réduite de façon significative à  $49\pm 10\%$ . Une diminution de la clairance fut également démontrée dans différents modèles animaux d'HTP ainsi que chez l'humain atteint d'HTP primaire et secondaire (184;319). Une diminution de la clairance pulmonaire de l' $I^{125}$ ET-1 pourraient être due à 1) une diminution d'expression du récepteur  $ET_B$  pulmonaire, 2) une diminution de l'affinité du récepteur  $ET_B$  pulmonaire, ou encore 3) une augmentation de la compétitivité avec l'ET-1 endogène suite à des niveaux élevés d'ET plasmatique.

Une diminution d'expression du récepteur  $ET_B$  pulmonaire fut démontrée dans les modèles de rats MCT et de rats insuffisants cardiaques (175;179). Cependant, une augmentation d'expression des récepteurs  $ET_B$  fut notée dans les artères et les veines pulmonaires de rats hypoxiques (177). Notons toutefois, que dans le modèle de rats hypoxiques, une augmentation d'expression des récepteurs  $ET_B$  est retrouvée au niveau de l'artère

pulmonaire alors que l'expression est inchangée lorsqu'il s'agit du poumon entier (177). Il semble donc très important de considérer s'il s'agit d'artères pulmonaires ou encore de poumons entiers. Chez l'humain, une étude récente de Bauer et al. (2002) a démontré une augmentation d'expression du récepteur ET<sub>B</sub> dans les artères pulmonaires de patients atteints d'HTP associée à des thromboembolies (185). Nos présents résultats démontrent une diminution quoique non-significative du pourcentage total de récepteur ET<sub>B</sub> dans le poumon entier de rats MCT ( $32\pm 4\%$  vs  $39\pm 3\%$  chez les rats contrôles). Une diminution d'expression du récepteur ET<sub>B</sub> pulmonaire chez le rat MCT pourrait donc être responsable, du moins en partie, de la réduction de clairance de l'<sup>125</sup>I-ET-1 dans ce modèle d'HTP.

Bien qu'une diminution d'affinité des récepteurs ET<sub>B</sub> pulmonaires ait été démontrée dans d'autres modèles d'HTP (320), nos résultats ne démontrent pas de changements d'affinité de ces récepteurs chez le modèle de rats MCT. La réduction de clairance de l'<sup>125</sup>I-big-ET-1 dans le modèle MCT ne semble donc pas être dû à une diminution d'affinité.

Nos résultats démontrent une augmentation des niveaux plasmatiques (artériels et veineux) d'ET-1 chez les rats MCT. Cette augmentation d'ET-1 plasmatique fut également démontrée dans de nombreux autres modèles d'HTP ainsi que chez l'humain atteint d'HTP primaire et secondaire (131-133;175-177;179). Une augmentation des niveaux circulants d'ET-1 pourrait donc compétitionner avec l'<sup>125</sup>I-ET-1 et ainsi réduire la clairance de celle-ci. Nos

résultats démontrent cependant que la clairance de l' $I^{125}$ ET-1 n'est nullement modifiée par l'ajout de 2 pg/ml d'ET-1 à la solution de perfusion chez des rats contrôles.

#### *4.1.2-Régulation du tonus vasculaire pulmonaire*

Dans le poumon isolé de rats contrôles, l'administration de BQ788 diminue le débit sanguin pulmonaire de  $0,7 \pm 0,3$  ml/min seulement à la plus forte dose d'antagoniste ( $10^{-8}$  mole). Dans le poumon isolé de rats MCT, le BQ788 diminue le débit sanguin pulmonaire de façon plus importante ( $3,3 \pm 0,7$  ml/min vs  $0,7 \pm 0,3$  ml/min,  $p < 0.01$ ) et cette diminution débute à la dose de  $10^{-9}$  mole. Nos résultats suggèrent donc un rôle protecteur du récepteur  $ET_B$  lors d'HTP. Un rôle protecteur accru des récepteurs  $ET_B$  via l'atténuation de l'augmentation des pressions pulmonaires lors d'HTP fut également démontré dans d'autres modèles tels le chien DMCT et le chien avec insuffisance cardiaque induite par tachycardie (203;312). Il est toutefois important de noter que la diminution de débit sanguin pulmonaire suite à l'administration de BQ788 est transitoire et significative seulement lorsque plus de 50 % des récepteurs  $ET_B$  sont bloqués. Ceci suggère donc que le récepteur  $ET_B$  endothélial pulmonaire ne représente pas un mécanisme très sensible pour le contrôle du tonus vasculaire pulmonaire, ceci autant chez les rats sains que les rats avec HTP.



#### 4.1.3-Profil cardiaque des récepteurs de l'ET

Au niveau des cardiomyocytes, les récepteurs ET<sub>A</sub> représentent environ 90% des récepteurs (321;322). La stimulation de ces récepteurs induit des effets inotropes et chronotropes positifs et favorise l'hypertrophie des cardiomyocytes (115;116;118;119). Le rôle des récepteurs ET<sub>B</sub> cardiaques demeure toutefois imprécis. Lors d'hypertrophie cardiaque, l'activation des récepteurs ET<sub>B</sub> pourrait contribuer à la fibrose cardiaque (121;122). En effet, les récepteurs ET<sub>B</sub> représentent 60% des récepteurs au niveau des fibroblastes cardiaques et semblent impliqués dans le métabolisme du collagène (121). Guarda et al. (1993) ont d'ailleurs démontré que l'augmentation de synthèse de collagène de type I et III induite par l'ET-1 et l'ET-3 ne pouvait être bloquée par un antagoniste sélectif ET<sub>A</sub> dans les fibroblastes de rats (120). De plus, Hocher et al. (1999) ont récemment démontré que le blocage chronique des récepteurs ET<sub>B</sub> mais non celui des récepteurs ET<sub>A</sub> pouvait réduire la fibrose chez le cœur hypertrophié de rats (122).

Nos résultats démontrent une augmentation significative des niveaux d'ET-1 à la fois dans le ventricule droit et le ventricule gauche. Cette augmentation est toutefois significativement plus importante dans le ventricule droit (+198 % vs +127 % pour le ventricule gauche,  $p < 0.05$ ). Une augmentation d'expression cardiaque de l'ET-1 fut établie dans de nombreux modèles d'HTP (305;323;324). Nos résultats démontrent également une augmentation

de la densité du récepteur ET<sub>B</sub> dans le ventricule droit alors que sa densité demeure inchangée dans le ventricule gauche. Pour sa part, la densité du récepteur ET<sub>A</sub> est inchangée à la fois dans le ventricule droit et le ventricule gauche. Le pourcentage de récepteur ET<sub>B</sub> dans le ventricule droit augmente donc de 6±1 % à 18±3 %. D'autres études ont toutefois démontré une augmentation d'expression des deux types de récepteurs (ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>) dans le ventricule droit chez différents modèles animaux d'HTP (178;190;323;324). L'augmentation sélective du récepteur ET<sub>B</sub> dans le ventricule droit pourrait donc être spécifique au modèle d'HTP induite par la MCT. Les effets d'une augmentation des récepteurs ET<sub>B</sub> ventriculaires droits sur la fibrose et l'hypertrophie cardiaque restent toutefois à être démontrés. Il pourrait être favorable de bloquer les récepteurs ET<sub>B</sub> afin de contrer la synthèse de collagène de type I et III provoquée par ces derniers.

Nos résultats démontrent également que le blocage sélectif des récepteurs ET<sub>A</sub>, avec le LU135252, diminue de façon significative les niveaux d'ET-1 dans le ventricule droit mais non dans le ventricule gauche. Le LU135252 diminue également de façon significative la densité des récepteurs ET<sub>B</sub> dans le ventricule droit. La diminution des niveaux d'ET-1 et de la densité du récepteur ET<sub>B</sub> dans le ventricule droit provoquée par le LU135252 pourrait être secondaire à l'amélioration des pressions pulmonaires et donc de la post-charge ventriculaire droite. Toutefois, puisque le LU135252 n'est pas un antagoniste très sélectif (K<sub>i</sub> de 1,4 nM pour le récepteur ET<sub>A</sub> vs 184 nM pour le récepteur ET<sub>B</sub>) nous ne pouvons exclure un effet direct de cet antagoniste

sur la densité du récepteur ET<sub>B</sub> ventriculaire droit. Des études futures utilisant un antagoniste possédant une sélectivité supérieure pour les récepteurs ET<sub>A</sub> que celle du LU135252 serait donc nécessaire pour exclure cette possibilité.

#### ***4.2- Comparaison d'antagonistes sélectif et non-sélectif***

Prié et al. (1997) et Dupuis et al. (1999) ont démontré qu'un antagoniste sélectif pour les récepteurs ET<sub>A</sub>, le LU135252, pouvait être efficace pour prévenir et faire régresser le développement d'HTP et d'hypertrophie ventriculaire droite chez le rat MCT (193;194). De façon similaire, Hill et al. (1997) ont démontré qu'un antagoniste non-sélectif était également efficace pour prévenir et faire régresser le développement de l'HTP et de l'hypertrophie ventriculaire droite chez ce même modèle (195). L'efficacité d'antagonistes autant sélectifs pour les récepteurs ET<sub>A</sub> que non-sélectifs fut également démontrée dans de nombreux autres modèles d'HTP (93;191;192;196).

Bien que l'utilisation d'un antagoniste non-sélectif soit efficace, on ne sait toujours pas si le blocage supplémentaire des récepteurs ET<sub>B</sub> est supérieur ou inférieur au blocage seul des récepteurs ET<sub>A</sub>. Pour tenter de résoudre cette problématique, nous avons effectué une étude comparative directe entre un antagoniste sélectif ET<sub>A</sub> (LU135252) et un antagoniste non-sélectif (BSF420627) dans le traitement de l'HTP chez le rat MCT.

#### *4.2.1-Effets sur la survie*

La survie des rats MCT à 5 semaines n'était que de 35 %. Le traitement avec l'antagoniste sélectif ET<sub>A</sub> a augmenté, quoique de façon non-significative, ce taux de survie à 56 % alors que le traitement avec l'antagoniste non-sélectif a augmenté de façon significative ( $p=0.0015$ ) la survie à 67 %. Bien qu'il n'y ait pas de différence significative entre le taux de survie des rats traités avec l'un ou l'autre des antagonistes (67% vs 56%), le BSF420627 semble supérieur pour prévenir la mortalité des rats MCT.

#### *4.2.2-Effets Hémodynamiques*

Nos résultats démontrent que les deux types d'antagonistes sont efficaces et ceci de façon similaire pour améliorer la tension veineuse centrale, les pressions systoliques et télédiastoliques du ventricule droit ainsi que l'indice de contractilité ( $dP/dt$ ) du ventricule droit. La pression artérielle moyenne est toutefois améliorée de façon significative seulement chez les rats traités avec l'antagoniste non-sélectif.

Les relations débits-pressions pulmonaires, permettant d'évaluées les propriétés résistives pulmonaires, sont également améliorées de façon similaires par le LU135252 et le BSF420627.

Le blocage supplémentaire des récepteurs  $ET_B$  ne semble donc pas apporter d'effets bénéfiques additionnels sur les pressions et résistances vasculaires pulmonaires. Certaines études ont pourtant démontré qu'un blocage des deux récepteurs était nécessaire pour contrer complètement la vasoconstriction induite par l'ET-1 dans la circulation pulmonaire (313;314). En effet, Sato et al. (1995) ont démontré que la combinaison du BQ123 et du BQ788 était plus efficace pour inhiber la vasoconstriction induite par l'ET-1 dans le poumon isolé de rats que l'utilisation du BQ123 seul (313). Notons toutefois que cette étude avait été effectuée chez des poumons de rats sains et que le blocage était effectué de façon aigue.

Le blocage supplémentaire des récepteurs  $ET_B$  n'a toutefois pas d'effets néfastes sur les pressions pulmonaires bien qu'un rôle vasodilatateur accru lors d'HTP est suggéré par nos résultats et ceux de d'autres groupes (203;312). Notons que comme mentionné auparavant, ce rôle protecteur n'est que transitoire et n'apparaît que lorsque plus de 50 % des récepteurs  $ET_B$  sont bloqués. Cette absence d'effet néfaste sur les pressions pulmonaires supporte donc notre hypothèse que le récepteur  $ET_B$  pulmonaire ne représente pas un mécanisme très sensible dans le contrôle du tonus vasculaire pulmonaire chez le rat MCT.

#### 4.2.3-Effet sur l'hypertrophie du ventricule droit

Les rats MCT ont développé une hypertrophie ventriculaire droite marquée avec un ratio du poids du ventricule droit sur le poids du ventricule gauche plus le septum (VD/VG+S) de 73 % vs 24 % chez les rats contrôles. Cette hypertrophie n'est nullement améliorée par l'antagoniste sélectif ET<sub>A</sub> (70%) alors qu'elle est diminuée de façon significative par l'antagoniste non-sélectif à un ratio de 54 % ( $p < 0.01$ ). Puisque les pressions systoliques et télédiastoliques du ventricule droit sont similaires chez les rats traités avec l'un ou l'autre des antagonistes, il pourraient donc y avoir un effet bénéfique direct du blocage des récepteurs ET<sub>B</sub> sur l'hypertrophie cardiaque. L'hypertrophie cardiaque fut pourtant classiquement associée aux récepteurs ET<sub>A</sub>. En effet, l'induction de MAPKs et le développement d'hypertrophie ventriculaire sont tous deux bloqués par le BQ123 mais non pas par le BQ788 dans des cœurs de rats néonataux (118;119). Notons cependant que les cœurs utilisés lors de ces expériences provenaient de rats néonataux sains. Nos résultats suggèrent donc que le récepteur ET<sub>B</sub> cardiaque du rat MCT adulte jouerait un rôle dans l'hypertrophie cardiaque.

Un ratio VD/VG+S élevé ne représente pas seulement une hypertrophie des cardiomyocytes mais pourrait également être augmenté par la présence de fibrose dans le ventricule droit. Puisqu'il fut démontré que la fibrose de ventricules hypertrophiés était atténuée seulement par le BQ788, et non pas par le BQ123, le blocage supplémentaire du récepteur ET<sub>B</sub> pourrait diminuer

cette fibrose (122). La diminution du ratio VD/VG+S suite à l'administration d'un antagoniste non-sélectif pourrait donc en partie être due à une réduction de la fibrose cardiaque. Notons cependant que d'autres études dans le même modèle d'HTP ont décrit une diminution de l'hypertrophie ventriculaire droite suite à un traitement avec un antagoniste sélectif ET<sub>A</sub> (193;325). Ces études n'ont toutefois pas démontré si un antagoniste non-sélectif améliorait de façon similaire ou supérieure cette hypertrophie ventriculaire droite.

Une étude de Mulder et al. (2000) a récemment comparé l'efficacité d'un antagoniste sélectif ET<sub>A</sub>, un antagoniste sélectif ET<sub>B</sub> et la combinaison des deux antagonistes dans le traitement de l'insuffisance cardiaque chez le rat avec infarctus du myocarde (326). Après quatre semaines de traitements, l'antagoniste sélectif ET<sub>A</sub> et la combinaison des deux antagonistes amélioraient de façon similaire la pression artérielle, les pressions ventriculaire gauche, la fraction de raccourcissement et le diamètre télédiastolique du ventricule gauche ainsi que la densité de collagène dans le ventricule gauche. L'antagoniste sélectif ET<sub>B</sub>, pour sa part, améliorait seulement la densité de collagène dans le ventricule gauche et ceci de façon identique à la combinaison des deux antagonistes. Puisque l'antagoniste sélectif ET<sub>B</sub> n'a eu aucun effet sur l'hémodynamie, ces auteurs ont suggéré que le récepteur ET<sub>B</sub> modulait de façon importante l'accumulation de collagène chez le rat infarctus. La seule différence notable entre le traitement avec l'antagoniste sélectif ET<sub>A</sub> et avec la combinaison des deux types d'antagonistes fut une diminution significative de la fréquence cardiaque

uniquement chez le groupe de rats traités avec la combinaison. Les auteurs concluent que cette diminution de fréquence cardiaque pourrait améliorer la perfusion coronaire en diastole ainsi que le remplissage du ventricule gauche.

Puisque le BSF420627 ne provoque pas d'effets néfastes sur le tonus vasculaire pulmonaire et qu'il est supérieur au LU135252 pour améliorer la survie et le ratio VD/VG+S nous concluons qu'un antagoniste non-sélectif est préférable à un antagoniste sélectif ET<sub>A</sub> dans le traitement d'HTP induite par la MCT. Ces résultats ne peuvent toutefois être extrapolés à différents types d'HTP. Des études à venir devraient comparer directement l'efficacité d'antagonistes sélectifs et non-sélectifs dans d'autres modèles animaux d'HTP et ultimement chez les patients atteints d'HTP primaire.

En plus des effets bénéfiques rapportés dans cette thèse, le blocage supplémentaire des récepteurs ET<sub>B</sub> pourrait également diminuer la relâche de TxA<sub>2</sub> et inhiber l'autoinduction d'ET-1. En effet, D'Orleans-Juste et al. (1994) ont démontré que la synthèse de TxA<sub>2</sub> induite par l'ET-1 était bloquée par le BQ788 mais non pas par le BQ123 dans le poumon isolé de cobaye (105). De plus, l'IRL 1620, un agoniste des récepteurs ET<sub>B</sub>, stimulait la synthèse de TxA<sub>2</sub> dans le même modèle animal (105). Pour leur part, Iwasaki (1995) ont démontré que l'augmentation d'expression de l'ARNm de la préproET-1 induite par l'ET-1 (465 %) était inhibée par le BQ788 et non pas par le BQ123 (327).



### **4.3-Activité de l'ECE luminale**

Les effets du système ET peuvent être inhibés soit par le blocage de ses récepteurs ou soit par l'inhibition de la synthèse d'ET. Les trois premières études de cette thèse nous ont permis d'évaluer le rôle des récepteurs de l'ET, particulièrement celui du récepteur ET<sub>B</sub>, lors d'HTP. Cette quatrième étude vise maintenant à déterminer l'activité de l'ECE dans le poumon isolé de rat. Le poumon possède un grand contenu en ECEs localisé à la fois à l'intérieur des cellules et à la surface de l'endothélium (315). Plusieurs études ont démontré que l'hydrolyse de big-ET-1 humaine exogène avait lieu dans le poumon de différentes espèces (316;317;328). Cette hydrolyse pourrait cependant avoir lieu à l'intérieur des cellules et/ou à la surface de l'endothélium. Nous avons donc tenté de quantifier l'activité de l'ECE luminale en utilisant les principes de la technique de courbes de dilutions à indicateurs multiples. Une quantification précise de l'activité de l'ECE luminale pourrait ultimement nous permettre de comparer l'efficacité de différents inhibiteurs de l'ECE. L'extraction d'I<sup>125</sup>big-ET-1 était premièrement évaluée suivi de la quantification de l'hydrolyse de big-ET-1. Dans le poumon isolé de rats, nous démontrons qu'il n'y a aucune extraction d'I<sup>125</sup>big-ET-1 dans un seul temps de transit pulmonaire tel que démontré par la parfaite superposition des courbes d'albumine marquée au bleu d'Evans (servant de référence vasculaire) et d'I<sup>125</sup>big-ET-1. Nous démontrons également qu'il n'y a aucune hydrolyse décelable de la big-ET-1 dans un seul temps de transit pulmonaire tel que démontré par l'absence de production d'ET-1.

Stangl et al. (1997) ont démontré que le cœur pouvait également hydrolyser la big-ET-1 circulante (329). Ils ont établis que la big-ET-1 présente dans l'effluent de poumons isolés de lapins pouvait réduire le débit sanguin coronaire et augmenter la production d'ET-1 dans le cœur isolé de lapin. Nos résultats démontrent que 14 % de l' $^{125}$ big-ET-1 est extraite dans un seul temps de passage coronarien chez le cœur isolé de rats. Aucune hydrolyse de big-ET-1 n'est cependant décelable dans ce temps de transit coronaire.

Nous démontrons donc qu'il n'y a aucune hydrolyse de big-ET-1 dans un temps de transit à la fois dans la circulation pulmonaire et coronarienne. De nombreuses autres études ont pourtant démontré que l'administration intravasculaire de big-ET-1 provoquait la relâche de prostacycline, augmentait la production d'ET-1 et induisait une vasoconstriction aussi bien dans le lit vasculaire pulmonaire que coronarien (317;328-330). Nos résultats ne sont toutefois pas totalement en contradiction avec les résultats de ces études. En effet, ces effets ont lieu après la perfusion constante de doses pharmacologiques de big-ET-1 et n'apparaissent que quelques minutes après l'administration de big-ET-1 tandis que nous avons utilisé un simple bolus physiologique de big-ET-1 et n'avons évalué l'hydrolyse que dans un seul temps de passage (environ 30 secondes). Une extraction lente suivie d'une conversion intracellulaire de la big-ET-1 pourrait être responsable des effets rapportés dans ces différentes études. Nous concluons donc que l'ECE luminale ne joue pas un rôle prédominant dans l'hydrolyse de la big-ET-1

mais qu'une hydrolyse intracellulaire est plus susceptible de moduler la production d'ET-1.

La prédominance de l'hydrolyse intracellulaire est d'ailleurs supportée par de nombreuses autres études. Davenport et al. (1998) ont démontré que l'hydrolyse de big-ET-1 dans les cellules endothéliales de veines ombilicales humaines était augmentée de façon importante lorsque ces cellules étaient perméabilisées, suggérant ainsi que l'hydrolyse intracellulaire était responsable de 85 % de l'hydrolyse totale (331). Xu et al. (1994) ont pour leur part démontré que la transfection d'ECE-1 dans des CHO (Chinese Hamster Ovary) sécrétant de la big-ET-1 résultait en une hydrolyse de 50-90 % alors que la coculture de CHO exprimant l'ECE-1 avec des CHO sécrétant la big-ET-1 résultait seulement en une hydrolyse de 10 % (332). Des études *in vivo* chez l'humain ont également suggéré que l'ECE luminale ne jouait pas un rôle important dans la conversion de big-ET-1 circulante. En effet, Haynes et al. (1994) ont démontré que la conversion de big-ET-1 dans l'avant-bras de l'humain était de moins de 10 % (333).

## 5.0-CONCLUSIONS

Les résultats de cette thèse démontrent donc que le blocage supplémentaire du récepteur ET<sub>B</sub> est bénéfique dans le traitement de l'HTP induite par injection de MCT. En effet, le blocage supplémentaire de ce récepteur n'induit pas d'effets néfastes sur les pressions et résistances vasculaires pulmonaires. D'autre-part, le blocage supplémentaire de ce récepteur améliore la survie et l'hypertrophie ventriculaire droite chez les rats MCT. Nos résultats suggèrent également un rôle possible du récepteur ET<sub>B</sub> dans la fibrose et/ou l'hypertrophie cardiaque. D'autres études comparatives directes de l'efficacité d'un antagoniste sélectif ET<sub>A</sub> versus un antagoniste non-sélectif sont toutefois nécessaires dans différents modèles animaux d'HTP et ultimement chez l'humain atteint d'HTP primaire afin de démontrer la supériorité réelle d'un antagoniste non-sélectif dans un tel traitement.

Les résultats de cette thèse démontrent également que les ECEs luminales présentent dans les circulations pulmonaires et coronaires ne semblent pas jouer un rôle important dans la conversion de la big-ET-1 circulante. Une extraction lente de big-ET-1 circulante suivie d'hydrolyse intracellulaire de celle-ci semble plus susceptible d'expliquer les effets vasoconstricteurs et la relâche d'ET-1 suite à l'administration intraveineuse de big-ET-1.

## **6.0-REMERCIEMENTS**

Dr Jocelyn Dupuis

-Alexandre Caron, MSc

-Martin Lucas, MSc

-Annik Migneault, MSc

-Nathalie Ruël, TSA

-Anh Thu Tran Duc, MSc

-Tout le personnel du secrétariat et des techniques audiovisuelles  
du Centre de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal

**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Moncada S, Gryglewski RJ, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976; 263:663-665.
- (2) Hara S, Miyata A, Yokoyama C, Brugger R, Lottspeich F, Ullrich R, Tanabe T. Molecular cloning and expression of prostacyclin synthase from endothelial cells. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1995; 23:121-123.
- (3) Miyata A, Hara S, Yokoyama C, Inoue H, Ullrich V, Tanabe T. Molecular cloning and expression of human prostacyclin synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200:1728-1734.
- (4) Boie Y, Rushmore TH, Darmon-Goodwin A, Grygorczyk R, Slipetz DM, Metters KM, Abramovitz M. Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. *J Biol Chem* 1994; 269:12173-12178.
- (5) Parfenova H, Hsu P, Leffler CW. Dilator prostanoid-induced cyclic AMP formation and release by cerebral microvascular smooth muscle cells: inhibition by indomethacin. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272:44-52.

- (6) Patrono C, Rotella CM, Toccafondi RS, Aterini S, Pinca E, Tanini A, Zonefrati R. Prostacyclin stimulates the adenylate cyclase system of human thyroid tissue. *Prostaglandins* 1981; 22:105-115.
- (7) Alshihabi SN, Chang YS, Frangos JA, Tarbell JM. Shear stress-induced release of PGE2 and PGI2 by vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 224:808-814.
- (8) Hecker M, Mulsch A, Bassenge E, Busse R. Vasoconstriction and increased flow: two principal mechanisms of shear stress-dependent endothelial autacoid release. *Am J Physiol* 1993; 265:H828-H833.
- (9) Terashita Z, Fukui H, Nishikawa K, Hirata M, Kikuchi S. Effects of arachidonic acid and bradykinin on the coronary flow, release of PGI2 and cardiac functions in the perfused guinea-pig heart. *Jpn J Pharmacol* 1982; 32:351-358.
- (10) Grodzinska L, Gryglewski RJ. Angiotensin-induced release of prostacyclin from perfused organs. *Pharmacol Res Commun* 1980; 12:339-347.
- (11) de Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:9797-9800.

- (12) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376.
- (13) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524-526.
- (14) Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992; 267:14519-14522.
- (15) Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 1992; 307:287-293.
- (16) Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351:714-718.
- (17) Nakane M, Schimdt HH, Pollock JS, Forstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 1993; 316:175-180.



- (18) MacNaul KL, Hutchinson NI. Differential expression of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196:1330-1334.
- (19) Chen LY, Mehta JL. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27:154-158.
- (20) Balligand JL, Ungereanu-Longrois D, Simmons WW, Kobzik L, Lowenstein CJ, Lamas S, Kelly RA, Smith TW, Michel T. Induction of NO synthase in rat cardiac microvascular endothelial cells by IL-1 beta and INF-gamma. *Am J Physiol* 1995; 268:H1293-H1303.
- (21) Balligand JL, Ungereanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, Taha Z, Lowenstein CJ, Davidoff AJ, Kell RA. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J Biol Chem* 1994; 269:27580-27588.
- (22) Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, Bobrow LG, Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br J Cancer* 1995; 72:41-44.

- (23) Ambs S, Bennett WP, Merriam WG, Ogunfusika MO, Oser SM, Khan MA, Jones RT, Harris CC. Vascular endothelial growth factor and nitric oxide synthase expression in human lung cancer and the relation to p53. *Br J Cancer* 1998; 78:233-239.
- (24) Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, Rhodes P, Westmore K, Emson PC, Moncada S. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:4392-4396.
- (25) Iadecola C, Zhang F, Xu X. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol* 1995; 268:R286-R292.
- (26) Parmentier S, Bohme GA, Lerouet D, Damour D, Stutzmann JM, Margail I, Plotkine M. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents ischaemic brain injury. *Br J Pharmacol* 1999; 127:546-552.
- (27) Wildhirt SM, Weismueller S, Schulze C, Conrad N, Kornberg A, Reichart B. Inducible nitric oxide synthase activation after ischemia/reperfusion contributes to myocardial dysfunction and extent of infarct size in rabbits: evidence for a late phase of nitric oxide-mediated reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1999; 43:698-711.
- (28) Feng Q, Lu X, Jones DL, Shen J, Arnold MO. Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and

higher mortality after myocardial infarction in mice. *Circulation* 2001; 104:700-707.

- (29) Singh S, Evans TW. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction. *Eur Respir J* 1997; 10:699-707.
- (30) Kishimoto J, Spurr N, Liao M, Lizhi L, Emson P, Xu W. Localization of brain nitric oxide synthase (NOS) to human chromosome 12. *Genomics* 1992; 14:802-804.
- (31) Xu W, Charles IG, Moncada S, Gorman P, Sheer D, Liu L, Emson P. Mapping of the genes encoding human inducible and endothelial nitric oxide synthase (NOS2 and NOS3) to the pericentric region of chromosome 17 and to chromosome 7, respectively. *Genomics* 1994; 21:419-422.
- (32) Ignarro LJ. Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism. *Blood Vessels* 1991; 28:67-73.
- (33) Murad F, Ishii K, Forstermann U, Gorsky L, Kerwin JF, Pollock J, Heller M. EDRF is an intracellular second messenger and autacoid to regulate cyclic GMP synthesis in many cells. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1990; 24:441-448.

- (34) Lee SW, Kang TM. Effects of nitric oxide on Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels in smooth muscle cells of the human corpus cavernosum. *Urol Res* 2001; 29:359-365.
- (35) Zhou XB, Arntz C, Kamm S, Motejlek K, Sausbier U, Wang GX, Ruth J, Korth M. A molecular switch for specific stimulation of the BKCa channel by cGMP and cAMP kinase. *J Biol Chem* 2001; 276:43239-43245.
- (36) Ishikawa T, Hume JR, Keef KD. Regulation of Ca<sup>2+</sup> channels by cAMP and cGMP in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1993; 73:1128-1137.
- (37) Sumii K, Sperelakis N. cGMP-dependent protein kinase regulation of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in rat ventricular myocytes. *Circ Res* 2003; 77:803-812.
- (38) Nishimura N, van Breemen C. Direct regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163:929-935.
- (39) Lee MR, Li L, Kitazawa T. Cyclic GMP causes Ca desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem* 1997; 272:5063-5068.
- (40) Bogle RG, Coade SB, Moncada S, Pearson JD, Mann GE. Bradykinin and ATP stimulate L-arginine uptake and nitric oxide release in

- vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180:932.
- (41) Hu ZW, Miller JW, Hoffman BB. Induction of enhanced release of endothelium-derived relaxing factor after prolonged exposure to alpha-adrenergic agonists: role in desensitization of smooth muscle contraction. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 23:337-343.
- (42) Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Circ Res* 1997; 81:885-892.
- (43) Mankad PS, Chester AH, Yacoub MH. 5-Hydroxytryptamine mediates endothelium dependent coronary vasodilation in the isolated rat heart by the release of nitric oxide. *Cardiovasc Res* 1991; 25:244-248.
- (44) Ranjan V, Xiao Z, Diamond SL. Constitutive NOS expression in cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress. *Am J Physiol* 1995; 269:H550-H555.
- (45) Grser T, Rubanyi GM. Different mechanisms of hypoxic relaxation in canine coronary arteries and rat abdominal aortas. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20:S117-S119.

- (46) Barer G, Emery C, Stewart A, Bee D, Howard P. Endothelial control of the pulmonary circulation in normal and chronically hypoxic rats. *J Physiol* 1993; 463:1-6.
- (47) Cowan CL, Cohen RA. Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and -independent responses. *Am J Physiol* 1991; 261:H830-H835.
- (48) Garland JG, McPherson GA. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 1992; 105:429-435.
- (49) Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res* 1996; 78:415-423.
- (50) Prior HM, Webster N, Quinn K, Beech DJ, Yates MS. K(+)-induced dilation of a small renal artery: no role for inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Cardiovasc Res* 1998; 37:780-790.
- (51) Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1995; 268:C799-C822.
- (52) Yamamoto Y, Imaeda K, Suzuki H. Endothelium-dependent hyperpolarization and intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles. *J Physiol* 1999; 514:505-513.

- (53) Emerson GG, Segal SS. Electrical coupling between endothelial cells and smooth muscle cells in hamster feed arteries: role in vasomotor control. *Circ Res* 2000; 87:474-479.
- (54) Needleman P, Moncada S, Bunting S, Vane JR, Hamberg M, Samuelsson B. Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A<sub>2</sub> from prostaglandin endoperoxides. *Nature* 1976; 261:558-560.
- (55) Mais DE, Saussy DL, Chaikhouni A, Kochel PJ, Knapp DR, Hamanaka N, Halushka PV. Pharmacologic characterization of human and canine thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptors in platelets and blood vessels: evidence for different receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 233:418-424.
- (56) Ogletree ML, Harris DN, Greenberg R, Haslanger MF, Nakane M. Pharmacological actions of SQ 29,548, a novel selective thromboxane antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 234:435-441.
- (57) Shenker A, Goldsmith P, Unson CG, Spiegel AM. The G protein coupled to the thromboxane A<sub>2</sub> receptor in human platelets is a member of the novel G<sub>q</sub> family. *J Biol Chem* 1991; 266:9309-9313.
- (58) Baldassare JJ, Tarver AP, Henderson PA, MacKin WM, Sahagan B, Fisher GJ. Reconstitution of thromboxane A<sub>2</sub> receptor-stimulated phosphoinositide hydrolysis in isolated platelet membranes:

involvement of phosphoinositide-specific phospholipase C-beta and GTP-binding protein Gq. *Biochem J* 1993; 291:235-240.

- (59) Hanasaki K, Nakano T, Arita H. Receptor-mediated mitogenic effect of thromboxane A<sub>2</sub> in vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 1990; 2535:2545.
- (60) Ellis EF, Oelz O, Roberts LJ, Payne NA, Sweetman BJ, Nies AS, Oates JA. Coronary arterial smooth muscle contraction by a substance released from platelets: evidence that it is thromboxane A<sub>2</sub>. *Science* 1976; 193:1135-1137.
- (61) Kayama N, Sakaguchi K, Kaneko S, Kubota T, Fukuzawa T, Kawamura S, Yoshimoto T, Yamamoto S. Inhibition of platelet aggregation by 1-alkylimidazole derivatives, thromboxane A synthetase inhibitors. *Prostaglandins* 1981; 21:543-544.
- (62) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazake Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-415.
- (63) Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:2863-2867.



- (64) Kloog Y, Ambar I, Sokolovsky M, Kochva E, Wollberg Z, Bdolah A. Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science* 1988; 242:268-270.
- (65) Ambar I, Kloog Y, Schwartz I, Haxum E, Sokolovsky M. Competitive interaction between endothelin and sarafotoxin: binding and phosphoinositides hydrolysis in rat atria and brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158:195-201.
- (66) Arinami T, Ishikawa M, Inoue A, Yanagisawa M, Masaki T, Yoshida MC, Hamaguchi H. Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin-1 gene (EDN-1) to 6p23-24, the endothelin-2 gene (EDN-2) to 1p34, and the endothelin-3 gene (EDN-3) to 20q13.2-13.3. *Am J Hum Genet* 1991; 48:990-996.
- (67) Laporte S, Denault JB, D'Orleans-Juste P, Leduc R. Presence of furin mRNA in cultured bovine endothelial cells and possible involvement of furin in the processing of the endothelin precursor. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22:S7-S10.
- (68) Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, Shinimi O, Sugita Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T. Conversion of big-endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationships of big endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13:S5-S7.

- (69) Turner AJ, Tanzawa K. Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL and PEX. *Faseb J* 1997; 11:355-364.
- (70) Takahashi M, Matsushita Y, Iijima Y, Tanzawa K. Purification and characterization of endothelin-converting enzyme from rat lung. *J Biol Chem* 1993; 268:21394-21398.
- (71) Valdenaire O, Rohrbacher E, Mattei MG. Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J Biol Chem* 1995; 270:29794-29798.
- (72) Schweizer A, Valdenaire O, Nelbock P, Deuschle U, Dumas Milne Edwards JB, Stumpf JG, Loffler BM. Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochem J* 1997; 328:871-877.
- (73) Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G, Thouard A, Barret A, Vranckx R, Tougard C, Michel JB. A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter: Molecular cloning and characterization. *Eur J Biochem* 1999; 264:341-349.
- (74) Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* 1995; 270:15262-15268.

- (75) Ikeda S, Emoto N, Alimsardjono H, Yokoyama M, Matsuo M. Molecular isolation and characterization of novel four subisoforms of ECE-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293:421-426.
- (76) Lorenzo MN, Khan RY, Wang Y, Tai SC, Chan GC, Cheung AH, Marsden PA. Human endothelin converting enzyme-2 (ECE2): characterization of mRNA species and chromosomal localization. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1522:46-52.
- (77) Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T, Aoyama T, Okamoto Y, Miwa S, Shimohama S, Kimura J, Masaki T. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett* 1998; 428:304-308.
- (78) Lebel N, D'Orleans-Juste P, Fournier A, Sirois P. Role of the neutral endopeptidase 21.11 in the conversion of big endothelins in guinea-pig lung parenchyma. *Br J Pharmacol* 1996; 117:184-188.
- (79) Nakano A, Kishi F, Minami K, Wakabayashi H, Nakaya Y, Kido H. Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. *J Immunol* 1997; 159:1987-1992.
- (80) Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Vasoconstrictor activity of novel endothelin peptide, ET-1 (1-31), in human mammary and coronary arteries in vitro. *Br J Pharmacol* 2001; 134:1360-1366.

- (81) Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular Matrix Metalloproteinase-2 cleaves big-endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* 1999; 85:906-911.
- (82) Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny PJ, Schneider B, Waldhausl W, Binder BR. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267:16066-16068.
- (83) Emori T, Hirata Y, Ohta K, Kanno K, Eguchi S, Imai T, Schichiri M, Marumo F. Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension* 1991; 18:165-170.
- (84) Russell FD, Skepper JN, Davenport AP. Human endothelial cell storage granules: A novel intracellular site for isoforms of the endothelin-converting enzyme. *Circ Res* 1998; 83:314-321.
- (85) Haynes WG, Strachan FE, Gray GA, Webb DJ. Forearm Vasoconstriction to Endothelin-1 Is Mediated by ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> Receptors In Vivo in Humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26:S40-S43.
- (86) Haynes WG, Strachan FE, Webb DJ. Endothelin ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> Receptors Cause Vasoconstriction of Human Resistance and Capacitance Vessels In Vivo. *Circulation* 1995; 92:357-363.

- (87) Deng Y, Martin LL, DelGrande D, Jeng AY. A soluble protease identified from rat kidney degrades endothelin-1 but not proendothelin-1. *J Biochem (Tokyo)* 1992; 112:168-172.
- (88) Vijayaraghavan J, Scicli AG, Carretero OA, Slaughter C, Moomaw C, Hersh LB. The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24,11 (enkephalinase). *J Biol Chem* 1990; 265:14150-14155.
- (89) Cyr C, Huebner K, Druck T, Kris R. Cloning and chromosomal localization of a human endothelin ETA receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181:184-190.
- (90) Arai H, Nakao K, Takaya K, Hosoda K, Ogawa Y, Nakanishi S, Imura H. The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *J Biol Chem* 1993; 268:3463-3470.
- (91) Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET<sub>C</sub> receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 1995; 268:19126-19133.
- (92) Ohlstein EH, Arleth A, Bryan H, Elliott JD, Sung CP. The selective endothelin ETA receptor antagonist BQ123 antagonizes endothelin-1-mediated mitogenesis. *Eur J Pharmacol* 1992; 225:347-350.
- (93) Bonvallet ST, Zamora MR, Hasunuma K, Sato K, Hanasato N, Anderson D, Stelzner TJ. BQ123, an ETA-receptor antagonist,

attenuates hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol* 1994; 266:H1327-H1331.

- (94) Oriji GK, Keiser HR. Role of calcium in endothelin-induced contractions and prostacyclin release. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996; 55:413-417.
- (95) Andrawis NS, Gilligan J, Abernethy DR. Endothelin-1-mediated vasoconstriction: specific blockade by verapamil. *Clin Pharmacol Ther* 1992; 52:583-589.
- (96) Zhang XF, Komuro T, Miwa S, Minowa T, Iwamuro Y, Okamoto Y, Ninomiya H, Sawamura T. Role of non-selective cation channels as  $Ca^{2+}$  entry pathway in endothelin-1-induced contraction and their suppression by nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 2001; 352:237-245.
- (97) Telemaque S, Gratton JP, Claing A, D'Orleans-Juste P. Endothelin-1 induces vasoconstriction and prostacyclin release via the activation of endothelin ETA receptors in the perfused rabbit kidney. *Eur J Pharmacol* 1993; 237:275-281.
- (98) D'Orleans-Juste P, Yano M, Telemaque S. ETA-dependent pressor effects and release of prostacyclin induced by endothelins in pulmonary and renal vasculature. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22:S235-S238.

- (99) Sakamoto A, Yanagisawa M, Sakurai M, Takuwa Y, Masaki T. Cloning and functional expression of human cDNA for the ET<sub>B</sub> endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178:656-663.
- (100) Dupuis J, Goresky CA, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ET<sub>B</sub> receptors. *J Appl Physiol* 1996; 81:1510-1515.
- (101) Fukuroda T, Fujikawa T, Osaki T, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M. Clearance of circulating endothelin-1 by ET<sub>B</sub> receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199:1461-1465.
- (102) Moreland S, McMullen DM, Delaney CL, Lee VG, Hunt JT. Venous smooth muscle contains vasoconstriction ET<sub>B</sub>-like receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 184:100-106.
- (103) McMurdo L, Corder R, Thiemermann C, Vane JR. Incomplete inhibition of the pressor effects of endothelin-1 and related peptides in the anaesthetized rat with BQ-123 provides evidence for more than one vasoconstrictor receptor. *Br J Pharmacol* 1993; 108:557-561.
- (104) Noguchi K, Noguchi Y, Hirose H, Nishikibe M, Ihara M, Ishikawa K, Yano M. Role of endothelin ET<sub>B</sub> receptors in bronchoconstrictor and vasoconstrictor responses in guinea-pigs. *Eur J Pharmacol* 1993; 233:47-51.

- (105) D'Orleans-Juste P, Claing A, Telemaque S, Maurice MC, Yano M, Gratton JP. Block of endothelin-1-induced release of thromboxane A2 from the guinea pig lung and nitric oxide from the rabbit kidney by selective ETB receptor antagonist, BQ-788. *Br J Pharmacol* 1994; 113:1257-1262.
- (106) Hirata Y, Yasuyuki T, Fukuda Y, Marumo F. Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1989; 78:225-228.
- (107) Kubo T, Ibusuki T, Chiba S, Kambe T, Fukumori R. Mitogen-activated protein kinase activity regulation role of angiotensin and endothelin systems in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 2001; 411:27-34.
- (108) Sugawara F, Ninomiya H, Okamoto Y, Miwa S, Mazda O, Katsura Y, Masaki T. Endothelin-1-induced mitogenic responses of chinese hamster ovary cells expressing human endothelin: the role of a wortmannin-sensitive signaling pathway. *Mol Pharmacol* 1996; 352:237-245.
- (109) Foschi M, Chari S, Dunn J, Sorokin A. Biphasic activation of p21ras by endothelin-1 sequentially activates the ERK cascade and phosphatidylinositol3-kinase. *EMBO J* 1997; 16:6439-6451.



- (110) Wang Y, Rose PM, Webb ML, Dunn MJ. Endothelins stimulate mitogen-activated protein kinase cascade through either ET<sub>A</sub> or ET<sub>B</sub>. *Am J Physiol* 1994; 267:C1130-C1135.
- (111) Davie N, Hallen SJ, Upton PD, Polak JM, Yacoub MH, Morrell NW, Wharton J. ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:398-405.
- (112) Salani D, Taraboletti G, Rosano L, DiCastro V, Borsotti P, Giavazzi R, Bagnato A. Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am J Pathol* 2000; 157:1703-1711.
- (113) Rizvi MAD, Katwa L, Spadone DP, Myers PR. The effects of endothelin-1 on collagen type I and type III synthesis in cultured porcine coronary artery vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28:243-252.
- (114) Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T. Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J Physiol* 1988; 255:H970-H973.
- (115) Pieske B, Beyermann B, Breu V, Loffler BM, Schlotthauer K, Maier L, Schmidt-Schweda S, Just H, Hasenfuss G. Functional effects of

endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium. *Circulation* 1999; 99:1802-1809.

- (116) Bogoyevitch MA, Glennon PE, Andersson MB, Clerk A, Lazou A, Marshall CJ, Parker PJ, Sugden PH. Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1994; 269:1110-1119.
- (117) Bogoyevitch MA, Ketterman AJ, Sugden PH. Cellular stresses differentially activate c-jun n-terminal protein kinases and extracellular signal-regulated protein kinase in cultured ventricular myocytes. *J Biol Chem* 1995; 270:29710-29717.
- (118) Ueyama T, Kawashima S, Sakoda T, Rikitake Y, Ishida T, Kawai M, Namiki M, Yokoyama M. Endothelin-1 activates p38 mitogen-activated protein kinase via endothelin-A receptor in rat myocardial cells. *Mol Cell Bio* 1999; 199:119-124.
- (119) Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R, Takano H, Yazaki Y. Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 1996; 271:3221-3228.
- (120) Guarda E, Katwa L, Myers PR, Tyagi SC, Weber KT. Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1993; 27:2130-2134.

- (121) Katwa LC, Guarda E, Weber KT. Endothelin receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1993; 27:2125-2129.
- (122) Hocher B, George I, Rebstock J, Bauch A, Schwarz A, Neumayer HH, Bauer C. Endothelin system-dependent cardiac remodeling in renovascular hypertension. *Hypertension* 1999; 33:816-822.
- (123) Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Cao WH, Kamada N. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 1994; 368:703-710.
- (124) Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H, Kuwaki T, Kumada M, Hammer RE, Yanagisawa M. Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* 1998; 125:813-824.
- (125) Kurihara Y, Kurihara H, Oda H, Maemura K, Nagai R, Ishikawa T, Yazaki Y. Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1. *J Clin Invest* 1995; 96:293-300.
- (126) Yanagisawa H, Yanagisawa M, Kapur RP, Richardson JA, Williams SC, Clouthier DE, de Wit D, Emoto N, Hammer RE. Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development* 1998; 125:825-836.

- (127) McMurray JJ, Ray SG, Abdullah I, Dargie HJ, Morton JJ. Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation* 1992; 85:1374-1379.
- (128) Saito Y, Nakao K, Mukoyama M, Imura H. Increased plasma endothelin level in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 322:205.
- (129) Schiffrin EL, Deng LY, Sventek P, Day R. Enhanced expression of endothelin-1 gene in resistance arteries in severe human essential hypertension. *Hypertension* 1997; 15:57-63.
- (130) Lerman A, Edwards BS, Hallet JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 1991; 325:997-1001.
- (131) Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* 1991; 114:464-469.
- (132) Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy RD, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 328:1732-1739.
- (133) Cody RJ, Haas GJ, Binkley PF, Capers Q, Kelley R. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in

patients with chronic congestive heart failure. *Circulation* 1992; 85:504-509.

- (134) Douglas SA, Loudon C, Vickery-Clark LM, Storer BL, Hart T, Feuerstein GZ, Elliott JD, Ohlstein EH. A role for endogenous endothelin-1 in neointimal formation after rat carotid artery balloon angioplasty. Protective effects of the novel nonpeptide endothelin receptor antagonist SB 209670. *Circ Res* 1994; 75:190-197.
- (135) Kojima M, Kusumoto K, Fujiwara S, Watanabe T, Fujino M. Role of endogenous endothelin in the extension of myocardial infarct size studied with the endothelin receptor antagonist, TAK-044. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26:S365-S368.
- (136) Nelson JB, Chan-Tack K, Hedican SP, Magnuson SR, Opgenorth TJ, Bova GS, Simons JW. Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer. *Cancer Res* 1996; 56:663-668.
- (137) Margulies KB, Hildebrand FLJ, Lerman A, Perrella MA, Burnett JCJ. Increased endothelin in experimental heart failure. *Circulation* 1990; 82:2226-2230.
- (138) Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, Kasuya Y, Ihara M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. Endogenous endothelin-1 participates in the maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure:

Marked increase in endothelin production in the failing heart. *Circulation* 1996; 93:1214-1222.

- (139) Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CGA, Brandt RR, Wright S, Heublein DM, Kao PC, Edwards WD, Burnett JC. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* 1994; 89:1580-1586.
- (140) Omland T, Terje Lie R, Aakvaag A, Aarsland T, Dickstein K. Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction. *Circulation* 1994; 89:1573-1579.
- (141) Hulsmann M, Stanek B, Frey B, Sturm B, Putz D, Kos T, Berger R, Woloszczuk W, Maurer G, Pacher R. Value of cardiopulmonary exercise testing and big endothelin plasma levels to predict short-term prognosis of patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:1695-1700.
- (142) Haug C, Koenig W, Hoeher M, Kochs M, Hombach V, Gruenert A, Osterhues H. Direct enzyme immunometric measurement of plasma big endothelin-1 concentrations and correlation with indicators of left ventricular function. *Clin chem* 1998; 44:239-243.
- (143) Boarder MR, Marriott DB. Characterization of endothelin-1 stimulation of catecholamine release from adrenal chromaffin cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13:S223-S224.

- (144) Kawaguchi H, Sawa H, Yasuda H. Endothelin stimulates angiotensin I to angiotensin II conversion in cultured pulmonary artery endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 1990; 22:839-842.
- (145) Ding SS, Qiu C, Hess P, Clozel JP, Clozel M. Chronic endothelin receptor blockade prevents renal vasoconstriction and sodium retention in rats with chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 2002; 53:963-970.
- (146) Mulder P, Richard V, Derumeaux G, Hogie M, Henry JP, Lallemand F, Compagnon P, Mace B, Comoy E, Letac B, Thuillez C. Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: Effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation* 1997; 96:1976-1982.
- (147) Mulder P, Richard V, Bouchart F, Derumeaux G, Munter K, Thuillez C. Selective ET<sub>A</sub> receptor blockade prevents left ventricular remodeling and deterioration of cardiac function in experimental heart failure. *Cardiovasc Res* 1998; 39:600-608.
- (148) Moe GW, Albernaz A, Naik GO, Kirchengast M, Stewart DJ. Beneficial effects of long-term selective endothelin type A receptor blockade in canine experimental heart failure. *Cardiovasc Res* 1998; 39:571-579.

- (149) Sutsch G, Bertel O, Kiowski W. Acute and short-term effects of the nonpeptide endothelin-1 receptor antagonist Bosentan in humans. *Cardiovasc Drugs Therapy* 1996; 10:717-725.
- (150) Cowburn PJ, Cleland JGF, McArthur JD, MacLean MR, McMurray JJV, Dargie HJ. Short-term haemodynamic effects of BQ-123, a selective endothelin ET<sub>A</sub>-receptor antagonist, in chronic heart failure. *The Lancet* 1998; 352:201-202.
- (151) Sutsch G, Kiowski W, Yan XW, Hunziker P, Christen S, Strobel W, Kim JH, Rickenbacher P, Bertel O. Short-term oral endothelin-receptor antagonist therapy in conventionally treated patients with symptomatic severe chronic heart failure. *Circulation* 1998; 98:2262-2268.
- (152) Spieker LE, Mitrovic V, Noll G, Pacher R, Schulze MR, Muntwyler J, Schalcher C, Kiowski W, Luscher TF. Acute hemodynamic and neurohumoral effects of selective ET<sub>A</sub> receptor blockade in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35:1745-1752.
- (153) Schalcher C, Cotter G, Reisin L, Bertel O, Kobrin I, Guyene TT, Kiowski W. The dual endothelin receptor antagonist tezosentan acutely improves hemodynamic parameters in patients with advanced heart failure. *Am Heart J* 2001; 142:340-349.
- (154) Packer M, Caspi A, Charlon V, Cohen-Solal A, Kiowski W, Kostuk W, Krum H, Levine B, Massie B, McMurray JJ, Rizzon P, Swedberg K.



Multicenter, double-blind, placebo-controlled study of long-term endothelin blockade with bosentan in chronic heart failure-Results of the REACH-1 trial. *Circulation* 1998; 98:1-3 (abs.12).

- (155) Krum H, Charlon V, Widmann T, Packer M. Long-term, open-label experience with an endothelin receptor antagonist, bosentan, in patients with severe chronic heart failure. *Circulation* 1999; 100:1-646 (abs.3408).
- (156) Kalra PR, Moon JC, Coats AJ. Do results of the ENABLE (Endothelin Antagonist Bosentan for Lowering Cardiac Events in Heart Failure) study spell the end for non-selective endothelin antagonism in heart failure? *Int J Cardiol* 2002; 85:195-197.
- (157) Lariviere R, Day R, Schiffrin EL. Increased expression of endothelin-1 gene in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension* 1993; 21:916-920.
- (158) Li JS, Lariviere R, Schiffrin EL. Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. *Hypertension* 1994; 24:183-188.
- (159) D'Uscio LV, Barton M, Shaw S, Moreau P, Luscher TF. Structure and function of small arteries in salt-induced hypertension: Effects of

chronic endothelin-subtype-A-receptor blockade. *Hypertension* 1997; 30:905-911.

- (160) Sventek P, Turgeon A, Garcia R, Schiffrin EL. Vascular and cardiac overexpression of endothelin-1 gene in one-kidney, one clip Goldblatt hypertensive rats but only in the late phase of two-kidney one clip Golblatt hypertension. *J Hypertens* 1996; 14:57-64.
- (161) Lariviere R, Thibault G, Schiffrin EL. Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive but not in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1993; 21:294-300.
- (162) Li JS, Schiffrin EL. Effect of chronic treatment of adult spontaneously hypertensive rats with an endothelin receptor antagonist. *Hypertension* 1995; 25:495-500.
- (163) Miyauchi T, Ishikawa T, Tomobe Y, Yanagisawa M, Kimura J, Sugishita Y, Ito S, Goto K, Masaki T. Characteristics of pressor response to endothelin in spontaneously hypertensive and wistar-kyoto rats. *Hypertension* 1989; 14:427-434.
- (164) Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Sudano I, Notari M, Salvetti A. Vasoconstriction to endogenous endothelin-1 is increased in the peripheral circulation of patients with essential hypertension. *Circulation* 1999; 100:1680-1683.

- (165) Cardillo C, Campia U, Kilcoyne CM, Bryant MB, Panza JA. Improved endothelium-dependent vasodilation after blockade of endothelin receptors in patients with essential hypertension. *Circulation* 2002; 105:452-456.
- (166) Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1998; 338:784-790.
- (167) Miyauchi T, Sugishita Y, Matsuda M, Sakai H, Suzuki N, Masaki T, Goto K. Increased plasma concentration of endothelin-1 in cholesterol-fed rats. *Atherosclerosis* 1992; 93:257-259.
- (168) Iwasa S, Fan J, Shimokama T, Nagata M, Watanabe T. Increased immunoreactivity of endothelin-1 and endothelin B receptor in human atherosclerotic lesions. A possible role in atherogenesis. *Atherosclerosis* 1999; 146:93-100.
- (169) Minamino T, Kurihara H, Takahashi M, Shimada K, Maemura K, Oda H, Ishikawa T, Uchiyama T, Tanzawa K, Yazaki Y. Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis. *Circulation* 1997; 95:221-230.
- (170) Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AWA, Werner A, Luscher TF. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and

release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res* 1992; 70:1191-1197.

- (171) Achmad TH, Rao GS. Chemotaxis of human blood monocytes toward endothelin-1 and the influence of calcium channels blockers. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189:994-1000.
- (172) McCarron RM, Wang L, Stanimirovic DB, Spatz M. Endothelin induction of adhesion molecule expression on human brain microvascular endothelial cells. *Neurosci Lett* 1993; 156:31-34.
- (173) Kowala MC, Rose PM, Stein PD, Goller N, Recce R, Beyer S, Valentine M, Barton D, Durham SK. Selective blockade of the endothelin subtype A receptor decreases early atherosclerosis in hamsters fed cholesterol. *Am J Pathol* 1995; 146:819-826.
- (174) Barton M, Haudenschild CC, D'Uscio LV, Shaw S, Munter K, Luscher TF. endothelin ET<sub>A</sub> receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:14367-14372.
- (175) Yorikane R, Miyauchi T, Sakai S, Sakurai T, Yamaguchi I, Sugishita Y, Goto K. Altered expression of ETB-receptor mRNA in the lung of rats with pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22:S336-S338.

- (176) Frasch HF, Marshall C, Marshall BE. Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1999; 276:L304-L310.
- (177) Li H, Elton TS, Chen YF, Oparil S. Increased endothelin receptor gene expression in hypoxic rat lung. *Am J Physiol* 1994; 266:L553-L560.
- (178) Li H, Chen SJ, Chen YF, Meng QC, Durand J, Oparil S, Elton TS. Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. *J Appl Physiol* 1994; 77:1451-1459.
- (179) Kobayashi T, Miyauchi T, Sakai S, Maeda S, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. Down-regulation of ET(B) receptor, but not ET(A) receptor, in congestive lung secondary to heart failure. Are marked increases in circulating endothelin-1 partly attributable to decreases in lung ET(B) receptor-mediated clearance of endothelin-1? *Life Sci* 1998; 62:185-193.
- (180) Rosenberg AA, Kennaugh J, Koppenhafer SL, Loomis M, Chatfield BA, Abman SH. Elevated immunoreactive endothelin-1 levels in newborn infants with persistent pulmonary hypertension. *J Pediatr* 1993; 123:109-114.
- (181) Goerre S, Wenk M, Bartsch P, Luscher TF, Niroomand F, Hohenhaus E, Oelz O, Reinhart WH. Endothelin-1 in pulmonary hypertension associated with high-altitude exposure. *Circulation* 1995; 91:359-364.

- (182) Ivy DD, Le Cras TD, Horan MP, Abman SH. Increased lung preproET-1 and decreased ETB-receptor gene expression in fetal pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1998; 274:L535-L541.
- (183) Celik G, Karabiyikoglu G. Local and peripheral plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension secondary to chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 1998; 65:289-294.
- (184) Dupuis J, Cernacek P, Tardif JC, Stewart DJ, Gosselin G, Dyrda I, Bonan R, Crepeau J. Reduced pulmonary clearance of endothelin-1 in pulmonary hypertension. *Am Heart J* 1998; 135:614-620.
- (185) Bauer M, Wilkens H, Langer F, Schneider SO, Lausberg H, Schafers HF. Selective upregulation of endothelin B receptor gene expression in severe pulmonary hypertension. *Circulation* 2002; 105:1034-1036.
- (186) Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski HD, Schultheiss HP, Hoeffken G. Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest* 2001; 120:1562-1569.
- (187) Takahashi H, Soma S, Muramatsu M, Oka M, Fukuchi Y. Upregulation of ET-1 and its receptors and remodeling in small pulmonary veins under hypoxic conditions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280:L1104-L1114.

- (188) Soma S, Takahashi H, Muramatsu M, Oka M, Fukuchi Y. Localization and distribution of endothelin receptor subtypes in pulmonary vasculature of normal and hypoxia-exposed rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:620-630.
- (189) Kuc RE, Davenport AP. Endothelin-A-receptors in human aorta and pulmonary arteries are downregulated in patients with cardiovascular disease: an adaptative response to increases levels of endothelin-1? *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36:S377-S379.
- (190) Ueno M, Miyauchi T, Sakai S, Kobayashi T, Goto K, Yamaguchi I. Effects of physiological or pathological pressure load in vivo on myocardial expression of ET-1 and receptors. *Am J Physiol* 1999; 277:R1321-R1330.
- (191) DiCarlo VS, Chen SJ, Meng QC, Durand J, Yano M, Chen YF, Oparil S. ET<sub>A</sub>-receptor antagonist prevents and reverses chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rat. *Am J Physiol* 1995; 269:L690-L697.
- (192) Chen SJ, Chen YF, Meng QC, Durand J, DiCarlo VS, Oparil S. Endothelin-receptor antagonist bosentan prevents and reverses hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol* 1995; 79:2122-2131.

- (193) Prie S, Leung TK, Ryan JW, Dupuis J. The orally active ET<sub>A</sub> receptor antagonist (+)-(S)-2-(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-yloxy)-3-methoxy-3,3-diphenyl-propionic acid (LU 135252) prevents the development of pulmonary hypertension and endothelial metabolic dysfunction in monocrotaline-treated rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282:1312-1318.
- (194) Dupuis J, Prie S. The ET(A)-receptor antagonist LU135252 prevents the progression of established pulmonary hypertension induced by monocrotaline in rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 1999; 4:33-39.
- (195) Hill N, Warburton RR, Pietras L, Klinger J. Nonspecific endothelin-receptor antagonist blunts monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol* 1997; 83:1209-1215.
- (196) Lucas M, Jasmin JF, Dupuis J. Effect of ET(A) receptor antagonist on pulmonary hypertension and vascular reactivity in rats with congestive heart failure. *Pulm Pharmacol Ther* 2001; 14:307-314.
- (197) Ambalavanan N, Phillips III JA, Bulger A, Oparil S, Chen YF. Endothelin-A receptor blockade in porcine pulmonary hypertension. *Pediatr Res* 2002; 52:913-921.
- (198) Coe Y, Hallen SJ, Welch KM, Liu YA, Coceani F. The endothelin A receptor antagonists PD 156707 (CI-1020) and PD 180988 (CI-1034)



reverse the hypoxic pulmonary vasoconstriction in the perinatal lamb. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302:-672.

- (199) Joffs C, Walker CA, Hendrick JW, Fary DJ, Almany DK, Davis JN, Goldberg AT, Crawford FA, Spinale FG. Endothelin receptor subtype A blockade selectively reduces pulmonary pressure after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 122:365-370.
- (200) Tanus-Santos JE, Gordo WM, Udelsmann A, Cittadino MH, Moreno H Jr. Nonselective endothelin-receptor antagonism attenuates hemodynamic changes after massive pulmonary air embolism in dogs. *Chest* 2000; 118:175-179.
- (201) Wanecek M, Oldner A, Rudehill A, Sollevi A, Alving K, Weitzberg E. Endothelin(A)-receptor antagonism attenuates pulmonary hypertension in porcine endotoxin shock. *Eur Respir J* 1999; 13:145-151.
- (202) Huntington K, Picard P, Moe GW, Stewart DJ, Albernaz A, Monge JC. Increased cardiac and pulmonary endothelin-1 mRNA expression in canine pacing-induced heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31:S424-S426.
- (203) Okada Mo, Yamashita C, Okada Ma, Okada K. Role of endothelin-1 in beagles with dehydromonocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 1995; 92:114-119.

- (204) Givertz MM, Colucci WS, LeJemtel TH, Gottlieb SS, Hare JM, Slawsky MT, Leier CV, Loh E, Nicklas JM, Lewis BE. Acute endothelin A receptor blockade causes selective pulmonary vasodilation in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2000; 101:2922-2927.
- (205) Williamson DJ, Wallman LL, Jones R, Keogh AM, Scroope F, Penny R, Weber C, Macdonald PS. Hemodynamic effects of bosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with pulmonary hypertension. *Circulation* 2000; 102:411-418.
- (206) Barst RJ, Rich S, Widlitz A, Horn EM, McLaughlin VV, McFarlin J. Clinical efficacy of sitaxsentan, an endothelin-A receptor antagonist, in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2002; 121:1860-1868.
- (207) Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh AM, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346:896-903.
- (208) Burke SE, Lubbers NL, Gagne GD, Wessale JL, Dayton BD, Wegner CD, Opgenorth TJ. Selective antagonism of the ET(A) receptor reduces neointimal hyperplasia after balloon-induced vascular injury in pigs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 30:33-41.

- (209) McKenna CJ, Burke SE, Opgenorth TJ, Padley R, Camrud LJ, Camrud AR, Johnson J, Carlson PJ, Lerman A, Holmes DR, Schwartz RS. Selective ET(A) receptor antagonism reduces neointimal hyperplasia in a porcine coronary stent model. *Circulation* 1998; 97:2551-2556.
- (210) Brunner F, Opie LH. Role of endothelin-A receptors in ischemic contracture and reperfusion injury. *Circulation* 1998; 97:391-398.
- (211) Galiuto L, DeMaria AN, del Balzo U, May-Newman K, Flaim SF, Wolf PL, Kirchengast M, Iliceto S. Ischemia-reperfusion injury at the microvascular level: treatment by endothelin A-selective antagonist and evaluation by myocardial contrast echocardiography. *Circulation* 2000; 102:3111-3116.
- (212) Gourine AV, Gonon AT, Pernow J. Involvement of nitric oxide in cardioprotective effect of endothelin receptor antagonist during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H1105-H1112.
- (213) Weyrich AS, Ma XL, Lefer AM. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation* 1992; 86:279-288.
- (214) Kurzelewski M, Czarnowska E, Beresewicz A. Endothelin in the mechanism of endothelial injury and neutrophil adhesion in the post-ischemic guinea-pig heart. *Eur J Pharmacol* 2002; 434:95-107.

- (215) Nakamura T, Ebihara I, Fukui M, Tomino Y, Koide H. Effect of a specific endothelin receptor A antagonist on mRNA levels for extracellular matrix components and growth factors in diabetic glomeruli. *Diabetes* 1995; 44:895-899.
- (216) Benigni A, Colosio V, Brena C, Bruzzi I, Bertani T, Remuzzi G. Unselective inhibition of endothelin receptors reduces renal dysfunction in experimental diabetes. *Diabetes* 1998; 47:450-456.
- (217) Hocher B, Lun A, Priem F, Neumayer HH, Raschack M. Renal endothelin system in diabetes: comparison of angiotensin-converting enzyme inhibition and endothelin-A antagonism. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31:S492-S495.
- (218) Takagi C, Bursell SE, Lin YW, Takagi H, Duh E, Jiang Z, Clermont AC, King GL. Regulation of retinal hemodynamics in diabetic rats by increased expression and action of endothelin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37:2504-2518.
- (219) Deng D, Evans TW, Mukherjee K, Downey D, Chakrabarti S. Diabetes-induced vascular dysfunction in the retina: role of endothelins. *Diabetologia* 1999; 42:1228-1234.
- (220) Gilbert RE, Rumble JR, Cao Z, Cox AJ, van Eeden P, Allen TJ, Kelly DJ, Cooper ME. Endothelin receptor antagonism ameliorates mast cell

infiltration, vascular hypertrophy, and epidermal growth factor expression in experimental diabetes. *Circ Res* 2000; 86:158-165.

- (221) Cameron NE, Cotter MA. Effects of a nonpeptide endothelin-1 ETA antagonist on neurovascular function in diabetic rats: interaction with the renin-angiotensin system. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 278:1262-1268.
- (222) Balsiger B, Rickenbacher A, Boden PJ, Biecker E, Tsui J, Dashwood M, Reichen J, Shaw SG. Endothelin A-receptor blockade in experimental diabetes improves glucose balance and gastrointestinal function. *Clin Sci (Lond)* 2002; 103:430S-433S.
- (223) Bagnato A, Cirilli A, Salani D, Simeone P, Muller A, Nicotra MR, Natali PG, Venuti A. Growth inhibition of cervix carcinoma cells in vivo by endothelin A receptor blockade. *Cancer Res* 2002; 62:6381-6384.
- (224) Lahav R, Heffner G, Patterson PH. An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:11496-11500.
- (225) Ali H, Loizidou M, Dashwood M, Savage F, Sheard C, Taylor I. Stimulation of colorectal cancer cell line growth by ET-1 and its inhibition by ET(A) antagonists. *Gut* 2000; 47:685-688.

- (226) Salani D, Rosano L, Di Castro V, Spinella F, Venuti A, Padley RJ, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. ABT-627, a potent endothelin receptor A antagonist, inhibits ovarian carcinoma growth in vitro. *Clin Sci* 2002; 103:318S-321S.
- (227) Venuti A, Salani D, Cirilli A, Simeone P, Muller A, Flamini S, Padley R, Bagnato A. Endothelin receptor blockade inhibits the growth of human papillomavirus-associated cervical carcinoma. *Clin Sci* 2002; 103:310S-313S.
- (228) Asbert M, Gines A, Gines P, Jimenez W, Claria J, Salo J, Arroyo V, Rivera F, Rodes J. Circulating levels of endothelin in cirrhosis. *Gastroenterology* 1993; 104:1485-1491.
- (229) Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, Tosti-Guerra C, Maggi M, Failli P, Ruocco C, Gentilini P. Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1996; 110:534-548.
- (230) Suzuki R, Masaoka H, Hirata Y, Marumo F, Isotani E, Hirakawa K. The role of endothelin-1 in the origin of cerebral vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 1992; 77:96-100.
- (231) Springall DR, Howarth PH, Counihan H, Djukanovic R, Holgate ST, Polak JM. Endothelin immunoreactivity of airway epithelium in asthmatic patients. *Lancet* 1991; 337:697-701.

- (232) Trakada G, Tsourapis S, Marangos M, Spiropoulos K. Arterial and bronchoalveolar lavage fluid endothelin-1 concentration in asthma. *Respir Med* 2000; 94:992-996.
- (233) Warrens AN, Cassidy MJ, Takahashi K, Ghatei MA, Bloom SR. Endothelin in renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1990; 5:418-422.
- (234) Saito Y, Kazuma N, Shirakami G, Mukoyama M, Arai H, Hosoda K, Suga S, Ogawa Y, Imura H. Endothelin in patients with chronic renal failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17:S437-S439.
- (235) Anselmi K, Subbotin VM, Nemoto E, Gandhi CR. Accelerated reversal of carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats by the endothelin receptor antagonist TAK-044. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17:589-597.
- (236) Nirei H, Hamada K, Shoubo M, Sogabe K, Notsu Y, Ono T. An endothelin ETA receptor antagonist, FR139317, ameliorates cerebral vasospasm in dogs. *Life Sci* 1993; 52:1869-1874.
- (237) Kwan AL, Bavbek M, Jeng AY, Maniara W, Toyoda T, Lappe RW, Kassell NF, Lee KS. Prevention and reversal of cerebral vasospasm by an endothelin-converting enzyme inhibitor, CGS 26303, in an experimental model of subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 1997; 87:281-286.

- (238) Gosselin M, Goulet S, Wu-Wong JR, Wessale JL, Opgenorth TJ, Boulet LP, Battistini B. Effects of a selective ET(A)-receptor antagonist, atrasentan (ABT-627), in murine models of allergic asthma: demonstration of mouse strain specificity. *Clin Sci (Lond)* 2002; 103:367S-370S.
- (239) Gellai M, Jugus M, Fletcher T, DeWolf R, Nambi P. Reversal of postischemic acute renal failure with a selective endothelin A receptor antagonist in the rat. *J Clin Invest* 1994; 93:900-906.
- (240) Rich S. Executive summary from the world symposium on primary pulmonary hypertension. [www.who.int/ncd/cvd/pph.html](http://www.who.int/ncd/cvd/pph.html) 1998.
- (241) McDonnell PJ, Toney PA, Hutchins GM. Primary pulmonary hypertension and cirrhosis: are they related? *Am Rev Respir Dis* 1983; 127:437-441.
- (242) Nichols WC, Koller DL, Slovis B, Foroud T, Terry VH, Arnold ND, Siemienak DR, Wheeler L, Phillips III JA, Newman JH, Conneally PM, Ginsburg D, Loyd JE. Localization of the gene for familial primary pulmonary hypertension to chromosome 2q31-32. *Nat Genet* 1997; 15:277-280.
- (243) Loyd JE, Butler MF, Foroud T, Conneally PM, Phillips III JA, Newman JH. Genetic anticipation and abnormal gender ratio at birth in familial



primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:93-97.

- (244) Newman JH, Wheeler L, Lane KB, Loyd E, Gaddipati R, Phillips III JA, Loyd JE. Mutation in the gene for bone morphogenetic protein receptor II as a cause of primary pulmonary hypertension in a large kindred. *N Engl J Med* 2001; 345:319-324.
- (245) Chazova I, Loyd JE, Zhdanov VS, Newman JH, Belenkov Y, Meyrick B. Pulmonary artery adventitial changes and venous involvement in primary pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 1995; 146:389-397.
- (246) Archer S, Rich S. Primary pulmonary hypertension: A vascular biology and translational research "work in progress". *Circulation* 2000; 102:2781-2791.
- (247) Lee SD, Shroyer KR, Markham NE, Cool CD, Voelkel NF, Tuder RM. Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 1998; 101:927-934.
- (248) Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992; 327:70-75.

- (249) Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995; 333:214-221.
- (250) Archer SL, Djaballah K, Humbert M, Weir KE, Fartoukh M, Dall'ava-Santucci J, Mercier JC, Simonneau G, Dinh-Xuan AT. Nitric oxide deficiency in fenfluramine- and dexfenfluramine-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1061-1067.
- (251) Forrest IA, Small T, Corris PA. Effect of nebulized epoprostenol (prostacyclin) on exhaled nitric oxide in patients with pulmonary hypertension due to congenital heart disease and in normal controls. *Clin Sci* 1999; 97:99-102.
- (252) Herve P, Launay JM, Scrobahaci ML, Brenot F, Simonneau G, Petitpretz P, Poubeau P, Cerrina J, Duroux P, Drouet L. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med* 1995; 99:249-254.
- (253) Du L, Sullivan CC, Chu D, Cho AJ, Kido M, Wolf PL, Yuan JX, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2003; 348:500-509.
- (254) Jones PL, Crack J, Rabinovitch M. Regulation of tenascin-C, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the alpha

v beta 3 integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth. *J Cell Biol* 1997; 139:279-293.

- (255) Thompson K, Rabinovitch M. Exogenous leukocyte and endogenous elastases can mediate mitogenic activity in pulmonary artery smooth muscle cells by release of extracellular-matrix bound basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 1996; 166:495-505.
- (256) Cowan KN, Heilbut A, Humpl T, Lam C, Ito S, Rabinovitch M. Complete reversal of fatal pulmonary hypertension in rats by a serine elastase inhibitor. *Nat Med* 2000; 6:698-702.
- (257) Cowan KN, Jones PL, Rabinovitch M. Elastase and matrix metalloproteinase inhibitors induce regression, and tenascin-C antisense prevents progression, of vascular disease. *J Clin Invest* 2000; 105:21-34.
- (258) Yuan JX, Wang J, Juhaszova M, Gaine SP, Rubin LJ. Attenuated K<sup>+</sup> channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. *The Lancet* 1998; 351:726-727.
- (259) Yuan JX, Aldinger AM, Juhaszove M, Wang J, Conte JV, Gaine SP, Orens JB, Rubin LJ. Dysfunctional voltage-gated K<sup>+</sup> channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 1998; 98:1400-1406.

- (260) Muraki S, Tohse N, Seki S, Nagashima M, Yamada Y, Abe T, Yabu H. Decrease in the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current of pulmonary arterial smooth muscle in pulmonary hypertension rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001; 364:183-192.
- (261) Sato K, Morio Y, Morris KG, Rodman DM, McMurtry IF. Mechanism of hypoxic pulmonary vasoconstriction involves ET(A) receptor-mediated inhibition of K(ATP) channel. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278:L434-L442.
- (262) D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* 1991; 115:343-349.
- (263) Rich S, Seidlitz M, Dodin E, Osimani D, Judd D, Genthner DE, McLaughlin VV, Francis G. The short-term effects of digoxin in patients with right ventricular dysfunction from pulmonary hypertension. *Chest* 1998; 114:787-792.
- (264) Molteni A, Ward WF, Tsao CH, Solliday NH, Dunne M. Monocrotaline-induced pulmonary fibrosis in rats: amelioration by captopril and penicillamine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1985; 180:112-120.
- (265) Molteni A, Ward WF, Tsao CH, Solliday NH. Monocrotaline-induced cardiopulmonary injury in rats: modification by the nonthiol ACE

inhibitors CGS13945 and CGS16617. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1988; 291:21-40.

- (266) van Suylen RJ, Smits JF, Daemen MJ. Pulmonary artery remodeling differs in hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1423-1428.
- (267) Leier CV, Bambach D, Nelson S, Hermiller JB, Huss P, Magorien RD, Unverferth DV. Captopril in primary pulmonary hypertension. *Circulation* 1983; 67:155-161.
- (268) Rich S, Brundage BH. High-dose calcium channel-blocking therapy for primary pulmonary hypertension: evidence for long-term reduction in pulmonary arterial pressure and regression of right ventricular hypertrophy. *Circulation* 1987; 76:135-141.
- (269) Rich S, Kaufmann E, Levy PS. The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992; 327:76-81.
- (270) Packer M, Medina N, Yushak M. Adverse hemodynamic and clinical effects of calcium channel blockade in pulmonary hypertension secondary to obliterative pulmonary vascular disease. *J Am Coll Cardiol* 1984; 4:890-901.

- (271) Fuster V, Steele PM, Edwards WD, Gersh BJ, McGoon MD, Frye RL. Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis. *Circulation* 1984; 70:580-587.
- (272) Frank H, Mlczoch J, Huber K, Schuster E, Gurtner HP, Kneussl M. The effect of anticoagulant therapy in primary and anorectic drug-induced pulmonary hypertension. *Chest* 1997; 112:714--721.
- (273) Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, Groves BM, Tapson VF, Bourge R, Brundage BH, Koerner SK, Langleben D, Keller CA, Murali S, Uretsky BF, Clayton LM, Jobsis MM, Blackburn SD, Shortino D, Crow JW. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1996; 334:296-301.
- (274) Shapiro SM, Oudiz RJ, Cao T, Romano MA, Beckman J, Georgiou D, Mandayam S, Ginzton LE, Brundage BH. Primary pulmonary hypertension: Improved long-term effects and survival with continuous intravenous epoprostenol infusion. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:343-349.
- (275) Langleben D, Barst RJ, Badesch DB, Groves BM, Tapson VF, Murali S, Bourge R, Ettinger N, Shalit E, Clayton LM, Jobsis MM, Blackburn SD, Crow JW, Stewart DJ, Long W. Continuous infusion of epoprostenol improves the net balance between pulmonary endothelin-

- 1 clearance and release in primary pulmonary hypertension. *Circulation* 1999; 99:3266-3271.
- (276) Ziesche R, Petkov V, Wittman K, Kopatschka J, Stiebellehner L, Schenk P, Germann P, Roder G, Ullrich R, Block LH. Treatment with epoprostenol reverts nitric oxide non-responsiveness in patients with primary pulmonary hypertension. *Heart* 2000; 83:406-409.
- (277) Kesten S, Dainauskas J, McLaughlin VV, Rich S. Development of nonspecific interstitial pneumonitis associated with long-term treatment of primary pulmonary hypertension with prostacyclin. *Chest* 1999; 116:566-569.
- (278) Rich S, McLaughlin VV. The effects of chronic prostacyclin therapy on cardiac output and symptoms in primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:1184-1187.
- (279) Hoeper MM, Schwarze M, Ehlerding S, Adler-Schuermeyer A, Speikerkoetter E, Niedermeyer J, Hamm M, Fabel H. Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with aerosolized iloprost, a prostacyclin analogue. *N Engl J Med* 2000; 342:1866-1870.
- (280) Simonneau G, Barst RJ, Galie N, Naeije R, Rich S, Bourge R, Keogh A, Oudiz RJ, Frost A, Blackburn SD, Crow JW, Rubin LJ. Continuous subcutaneous infusion of treprostinil, a prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a double-blind,

randomized, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:800-804.

- (281) No authors. Pulmonary hypertension. *JAMA* 2002; 288:36.
- (282) Vizza CD, Sciomer S, Morelli S, Lavalle C, Di Marzio P, Padovani D, Badagliacca R, Vestri AR, Naeije R, Fedele F. Long term treatment of pulmonary arterial hypertension with beraprost, an oral prostacyclin analogue. *Heart* 2001; 86:661-665.
- (283) Nagaya N, Uematsu M, Okano Y, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Nakanishi N, Miyatake K, Kunieda T. Effect of orally active prostacyclin analogue on survival of outpatients with primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:1188-1192.
- (284) Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Vizza CD, Kneussl M, Manes A, Sitbon O, Torbicki A, Delcroix M, Naeije R, Hoeper MM, Chaouat A, Morand S, Besse B, Simonneau G. Effects of beraprost sodium, an oral prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:1496-1502.
- (285) Ricciardi MJ, Knight BP, Martinez FJ, Rubenfire M. Inhaled nitric oxide in primary pulmonary hypertension: a safe and effective agent for predicting response to nifedipine. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:1068-1073.



- (286) Perez-Penate G, Julia-Serda G, Pulido-Duque JM, Gorriz-Gomez E, Cabrera-Navarro P. One-Year continuous inhaled nitric oxide for primary pulmonary hypertension. *Chest* 2001; 119:970-973.
- (287) Gerlach H, Pappert D, Lewandowski K, Rossaint R, Falke KJ. Long-term inhalation with evaluated low doses of nitric oxide for selective improvement of oxygenation in patients with adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 1993; 19:443-449.
- (288) Prasad S, Wilkinson J, Gatzoulis MA. Sildenafil in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2000; 343:1342.
- (289) Abrams D, Schulze-Neick I, Magee AG. Sildenafil as a selective pulmonary vasodilator in childhood primary pulmonary hypertension. *Heart* 2000; 84:e4.
- (290) Arcasoy SM, Kotloff R. Lung transplantation. *N Engl J Med* 1999; 340:1081-1091.
- (291) Griffith BP, Hardesty RL, Armitage JM, Hattler BG, Pham SM, Keenan RJ, Paradis I. A decade of lung transplantation. *Ann Surg* 1993; 218:310-320.
- (292) Kerstein D, Levy PS, Hsu DT, Hordof AJ, Gersony WM, Barst RJ. Blade balloon atrial septostomy in patients with severe primary pulmonary hypertension. *Circulation* 1995; 91:2028-2035.

- (293) Sandoval J, Gaspar J, Pulido T, Bautista E, Martinez-Guerra ML, Zeballos M, Palomar A, Gomez A. Graded balloon dilation atrial septostomy in severe primary pulmonary hypertension. A therapeutic alternative for patients nonresponsive to vasodilator treatment. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:297-304.
- (294) Nagaya N, Yokoyama C, Kyotani S, Shimonishi M, Morishita R, Uematsu M, Nishikimi T, Nakanishi N, Ogihara T, Yamagishi M, Miyatake K, Kaneda Y, Tanabe T. Gene transfer of human prostacyclin synthase ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation* 2000; 102:2005-2010.
- (295) Campbell AIM, Zhao Y, Sandhu R, Stewart DJ. Cell-based gene transfer of vascular endothelial growth factor attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2001; 104:2242-2248.
- (296) Ueno M, Miyauchi T, Sakai S, Yamaguchi-Kohno R, Goto K, Yamaguchi I. A combination of oral endothelin-A receptor antagonist and oral prostacyclin analogue is superior to each drug alone in ameliorating pulmonary hypertension in rats. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:175-181.
- (297) Wilkens H, Guth A, Konig J, Forestier N, Cremers B, Hennen B, Bohm M, Sybrecht GW. Effect of inhaled iloprost plus oral sildenafil in

- patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 2001; 104:1218-1222.
- (298) Nishimura T, Faul JL, Berry GJ, Vaszar LT, Qiu D, Pearl RG, Kao PN. Simvastatin attenuates smooth muscle neointimal proliferation and pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:1403-1408.
- (299) Meyrick B, Reid L. The effect of continued hypoxia on rat pulmonary arterial circulation. An ultrastructural study. *Lab Invest* 1978; 38:188-200.
- (300) Herget J, Sugget AJ, Leach E, Barer GR. Resolution of pulmonary hypertension and other features induced by chronic hypoxia in rats during complete and intermittent normoxia. *Thorax* 1978; 33:468-473.
- (301) Meyrick B, Reid L. Hypoxia-induced structural changes in the media and adventitia of the rat hilar pulmonary artery and their regression. *Am J Pathol* 1980; 100:151-178.
- (302) Kay JM. Effect of intermittent normoxia on chronic hypoxic pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy, and polycythemia in rats. *Am Rev Respir Dis* 1980; 121:993-1001.
- (303) Li H, Elton TS, Chen YF, Oparil S. Increased endothelin receptor gene expression in hypoxic rat lung. *Am J Physiol* 1994; 266:L553-L560.

- (304) Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, Yamaguchi I, Kobayashi M, Goto K, Sugishita Y. Pulmonary hypertension caused by congestive heart failure is ameliorated by long-term application of an endothelin receptor antagonist. Increased expression of endothelin-1 messenger ribonucleic acid and endothelin-1-like immunoreactivity in the lung in congestive heart failure in rats. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28:1580-1588.
- (305) Nguyen QT, Cernacek P, Calderone A, Stewart DJ, Picard P, Sirois P, White M, Rouleau JL. Endothelin A receptor blockade causes adverse left ventricular remodeling but improves pulmonary artery pressure after infarction in the rat. *Circulation* 1998; 98:2323-2330.
- (306) Nguyen QT, Cernacek P, Sirois MG, Calderone A, Lapointe N, Stewart DJ, Rouleau JL. Long-term effects of nonselective endothelin A and B receptor antagonism in postinfarction rat: importance of timing. *Circulation* 2001; 104:2075-2081.
- (307) Oie E, Yndestad A, Robins SP, Bornerheim R, Asberg A, Attramadal H. Early intervention with a potent endothelin-A/endothelin-B receptor antagonist aggravates left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol* 2002; 97:239-247.
- (308) Valdivia E, Lalich JJ, Hayashi Y, Sonnad J. Alterations in alveoli after a single injection of monocrotaline. *Arch Path* 1967; 84:64-76.

- (309) Meyrick B, Gamble W, Reid L. Development of *Crotalaria* pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol* 1980; 239:H692-H702.
- (310) Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, Yano M, Yamaguchi I, Sugishita Y, Goto K. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 1993; 73:887-897.
- (311) Okada K, Bernstein ML, Zhang W, Schuster DP, Botney MD. Angiotensin-converting enzyme inhibition delays pulmonary vascular neointimal formation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:939-950.
- (312) Wada A, Tsutamoto T, Fukai D, Ohnishi M, Maeda K, Hisanaga T, Maeda Y, Matsuda Y, Kinoshita M. Comparison of the effects of selective endothelin ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptor antagonists in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:1385-1392.
- (313) Sato Ko, Oka M, Hasunuma K, Ohnishi M, Sato Ka, Kira S. Effects of separate and combined ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> blockade on ET-1-induced constriction in perfused rat lungs. *Am J Physiol* 1995; 269:L668-L672.
- (314) McCulloch KM, MacLean MR. Endothelin<sub>B</sub> receptor-mediated contraction of human and rat pulmonary resistance arteries and the

effect of pulmonary hypertension on endothelin responses in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26:S169-S176.

- (315) Barnes K, Brown C, Turner AJ. Endothelin-converting enzyme: ultrastructural localization and its recycling from the cell surface. *Hypertension* 1998; 31:3-9.
- (316) D'Orleans-Juste P, Lidbury PS, Warner TD, Vane JR. Intra-vascular human big-endothelin increases circulating levels of endothelin-1 and prostacyclin in the rabbit. *Biochem Pharmacol* 1990; 39:R21-R22.
- (317) D'Orleans-Juste P, Lidbury PS, Telemaque S, Warner TD, Vane JR. Human big endothelin releases prostacyclin in vivo and in vitro through a phosphoramidon-sensitive conversion to endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17:S251-S255.
- (318) Wu-Wong JR, Budzik GP, Devine EM, Opgenorth TJ. Characterization of endothelin converting enzyme in rat lung. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 171:1291-1296.
- (319) Dupuis J, Rouleau JL, Cernacek P. Reduced pulmonary clearance of endothelin-1 contributes to the increase of circulating levels in heart failure secondary to myocardial infarction. *Circulation* 1998; 98:1684-1687.

- (320) Dupuis J, Moe GW, Cernacek P. Reduced pulmonary metabolism of endothelin-1 in canine tachycardia-induced heart failure. *Cardiovasc Res* 1998; 39:609-616.
- (321) Fareh J, Touyz RM, Schiffrin EL, Thibault G. Endothelin-1 and angiotensin II receptors in cells from rat hypertrophied heart. *Circ Res* 1996; 78:302-311.
- (322) Modesti PA, Vanni S, Paniccia R, Bandinelli B, Bertolozzi I, Polidori G, Sani G, Neri Serneri GG. Characterization of endothelin-1 receptor subtypes in isolated human cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34:333-339.
- (323) Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* 1996; 384:353-355.
- (324) Kobayashi T, Miyauchi T, Sakai S, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. Expression of endothelin-1, ETA and ETB receptors, and ECE and distribution of endothelin-1 in failing rat heart. *Am J Physiol* 1999; 276:H1197-H1206.
- (325) Ueno M, Miyauchi T, Sakai S, Goto K, Yamaguchi I. Endothelin-A-receptor antagonist and oral prostacyclin analog are comparably effective in ameliorating pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36:S305-S310.

- (326) Mulder P, Boujedaini H, Richard V, Derumeaux G, Henry JP, Renet S, Wessale JL, Opgenorth TJ, Thuillez C. Selective endothelin-A versus combined endothelin-A/endothelin-B receptor blockade in rat chronic heart failure. *Circulation* 2000; 102:491-493.
- (327) Iwasaki S, Homma T, Matsuda Y, Kon V. Endothelin receptor subtype B mediates autoinduction of endothelin-1 in rat mesangial cells. *J Biol Chem* 1995; 270:6997-7003.
- (328) Matsumara Y, Hisaki K, Masanori T, Morimoto S. Phosphoramidon, a metalloproteinase inhibitor, suppresses the hypertensive effect of big-endothelin-1. *Eur J Pharmacol* 1990; 185:103-106.
- (329) Stangl K, Dschietzig T, Laule M, Alexiou K, Wernecke KD, Baumann G. Pulmonary big endothelin affects coronary tone and leads to enhanced, ET<sub>A</sub>-mediated coronary constriction in early endothelial dysfunction. *Circulation* 1997; 96:3192-3200.
- (330) Hisaki K, Matsumara Y, Maekawa H, Fujita K, Takaoka M, Morimoto S. Conversion of big ET-1 in rat lung: role of phosphoramidon-sensitive endothelin-1-converting enzyme. *Am J Physiol* 1994; 266:H422-H428.
- (331) Davenport AP, Kuc RE, Mockridge JW. Endothelin-converting enzyme in the human vasculature; evidence for differential conversion of big endothelin-3 by endothelial and smooth-muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31:S1-S3.



- (332) Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWitt D, Yanagisawa M. ECE-1: A membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 1994; 78:473-485.
- (333) Haynes WG, Webb DJ. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 basal vascular tone. *The Lancet* 1994; 344:852-854.