

EXPRESSION OF ENDOTHELIN-1 IN UNAFFECTED COLON MUCOSA 10 CM AND 20 CM FROM COLORECTAL CARCINOMA

EKSPRESIJA ENDOTELINA-1 U NEZAHVAĆENOJ SLUZNICI DEBELOG CREVA UDALJENOJ 10 CM I 20 CM OD KOLOREKTALNOG KARCINOMA

Anja Stanojlović¹, Sanja Despotović^{1,2}

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za histologiju i embriologiju „Prof. dr Aleksandar Đ. Kostić“, Beograd, Srbija

Correspondence: sta.anja02@gmail.com

Abstract

Introduction: Endothelin-1 is a vasoconstrictor peptide primarily synthesized by endothelial and smooth muscle cells. Increased expression of this peptide has been observed in inflammation, hypoxia, ischemia, various cardiovascular diseases and various types of cancer. In addition to vasoconstrictive, significant mitogenic, proangiogenic and anti-apoptotic effects have also been proven.

Aim: To examine the expression of endothelin-1 in the unaffected mucosa 10 cm and 20 cm away from the colon adenocarcinoma and the lamina propria of the colon mucosa of healthy subjects.

Material and methods: The samples were obtained by biopsy at the Center for Gastroenterology, Clinical Hospital Center “Dr. Dragiša Mišović-Dedinje” in Belgrade from patients with malignant colon tumors. During the diagnostic colonoscopy, colon mucosa samples were taken 10 cm and 20 cm distal to the primary tumor lesion (n = 10). A control group of samples (n = 10) was obtained by endoscopic biopsy of the healthy subjects in the same institution. Immunohistochemical staining on paraffin samples was performed according to the established protocol. For statistical analysis of frequency, Fisher’s exact probability test was used, using 2 x 2 contingency tables.

Results: Statistically significant difference in the frequency of endothelin-1 expression was detected neither in the surface epithelium nor in the endothelial cells of the lamina propria of the colon mucosa at a distance of 10 cm (p = 0.38) or 20 cm (p = 0.67) from the tumor compared to the lamina propria of colon mucosa of healthy subjects. Also, no statistically significant difference was detected in the frequency of high and low expression of endothelin-1 in the epithelium and blood vessels of the lamina propria of the colon mucosa at a distance of 10 cm and 20 cm from the tumor (p = 0.82).

Conclusion: Endothelin-1 is variably expressed in the colon mucosa, predominantly by epithelial and endothelial cells. A statistically significant difference in the frequency of high and low expression of endothelin-1 between the groups was not detected.

Keywords:

endothelin-1,
colorectal
adenocarcinoma,
unaffected mucosa,
human samples
endothelin-1,

Sažetak

Uvod: Endotelin-1 je vazokonstriktorni peptid koga prvenstveno sintetišu endotelne i glatke mišićne ćelije. Povećana ekspresija ovog peptida zapažena je u inflamaciji, hipoksiji, ishemiji, različitim kardiovaskularnim bolestima i karcinomima. Pored vazokonstriktivnog, dokazani su i značajni mitogeni, proangiogeni i antiapoptozni efekti.

Cilj: Ispitati ekspresiju endotelina-1 u nezahvaćenoj sluznici udaljenoj 10 cm i 20 cm od adenokarcinoma debelog creva i sluznici debelog creva zdravih ispitanika.

Materijal i metode: Uzorci potiču od biopsija izvršenih u Centru za gastroenterologiju Kliničko-bolničkog centra „Dr Dragiša Mišović - Dedinje“ u Beogradu kod osoba sa malignim tumorom debelog creva. Tokom dijagnostičke kolonoskopije uzeti su uzorci sluznice debelog creva udaljeni 10 cm i 20 cm distalno od primarnog tumora (n = 10). Kontrolna grupa uzoraka (n = 10) dobijena je endoskopskom biopsijom zdravih ispitanika u istoj ustanovi. Imunohistohemijsko bojenje na endotelin-1 na parafinskim uzorcima rađeno je prema ustanovljenom protokolu. Za statističku analizu učestalosti korišćen je Fišerov test tačne verovatnoće, primenom 2x2 tablica kontigencije.

Rezultati: Nije detektovana statistički značajna razlika učestalosti ekspresije endotelina-1 ni u površnom epitelu ni u endotelnim ćelijama sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm (p = 0,38), ni 20 cm (p = 0,67) od tumora u poređenju sa sluznicom debelog creva zdravih ispitanika. Takođe, nije detektovana statistički značajna razlika u učestalosti visoke i niske ekspresije endotelina-1 u epitelu i krvnim sudovima lamine proprije sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora (p = 0,82).

Zaključak: Endotelin-1 je u sluznici debelog creva varijabilno eksprimiran, dominantno od strane epitelnih i endotelnih ćelija. Statistički značajna razlika u učestalosti visoke i niske ekspresije endotelina-1 između grupa nije detektovana.

Ključne reči:

endotelin-1,
adenokarcinom
debelog creva,
nezahvaćena sluznica,
humani uzorci

Uvod

Endotelin-1 je potentan vazokonstriktorni peptid koga dominantno sintetišu i sekretuju endotelne i glatke mišićne ćelije u uslovima hipoksije, ishemije i inflamacije. Najčešće deluje parakrino, vezujući se za receptore na susednim glatkim mišićnim ćelijama i reguliše njihov tonus. Osim pomenutih tipova ćelija, koje su dugo jedine bile proučavane kao izvor endotelina-1, pokazano je da endotelin-1 sintetišu i neuroni, astrociti, hepatociti, mezigijalne ćelije bubrega, duktalne epitelne ćelije u dojci i Sertolijeve ćelije testisa (1).

Zbog vazokonstriktorne uloge, endotelin-1 se najviše proučavao kao važan faktor u nizu bolesti kardiovaskularnog sistema, ali sve veći broj istraživanja ukazuje na njegovu ulogu u kancerogenezi. Najpre je otkriveno da endotelin-1 ima mitogena svojstva, koja ostvaruje kroz interakciju sa brojnim faktorima rasta (2). Kasnije se pokazalo da ima proangiogeni efekat, tj. da podstiče proliferaciju vaskularnog endotela, glatkih mišićnih ćelija, fibroblasta i pericita i formiranje novih krvnih sudova (3, 4). Endotelin-1 ima i antiapoptozna svojstva (5), stimuliše invazivnost i nastanak metastaza u karcinomu ovarijuma i melanomu (3, 6, 7).

U novije vreme, endotelin-1 se istražuje kao važan faktor u nastanku i širenju kolorektalnog adenokarcinoma (1). Pokazano je da u kolorektalnom adenokarcinomu endotelin-1 eksprimiraju kako novoformirani krvni sudovi, makrofagi i miofibroblasti, tako i same tumorske ćelije. Takođe, pokazano je da je ekspresija endotelina-1 povećana u adenomu i kolorektalnom karcinomu, u poređenju sa zdravom sluznicom (1, 8).

U određivanju ekspresije endotelina-1 koriste se različite metode (*in situ* hibridizacija, *Western Blot*) ali i imunohistohemija, mada podaci o imunohistohemijskoj ekspresiji endotelina-1, kako u zdravom debelom crevu, tako i u tumoru, variraju (8).

S obzirom na to da smo u ranijim istraživanjima pokazali da postoje promene u brojnim parametrima vezanim za vaskularizaciju lamine proprije, proliferaciju žlezdanih epitelnih ćelija i remodelovanje ekstracelularnog matriksa u nezahvaćenoj sluznici debelog creva udaljenoj od tumora (9), želeli smo da ispitamo ekspresiju endotelina na ovim uzorcima.

Detekcija endotelina-1 u tumorskim ćelijama je od značaja najpre zbog potencijalne terapijske upotrebe antagonista endotelina-1-receptora signalnog puta. Primena antagonista endotelina-1 receptora daje obećavajuće rezultate u lečenju pre svega plućne arterijske hipertenzije, ali i različitih solidnih tumora (10-15), dok se njihova upotreba u lečenju ili sprečavanju metastaza kod kolorektalnog karcinoma još uvek ispituje (16, 17).

Cilj našeg istraživanja, dakle, bio je da ispitamo ekspresiju endotelina-1 u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i u nezahvaćenoj sluznici na udaljenosti 10 cm i 20 cm od adenokarcinoma debelog creva.

Materijali i metode

Uzorci tkiva

Biopati sluznice debelog creva dobijeni su prilikom endoskopskog pregleda u Centru za gastroenterologiju Kliničko-bolničkog centra „Dr Dragiša Mišović - Dedinje“

u Beogradu od pacijenata sa karcinomom debelog creva. Prilikom dijagnostičke kolonoskopije uzimani su uzorci sluznice debelog creva udaljeni 10 cm i 20 cm distalno od suspektne primarne tumorske lezije (n = 10) (kasnije je za suspektnu tumorsku leziju, histopatološkom analizom, potvrđeno da se radi o adenokarcinomu debelog creva, NOS). Kao kontrola su uzeti ekvivalentni biopsijski uzorci sluznice debelog creva (n = 10) iz iste ustanove, od pacijenata kod kojih je kolonoskopija bila indikovana zbog: anemije, gubitka telesne težine ili prisustva krvi u stolici. Kod pacijenata kontrolne grupe nalaz na debelom crevu prilikom kolonoskopije bio je ili sasvim uredan ili su dijagnostikovani nekomplikovani hemoroidi. Pacijenti sa infektivnim kolitisom i inflamatornim bolestima debelog creva isključeni su iz ispitivanja. Uzorci su uzimani uz saglasnost etičkog komiteta KBC „Dr Dragiša Mišović - Dedinje“ (18.10.2017). Demografski podaci pacijenata prikazani su u **tabeli 1**.

Tabela 1. Demografske karakteristike pacijenata

Ispitanici	Broj	Starost	Pol	
			Muški	Ženski
Zdravi	10	71,5	6	4
Oboleli	10	73,5	5	5

Obrada uzorka, imunohistohemijsko bojenje i semikvantitativna procena ekspresije

Tkivo creva fiksirano je u 10% puferisanom formalinu i kalupljeno u parafinu. Uzorci su sečeni na mikrotomu, na isečke debljine 4 - 5 µm i bojeni imunohistohemijski antitelom na endotelin-1 (*Abcam*, ab117757, 1:250). Mikrofotografije preparata snimljene su digitalnom kamerom *Leica DFC295* (*Leica*, *Heerbrugg*, Švajcarska) povezanom sa svetlosnim mikroskopom *DM400B LED* (*Leica*, *Wetzlar*, Nemačka).

Imunohistohemijsko bojenje na parafinskim uzorcima rađeno je prema ustanovljenom protokolu. Ukratko, demaskiranje antigena vršeno je metodom toplotom indukovano otkrivanja antigena (engl. *heat induced antigen retrieval*) u mikrotalasnoj tokom 20 minuta, u citratnom puferu (pH = 6). Za blokiranje endogene peroksidaze u tkivu korišćen je komercijalni preparat (*EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent*, *SM801*, *Dako*) tokom 20 minuta. Inkubacija isečaka sa primarnim antitelima, razblaženim u komercijalnom diluentu (*Large Volume UltraAb Diluent*, *Thermo Scientific LabVision*, *TA-125-UD*), u razblaženju 1:250, vršeno je preko noći na 4°C. Sekundarna antitela obeležena HRP-om (*EnVision™ FLEX/HRP detection reagent*, *SM802*, *Dako*) inkubirana su 60 minuta na sobnoj temperaturi. Za razvijanje imunohistohemijske reakcije je primenjen hromogen 3,3'-diaminobenzidin (*DAB*, *DM827*, *Dako*) u rastvoru sa odgovarajućim supstratom (*EnVision™ FLEX Substrate Buffer*, *SM803*, *Dako*) 1 minut. Kako bi se naglasila jedra, isečci su kontrastirani Majerovim (*Mayer*) hematoksilinom 30 sekundi.

Zbog veoma varijabilne i generalno niske ekspresije endotelina-1 u svim našim uzorcima (**slika 1A**), uzorke

smo grupisali u dve kategorije: nisku ekspresiju, kada je endotelin-1 eksprimiran u < 50% epitelnih ćelija/krvnih sudova na preseku i visoku ekspresiju, kada je endotelin-1 eksprimiran u > 50% epitelnih ćelija/krvnih sudova na preseku.

Kao negativnu kontrolu u imunohistohemijskom bojenju koristili smo endoskopski uzorak sluznice debelog creva pacijenta sa kolorektalnim karcinomom, gde smo izostavili primarna antitela, dok smo kao pozitivnu kontrolu koristili uzorak kolorektalnog adenokarcinoma (**slika 1B**).

Statistička analiza

Usled numeričkih ograničenja za izvođenje hi-kvadrat testa, u cilju statističke analize učestalosti korišćen je Fišerov test tačne verovatnoće, primenom 2 x 2 tablica kontingencije.

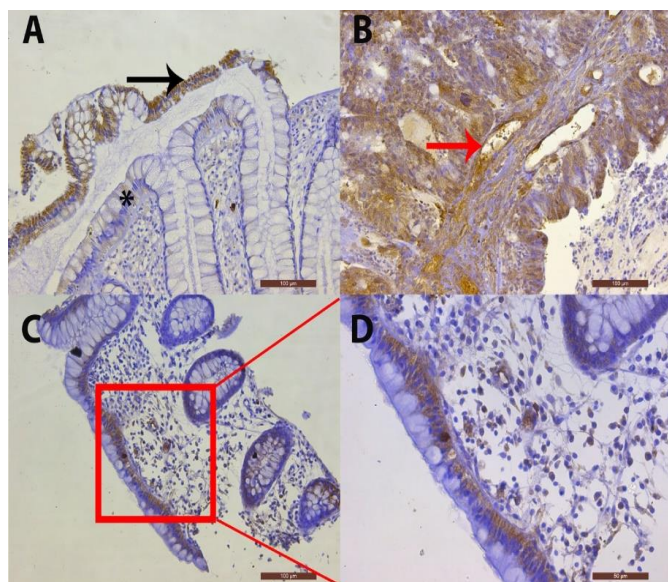
Rezultati

Ekspresija endotelina-1 značajno je varirala u svim uzorcima. U saglasnosti sa Atlasom ljudskih proteina (engl. *Human protein atlas*) (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000078401-EDN1/tissue/colon>), ekspresiju endotelina-1 u uzorcima sluznice zdravog debelog creva i u nezahvaćenju sluznici udaljenoj 10 cm i 20 cm od tumora procenjivali smo semikvantitativno, kao visoku i nisku, u dva odeljka: u epitelnim ćelijama i krvnim sudovima. U lamini propriji sluznice debelog creva endotelin-1 u uzorcima svih grupa eksprimiraju pojedinačne ćelije, najverovatnije makrofagi. U epitelnim ćelijama, u svim uzorcima, endotelin-1 je varijabilno eksprimiran citoplazmatski u površnom epitelu (**slika 1 C, D**) i u pojedinanačnim ćelijama Liberkinovih kripti. Takođe, endotelin-1 je varijabilno eksprimiran u endotelnim ćelijama kapilara i malih krvnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva svih uzoraka (**slika 1 C, D**).

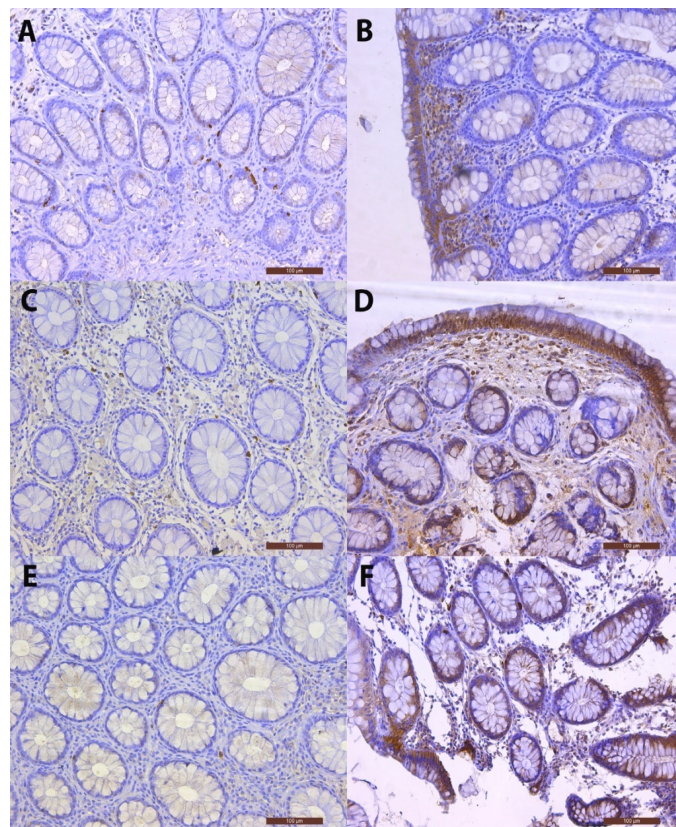
Iako 3 uzorka sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm od tumora pokazuju veoma visoku ekspresiju endotelina-1 u površnom epitelu, nije detektovana statistički značajna razlika u učestalosti visoke ekspresije endotelina-1 ni u površnom epitelu ni u endotelnim ćelijama lamine proprije sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora u poređenju sa laminom proprijom sluznice debelog creva zdravih ispitanika (**slika 2, tabela 2**). Takođe, nije detektovana statistički značajna razlika u učestalosti visoke i niske ekspresije endotelina-1 u epitelu i krvnim sudovima lamine proprije sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora (**tabela 2**).

Diskusija

Ekspresija endotelina-1 u sluznici debelog creva zdravih ispitanika i nezahvaćenju sluznici udaljenoj 10 cm i 20 cm od tumora je varijabilna. Pokazali smo da je endotelin-1 eksprimiran u epitelu (kako površnom, tako i u epitelu Liberkinovih kripti) dominantno citoplazmatski. Endotelin-1 eksprimiraju endotelne ćelije pojedinih



Slika 1. Varijabilna citoplazmatska ekspresija endotelina-1 u površnom epitelu u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 20 cm od tumora: crna strelica pokazuje arteficialno odvojeni deo površnog epitela sa jakom citoplazmatskom ekspresijom endotelina-1, dok je asteriskom označen deo površnog epitela sluznice sa niskom, varijabilnom ekspresijom endotelina-1 (A). Jaka ekspresija endotelina je u pozitivnoj kontroli (adenokarcinomu debelog creva, NOS), crvena strelica pokazuje jedan od endotelin-1 pozitivnih krvnih sudova u karcinomu (B). Tipična ekspresija endotelina-1 u sluznici debelog creva na udaljenosti 10 cm od tumora, sa ekspresijom u površnom epitelu i pojedinim krvnim sudovima lamine proprije (C, D)



Slika 2. Ekspresija endotelina-1: niska (A) i visoka (B) u sluznici debelog creva zdravih ispitanika. Ekspresija endotelina-1: niska (C) i visoka (D) u sluznici debelog creva udaljenoj 10 cm od tumora. Ekspresija endotelina-1 niska (E) i visoka (F) u sluznici debelog creva udaljenoj 20 cm od tumora

kapilara i malih krvnih sudova lamine proprije sluznice debelog creva svih naših isečaka, kao i retke, disperzne mononuklearne ćelije (verovatno makrofagi) lamine proprije. Ekspresiju endotelina-1 kvantifikovali smo kao nisku (u manje od < 50% epitelnih/endotelinih ćelija) i visoku (> 50% epitelnih/endotelinih ćelija). U našim uzorcima nije detektovana statistički značajna razlika u učestalosti visoke i niske ekspresije endotelina-1 između grupa.

Sve više istraživanja naglašava ulogu endotelina-1 u nekim od ključnih koraka u kancerogenezi: proliferaciji, apoptozi, neoangiogenezi, migraciji tumorskih ćelija i nastanku metastaza. Endotelin-1 svoje dejstvo ostvaruje vezujući se za dva glavna receptora (koji su po svojoj građi receptori povezani sa G-proteinom), ETAR i ETBR. O značaju endotelina-1 u nastanku i progresiji tumora govori postojanje nekoliko kliničkih studija koje testiraju primenu antagonista ovih receptora u terapiji karcinoma ovarijuma, dojke i prostate (20).

Tabela 2 . Ekspresija endotelina-1 u epitelnim ćelijama krvnim sudovima sluznice debelog creva zdravih ispitanika na udaljenosti 10 cm i 20 cm od adenokarcinoma

Ekspresija endotelina-1	Zdravi ispitanici (K)	10 cm od tumora	20 cm od tumora	p-vrednost (Fišerov test tačne verovatnoće)
Epitelne ćelije > 50%	2	5	3	K/10 cm p = 0,35
Epitelne ćelije < 50%	8	5	7	K/20 cm p = 0,9
				10 cm/20 cm p = 0,65
Endotelne ćelije > 50%	7	8	6	K/10 cm p = 0,87
Endotelne ćelije < 50%	3	2	4	K/20 cm p = 0,9
				10 cm/20 cm p = 0,65

pokazali da u ovoj sluznici postoji promena u ukupnom broju krvnih sudova, broju novoformiranih krvnih sudova, promena u zastupljenosti i distribuciji fibroblasta/miofibroblasta i remodelovanje ekstracelularnog matriksa (9), a da je endotelin-1 direktno ili indirektno povezan i sa angiogenezom i sa aktivacijom fibroblasta u karcinomu, postojala je opravdana pretpostavka da bi ekspresija endotelina-1 mogla biti promenjena u našim uzorcima u odnosu na sluznicu debelog creva zdravih ispitanika. To bi nas približilo boljem razumevanju složenih procesa koji pretihode nastanku tumora i/ili su posledica sistemskog efekta rastućeg tumora. Međutim, u našim uzorcima, ekspresija endotelina-1 je veoma heterogena i ne razlikuje se između zdravih pacijenata i pacijenata sa tumorom.

Ipak, promenu ekspresije endotelina-1 na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora ne možemo sasvim isključiti zbog malog broja pacijenata u našem uzorku. Takođe, treba razmotriti način da se ekspresija endotelina-1 kvantifikuje putem objektivnih morfometrijskih metoda. Istraživanju bi doprinelo proučavanje ne samo ekspresije endotelina-1 već i njegovih receptora.

Zaključak

Endotelin-1 je u sluznici debelog creva zdravih ispitanika i u nezahvaćenju sluznici debelog creva udaljenoj 10 cm i 20 cm od tumora ekspresiran dominantno u epitelnim i endotelnim ćelijama. U našim uzorcima nije detektovana statistički značajna razlika u učestalosti visoke i niske ekspresije endotelina-1 između grupa.

Literatura

1. Liakou P, Tepetes K, Germenis A, Leventaki V, Atsaves V, Patsouris E, et al. Expression patterns of endothelin-1 and its receptors in colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2012; 105(7):643-9.
2. Battistini B, Chailler P, D'Orléans-Juste P, Brière N, Sirois P. Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides* 1993; 14(2):385-99.
3. Spinella F, Rosanò L, Di Castro V, Decandia S, Nicotra MR, Natali PG, et al. Endothelin-1 and endothelin-3 promote invasive behavior via hypoxia-inducible factor-1alpha in human melanoma cells. *Cancer Res* 2007; 67(4):1725-34.
4. Wülfing P, Kersting C, Tio J, Fischer RJ, Wülfing C, Poremba C, et al. Endothelin-1-, endothelin-A-, and endothelin-B-receptor expression is correlated with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(7):2393-400.
5. Del Bufalo D, Di Castro V, Biroccio A, Varmi M, Salani D, Rosanò L, et al. Endothelin-1 protects ovarian carcinoma cells against paclitaxel-induced apoptosis: requirement for Akt activation. *Mol Pharmacol* 2002; 61(3):524-32.
6. Rosanò L, Spinella F, Bagnato A. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(9):637-51.
7. Chiriboga L, Meehan S, Osman I, Glick M, de la Cruz G, Howell BS. Endothelin-1 in the tumor microenvironment correlates with melanoma invasion. *Melanoma Research*, 2016; 26(3):236-44.
8. Egidy G, Juillerat-Jeanneret L, Jeannin JE, Korth P, Bosman FT, Pinet F. Modulation of human colon tumor-stromal interactions by the endothelin system. *Am J Pathol*. 2000; 157(6):1863-74.
9. Despotović SZ, Milićević NM, Milošević DP, Despotović N, Erceg P, Svorcan P, et al. Remodeling of extracellular matrix of the lamina propria in the uninvolved human rectal mucosa 10 and 20 cm away from the malignant tumor. *Tumour Biol*. 2017; 39(7):1010428317711654.
10. Jankowich M, Choudhary G. Endothelin-1 and cardiovascular events. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2020; 30(1):1-8.
11. Tocci P, Blandino G, Bagnato A. YAP and endothelin-1 signaling: an emerging alliance in cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021; 40(1):27.
12. Tocci P, Rosanò L, Bagnato A. Targeting Endothelin-1 Receptor/ β -Arrestin-1 Axis in Ovarian Cancer: From Basic Research to a Therapeutic Approach. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; 10:609.
13. Tocci P, Roman C, Sestito R, Di Castro V, Sacconi A, Molineris I, et al. Targeting tumor-stroma communication by blocking endothelin-1 receptors sensitizes high-grade serous ovarian cancer to PARP inhibition. *Cell Death Dis*. 2023; 14(1):5.
14. Lu S, Shan-Shan Z, Wan-Bo C, Lei X. Functions of endothelin-1 in apoptosis and migration in hepatocellular carcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2017; 13(6):3116-22.
15. Harrison M, Zinovkin D, Pranjal ZI. Endothelin-1 and Its Role in Cancer and Potential Therapeutic Opportunities. *Biomedicines*, 2024; 12(3):511.
16. Cianfrocca R, Rosanò L, Tocci P, Sestito R, Caprara V, Di Castro V, et al. Blocking endothelin-1-receptor/ β -catenin circuit sensitizes to chemotherapy in colorectal cancer. *Cell Death Differ*, 2017; 24(10):1811-20.
17. Olender J, Nowakowska-Zajdel E, Kruszniewska-Rajs C, Orchel J, Mazurek U, A Wierzgoń, et al. Epigenetic silencing of endothelin-3 in colorectal cancer. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2015; 29(2):333-40.
18. Knowles J, Loizidou M, Taylor I. Endothelin-1 and angiogenesis in cancer. *Curr. Vasc. Pharmacol*. 2005; 3(4):309-14.
19. Knowles JP, Shi-Wen X, Haque SU, Bhalla A, Dashwood MR, Yang S, et al. Endothelin-1 stimulates colon cancer adjacent fibroblasts. *Int. J. Cancer* 2012; 130(6):1264-72.
20. Enevoldsen FC, Sahana J, Wehland M, Grimm D, Infanger M, Krüger M. Endothelin Receptor Antagonists: Status Quo and Future Perspectives for Targeted Therapy. *J. Clin. Med*. 2020; 9(3):824.