

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

mgr farm. Katarzyna Sztuka

Zastosowanie modeli zwierzęcych w poszukiwaniu substancji
o potencjalnym działaniu terapeutycznym w nadciśnieniu płucnym.
Ilościowa analiza meta-danych z badań przedklinicznych

Rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych

Promotor pracy: dr hab. n. farm. Magdalena Jasińska-Stroschein

Praca wykonana w Zakładzie Biofarmacji
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Łódź 2021

Pani dr hab. Magdalenie Jasińskiej-Stroschein
składam serdeczne podziękowania za inspirację do badań,
opiekę merytoryczną, nieocenioną pomoc oraz
cierpliwość i życzliwość udzieloną podczas pisania pracy doktorskiej,

Pani Profesor Darii Orszulak-Michalak
pragnę podziękować za umożliwienie
wykonania pracy doktorskiej w Zakładzie Biofarmacji.

Wykaz publikacji związanych z rozprawą doktorską

Publikacje oryginalne:

1. **Sztuka K**, Jasińska-Stroschein M. Animal models of pulmonary arterial hypertension: a systemic review and meta-analysis of data from 6126 animals. *Pharmacol Res*, 2017; 125: 201–214

IF₂₀₁₇ = 4,897; MNiSW₂₀₁₇ = 40; MNiSW₂₀₁₉ = 100

2. **Sztuka K**, Orszulak-Michalak D, Jasińska-Stroschein M. Systematic review and meta-analysis of interventions tested in animal models of pulmonary hypertension. *Vascul Pharmacol*, 2018; 110: 55–63

IF₂₀₁₈ = 3,330; MNiSW₂₀₁₈ = 30; MNiSW₂₀₁₉ = 100

Publikacje przeglądowe:

3. **Sztuka K**, Orszulak-Michalak D, Jasińska-Stroschein M. Zastosowanie modeli zwierzęcych w badaniach z zakresu medycyny doświadczalnej na przykładzie nadciśnienia płucnego. *Post Hig Med Dośw*, 2018; 72: 686–700

IF₂₀₁₈ = 1,106; MNiSW₂₀₁₈ = 15; MNiSW₂₀₁₉ = 40

Wyniki badań niniejszej pracy zostały przedstawione w formie komunikatów zjazdowych na krajowych konferencjach naukowych:

1. **Sztuka K**, Jasińska-Stroschein M. Ocena czynników determinujących rozwój nadciśnienia płucnego w eksperymentalnych modelach zwierzęcych z wykorzystaniem metod meta-analizy i meta-regresji. VII Ogólnopolska Konferencja Sekcji Krążenia Płucnego Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego, 13-14 października 2017, Wrocław

2. **Sztuka K**, Orszulak-Michalak D, Jasińska-Stroschein M. Nowe substancje o potencjalnej efektywności terapeutycznej w nadciśnieniu płucnym. Analiza meta-danych z 526 prób eksperymentalnych. VII Ogólnopolska Konferencja Sekcji Krążenia Płucnego Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego, 13-14 października 2017, Wrocław

3. **Sztuka K**, Orszulak-Michalak D, Jasińska-Stroschein M. Ocena efektywności nowych substancji o potencjalnym działaniu terapeutycznym w nadciśnieniu płucnym. Meta-analiza z 291 prób przedklinicznych. III Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Choroby rzadkie w XXI wieku”, 21 luty 2020, Lublin

Spis treści

Wykaz skrótów	7
1. Wstęp i cele pracy.....	11
2. Część teoretyczna	15
2.1. Nadciśnienie płucne.....	15
2.1.1. Definicja	15
2.1.2. Klasyfikacja kliniczna i epidemiologia	15
2.1.3. Rozpoznawanie	17
2.1.4. Patomechanizm	19
2.1.4.1. Szlak endoteliny-1 (ET-1).....	19
2.1.4.2. Szlak prostacykliny PGI ₂	20
2.1.4.3. Szlak tlenku azotu (NO).....	20
2.1.5. Farmakoterapia.....	21
2.1.5.1. Prostacyklina PGI ₂ i jej analogi (prostanoidy)	23
2.1.5.2. Antagonisty receptorów endotelinowych (ERAs).....	24
2.1.5.3. Inhibitory fosfodiesterazy typu 5 (PDE-5i).....	25
2.1.5.4. Stymulator cykazy guanylanowej (riocyguat).....	26
2.1.5.5. Agonisty receptora prostacykliny IP	26
2.2. Kierunki poszukiwań nowych możliwości terapeutycznych w nadciśnieniu płucnym	28
2.2.1. Układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS)	29
2.2.2. Kinazy tyrozynowe (TKs).....	30
2.2.3. Szlak sygnałowy ROS/RNS	31
2.2.4. Stan zapalny	33
2.2.5. Kinaza RhoA/ROCK.....	33
2.2.6. Układ serotonergiczny	34
2.2.7. Receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów typu gamma (PPAR γ).....	35
2.2.8. Przekąźnictwo β -adrenergiczne.....	35
2.2.9. Modulacja czynności mitochondriów	36
2.2.10. Mechanizmy epigenetyczne	37
2.2.11. Inne szlaki sygnałowe	37
2.3. Badania przedkliniczne.....	39
2.4. Modele zwierzęce nadciśnienia płucnego	41
2.4.1. Modele klasyczne.....	42
2.4.1.1. Model ekspozycji na przewlekłe niedotlenienie (hipoksję)	42
2.4.1.2. Model monokrotaliny (MCT).....	43

2.4.2. Modele alternatywne	43
2.4.2.1. Model monokrotaliny w połączeniu z usunięciem lewego płuca (LP+MCT) lub z przewlekłą ekspozycją na niedotlenienie (MCT+CH)	44
2.4.2.2. Model Sugenu (Sugen 5416).....	44
2.4.3. Modele indukcji nadciśnienia płucnego związanego z wrodzonymi chorobami serca	45
2.4.4. Modele genetyczne.....	45
2.4.5. Inne modele	46
3. Część doświadczalna	47
3.1. Materiały i metodyka	47
3.1.1. Wyszukiwanie, identyfikacja i selekcja artykułów (etap I).....	49
3.1.1.1. Kryteria włączenia artykułów	49
3.1.1.2. Kryteria wyłączenia artykułów	50
3.1.2. Pozyskanie danych z włączonych artykułów (etap II)	51
3.1.2.1. Klasyfikacja ocenianych związków	52
3.1.3. Analiza jakościowa i ilościowa (etap III).....	52
3.1.3.1. Ocena jakości zakwalifikowanych artykułów (etap III A).....	52
3.1.3.2. Meta-analiza.....	53
3.1.3.2.1. Analiza wpływu cech składowych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego na rozwój nadciśnienia płucnego (etap III B)	53
3.1.3.2.1.1. Analiza w podgrupach.....	54
3.1.3.2.2. Ocena efektywności nowych, potencjalnych leków w terapii nadciśnienia płucnego (etap III C).....	55
3.1.3.2.2.1. Analiza w podgrupach.....	56
3.1.3.3. Analiza niejednorodności	57
3.1.4. Analiza wrażliwości	57
3.1.5. Błąd publikacji (<i>publication bias</i>).....	57
3.1.6. Meta-regresja.....	57
3.1.7. Inne analizy statystyczne.....	58
3.2. Wyniki	59
3.2.1. Wyszukiwanie, identyfikacja i selekcja artykułów	59
3.2.2. Charakterystyka zakwalifikowanych badań	60
3.2.2.1. Charakterystyka zwierząt doświadczalnych.....	60
3.2.2.2. Charakterystyka modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego	61
3.2.2.3. Charakterystyka testowanych związków.....	63
3.2.2.4. Analizowane parametry hemodynamiczne i zmiany przerostowe	69
3.2.2.5. Środki znieczulające zastosowane podczas badań hemodynamicznych	70
3.2.3. Ocena jakości zakwalifikowanych badań.....	71

3.2.4. Analiza wpływu cech składowych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego na rozwój schorzenia.....	72
3.2.4.1. Analiza w podgrupach.....	72
3.2.4.2. Analiza wrażliwości	78
3.2.4.3. Błąd publikacji	79
3.2.4.4. Meta-regresja.....	82
3.2.5. Ocena efektywności nowych, potencjalnych leków w terapii nadciśnienia płucnego	88
3.2.5.1. Analiza wrażliwości	107
3.2.5.2. Błąd publikacji	108
4. Dyskusja	113
5. Wnioski.....	129
6. Streszczenie	131
7. Abstract.....	134
8. Wykaz rycin.....	136
9. Wykaz tabel	138
10. Bibliografia	139
Załącznik 1	151
Załącznik 2.....	168

Wykaz skrótów

- 5-HT** – serotonina, 5-hydroksytryptamina (ang. *5-hydroxytryptamine*)
- 5-HTT, SERT** – transporter serotoniny (ang. *serotonin transporter*)
- 6MWT** – test sześciominutowego marszu (ang. *6-minute walk test*)
- ACE** – enzym konwertujący angiotensynę (ang. *angiotensin-converting enzyme*)
- ACEI** – inhibitory konwertazy angiotensyny (ang. *angiotensin-converting enzyme inhibitors*)
- ALK1** – kinaza podobna do receptora aktywiny-1 (ang. *activin receptor-like kinase-1*)
- AM** – adrenomedulina (ang. *adrenomedullin*)
- AMP** – adenozy-no-5'-monofosforan (ang. *adenosine-5'-monophosphate*)
- AMPK** – kinaza białkowa aktywowana przez AMP (ang. *AMP-activated protein kinase*)
- Ang** – angiotensyna (ang. *angiotensin*)
- ANP** – przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ang. *atrial natriuretic peptide*)
- anty-TGF- β** – przeciwciało przeciwko transformującemu czynnikowi wzrostu β (ang. *antibody against transforming growth factor beta*)
- ATP** – adenozy-no-5'-trifosforan (ang. *adenosine-5'-triphosphate*)
- ATRA** – kwas *all-trans* retinowy, tretynoina (ang. *all-trans retinoic acid*)
- BMPR2** – receptor białka morfogenetycznego kości typu 2 (ang. *bone morphogenetic protein receptor 2*)
- BNP** – peptyd natriuretyczny typu B (ang. *brain natriuretic peptide*)
- cAMP** – cykliczny adenozy-nomono-fosforan (ang. *cyclic adenosine monophosphate*)
- cAng** – cykliczny analog angiotensyny (ang. *cyclic angiotensin*)
- CAV1** – kaweolina-1 (ang. *caveolin-1*)
- cGMP** – cykliczny guanozy-nomono-fosforan (ang. *cyclic guanosine monophosphate*)
- CH** – przewlekłe niedotlenienie (hipoksja) (ang. *chronic hypoxia*)
- CNP** – peptyd natriuretyczny typu C (ang. *C-type natriuretic peptide*)
- CO** – pojemność minutowa serca (ang. *cardiac output*)
- COX** – cyklooksygenaza (ang. *cyclooxygenase*)
- CPET** – sercowo-płucny test wysiłkowy (ang. *cardiopulmonary exercise test*)
- CTEPH** – przewlekłe zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne (ang. *chronic thromboembolic pulmonary hypertension*)
- DHEA** – dehydroepiandrosteron (ang. *dehydroepiandrosterone*)
- DPN** – diarylopropionitryl
- EGF** – naskórkowy czynnik wzrostu (ang. *epidermal growth factor*)
- EGFR** – receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*)
- EIPA** – etyloizopropyl amiloridu (ang. *ethylisopropyl amiloride*)

- EMA** – Europejska Agencja Leków (ang. *European Medicines Agency*)
- ENG** – endoglina (ang. *endoglin*)
- eNOS** – śródbłonkowa syntaza tlenu azotu (ang. *endothelial nitric oxide synthase*)
- ER** – retikulum endoplazmatyczne (ang. *endoplasmic reticulum*)
- ERAs** – antagoniści receptorów endotelinowych (ang. *endothelin receptor antagonists*)
- ERK** – kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo (ang. *extracellular signal regulated kinase*)
- ESC/ERS** – Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne/Europejskie Towarzystwo Oddechowe (ang. *European Society of Cardiology/European Respiratory Society*)
- ET-1** – endotelina 1 (ang. *endothelin-1*)
- FDA** – Agencja do spraw Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*)
- FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor*)
- FGFR** – receptor czynnika wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor receptor*)
- GABA** – kwas γ -aminomasłowy (ang. *gamma-aminobutyric acid*)
- GMP** – monofosforan guanozyny (ang. *guanosine monophosphate*)
- HC** – hiperkapnia (ang. *hypercapnia*)
- HDAC** – deacetylaza histonów (ang. *histone deacetylase*)
- HDACi** – inhibitory deacetylazy histonów (ang. *histone deacetylase inhibitors*)
- HIF-1 α** – czynnik indukowany hipoksją 1 α (ang. *hypoxia-inducible factor 1alpha*)
- HMG-CoA** – 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzym A (ang. *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA*)
- i.p.** – dootrzewnowo (ang. *intraperitoneally*)
- IFN** – interferon
- IPAH** – idiopatyczne tętnicze nadciśnienie płucne (ang. *idiopathic pulmonary arterial hypertension*)
- IQR** – zakres międzykwartyłowy (ang. *interquartile range*)
- KCNK3** – podrodzina kanału potasowego w domenie dwuporowej, członek K3 (ang. *potassium two pore domain channel subfamily K member 3*)
- LP** – usunięcie lewego płuca (ang. *left pneumonectomy*)
- LP+MCT** – połączenie usunięcia lewego płuca z podaniem monokrotaliny
- m.c.** – masa ciała
- MABP** – średnie ciśnienie tętnicze krwi (ang. *mean arterial blood pressure*)
- MAPK** – kinaza białkowa aktywowana mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinase*)
- MCP-1** – białko chemotaktyczne monocytów (ang. *monocyte chemotactic protein*)
- MCT** – monokrotalina (ang. *monocrotaline*)
- MCTP** – dehydromonokrotalina (ang. *dehydromonocrotaline*)
- MLCP** – fosfataza lekkich łańcuchów miozyny (ang. *myosin light chain phosphatase*)
- MMP** – metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *matrix metalloproteinases*)
- mPAP** – średnie ciśnienie w tętnicy płucnej (ang. *mean pulmonary arterial pressure*)
- MRP4** – białko oporności wielolekowej 4 (ang. *multidrug resistance-associated protein 4*)

- n-3 PUFA** – n-3 nienasycone kwasy tłuszczowe (ang. *n-3 polyunsaturated fatty acids*)
- NEP** – neprylizyna (ang. *neprilisin*)
- NFZ** – Narodowy Fundusz Zdrowia
- NF- κ B** – transkrypcyjny czynnik jądrowy κ B (ang. *nuclear factor kappa B*)
- NO** – tlenek azotu (ang. *nitric oxide*)
- NPs** – peptydy natriuretyczne (ang. *natriuretic peptides*)
- NT-proBNP** – N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B
- OA-NO₂** – kwas 10-nitro-oleinowy
- PAB** – banding tętnicy płucnej (ang. *pulmonary artery banding*)
- PAH** – tętnicze nadciśnienie płucne (ang. *pulmonary arterial hypertension*)
- PASMCs** – komórki mięśni gładkich tętnicy płucnej (ang. *pulmonary artery smooth muscle cells*)
- PAWP** – ciśnienie zaklinowania w tętnicy płucnej (ang. *pulmonary artery wedge pressure*)
- PCPA** – 4-chloro-DL-fenylalanina (ang. *4-chloro-DL-phenylalanine*)
- PDE** – fosfodiesteraza (ang. *phosphodiesterase*)
- PDE-5i** – inhibitory fosfodiesterazy typu 5 (ang. *phosphodiesterase type 5 inhibitors*)
- PDGF** – płytkopodobny czynnik wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor*)
- PDGFR** – receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor receptor*)
- PDH** – dehydrogenaza pirogronianowa (ang. *pyruvate dehydrogenase*)
- PDK** – kinaza dehydrogenazy pirogronianowej (ang. *pyruvate dehydrogenase kinase*)
- PDTC** – pirolidynoditiokarbaminian (ang. *pyrrolidine dithiocarbamate*)
- PEA** – endarterektomia płucna (ang. *pulmonary endarterectomy*)
- PGI₂** – prostaglandyna I₂
- PH** – nadciśnienie płucne (ang. *pulmonary hypertension*)
- PI3K** – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (ang. *phosphatidylinositol-3-kinase*)
- PNS** – saponiny z żeń-szenia fałszywego (ang. *Panax notoginseng saponins*)
- PPAR** – receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów (ang. *peroxisome proliferator-activated receptors*)
- PPT** – propylopirazoletriol
- PU** – przedział ufności
- PVR** – płucny opór naczyniowy (ang. *pulmonary vascular resistance*)
- RAAS** – układ renina-angiotensyna-aldosteron (ang. *renin-angiotensin-aldosterone system*)
- RAD** – 40-O-(2-hydroksyetyl)-rapamycyna
- RHC** – cewnikowanie prawego serca (ang. *right heart catheterization*)
- RNS** – reaktywne formy azotu (ang. *reactive nitrogen species*)
- ROCK** – kinaza zależna od Rho (ang. *Rho-associated kinase*)
- ROS** – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

- RVH** – przerost mięśnia prawej komory serca (ang. *right ventricular hypertrophy*)
- RVP** – średnie ciśnienie w prawej komorze serca (ang. *right ventricular pressure*)
- RVSP** – skurczowe ciśnienie w prawej komorze serca (ang. *right ventricular systolic pressure*)
- s.c.** – podskórnice (ang. *subcutaneously*)
- SD** – odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*)
- SEM** – błąd standardowy (ang. *standard error of mean*)
- Ser** – seryna
- sGC** – rozpuszczalna cyklaza guanylanowa (ang. *soluble guanylatecyclase*)
- SHR** – szczury spontanicznie rozwijające nadciśnienie tętnicze (ang. *spontaneously hypertensive rat*)
- SOD** – dysmutaza ponadtlenkowa (ang. *superoxide dismutase*)
- SSRI** – selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny (ang. *selective serotonin reuptake inhibitor*)
- STS** – sulfonian sodowy *tanshinone* IIA
- SV** – objętość wyrzutowa serca (ang. *stroke volume*)
- TAFI** – inhibitor fibrynolizy aktywowany trombiną (ang. *thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*)
- Thr** – treonina
- TKs** – kinazy tyrozynowe (ang. *tyrosine kinases*)
- TKI** – inhibitory kinaz tyrozynowych (ang. *tyrosine kinases inhibitors*)
- Tph** – hydroksylaza tryptofanowa (ang. *tryptophan hydroxylase*)
- TPR** – całkowity opór obwodowy (ang. *total peripheral resistance*)
- TXA₂** – tromboksan A₂ (ang. *thromboxane A₂*)
- VEGF-R2** – receptor typu 2 czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor receptor*)
- VIP** – wazoaktywny peptyd jelitowy (ang. *vasoactive intestinal peptide*)
- WHO-FC/NYHA** – klasyfikacja czynnościowa Światowej Organizacji Zdrowia/Nowojorskie Towarzystwo Kardiologiczne (ang. *World Health Organization Functional Class/ New York Heart Association*)
- WT** – grubość ściany (ang. *wall thickness*)

1. Wstęp i cele pracy

Nadciśnienie płucne (PH) to stan hemodynamiczny i patofizjologiczny, w którym średnie ciśnienie w tętnicy płucnej jest równe lub przekracza 25 mmHg w spoczynku [69]. Może być samoistną jednostką chorobową, ale częściej występuje jako późny objaw wielu schorzeń układu sercowo-naczyniowego i układu oddechowego. Nadciśnienie płucne jest chorobą o ciężkim przebiegu, obarczoną wysoką śmiertelnością. Szczególną grupę stanowią pacjenci z rzadkimi i nieuleczalnymi postaciami schorzenia, do których zalicza się tętnicze nadciśnienie płucne (PAH) [105].

W 1995 roku amerykańska Agencja do spraw Żywności i Leków (FDA) zarejestrowała pierwszy lek w terapii celowanej (swoistej) tętniczego nadciśnienia płucnego – epoprostenol [121]. Od tego czasu dokonął się znaczący postęp w diagnostyce oraz w leczeniu farmakologicznym i chirurgicznym PH. Wdrożenie farmakoterapii celowanej na tętniczki płucne zmniejszyło śmiertelność wśród pacjentów z tętnicznym nadciśnieniem płucnym o około 40% oraz liczbę hospitalizacji o około 60% [70]. Zastosowanie leków swoistych poprawiło jakość życia pacjentów i wydłużyło czas przeżycia. Nie uzyskano jednak długotrwałej normalizacji powstałych oporów płucnych i całkowitego odwrócenia zmian patomorfologicznych. Wśród głównych przyczyn wymienia się wieloczynnikowy, nie w pełni poznany patomechanizm choroby, który obejmuje wiele wzajemnie powiązanych szlaków biochemicznych oraz różne typy komórek i geny. Dotychczasowe badania wskazują, że w przebiegu choroby dochodzi do dysfunkcji śródbłonna tętnic płucnych z zaburzeniem równowagi pomiędzy substancjami o działaniu wazodylatacyjnym, antymitotycznym i antyproliferacyjnym a substancjami o działaniu prozapalnym, mitogennym i wazokonstrykcyjnym [140]. Nadciśnienie płucne pozostaje wciąż chorobą nieuleczalną pomimo znacznego postępu w diagnostyce i farmakoterapii. Dlatego też poszukuje się nowych mechanizmów zaangażowanych w patogenezę schorzenia oraz nowych leków. W tym celu prowadzi się m. in. badania przedkliniczne z wykorzystaniem modeli zwierzęcych. Obecnie nie jest znany „idealny” model nadciśnienia płucnego, który całkowicie odzwierciedla obraz i stopień ciężkości choroby u ludzi. Modele zwierzęce PH mogą być zróżnicowane pod względem techniki indukcji schorzenia, mechanizmu działania czynników wywołujących PH oraz w zakresie powstałych zmian hemodynamicznych i przerostowych w obrębie krążenia płucnego [161, 178].

Przeniesienie wyników prób przedklinicznych na efekty kliniczne stanowi istotny problem badawczy. Badania kliniczne często nie potwierdzają spodziewanych korzyści, pomimo obiecujących wyników uzyskanych w badaniach eksperymentalnych. Dotychczasowe próby przedkliniczne pokazały efektywność terapeutyczną wielu substancji testowanych w kierunku potencjalnego zastosowania w nadciśnieniu płucnym, np. statyn, inhibitorów kinaz tyrozynowych (TKI), tergurydu [54, 71, 101]. Dalsze próby na ludziach nie potwierdziły skuteczności

wymienionych związków. Tłumaczy się to różnicami międzygatunkowymi czy niezadawalającą powtarzalnością wyników prób na zwierzętach [150]. Nie bez znaczenia pozostaje również wieloczynnikowa etiologia nadciśnienia płucnego, która utrudnia poszukiwania nowych opcji terapeutycznych. Szanse na potwierdzenie wyników badań eksperymentalnych w próbach klinicznych może zwiększyć wybór odpowiedniej metody badawczej. Stąd znajomość zakresu indukowanych zmian hemodynamicznych i przerostowych wydaje się kluczowa. Właściwy dobór modelu zwierzęcego PH może stanowić istotny czynnik warunkujący prawidłową ocenę efektywności potencjalnych, nowych leków – kandydatów do dalszych prób klinicznych.

Główne cele pracy obejmują ocenę zasadności budowy modelu zwierzęcego PH, opartą na jakościowej i ilościowej analizie:

1. wpływu składowych wybranych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego na stopień rozwoju i ciężkość schorzenia,
2. efektywności związków testowanych na wybranych modelach zwierzęcych nadciśnienia płucnego.

W pracy przyjęto, że model zwierzęcy nadciśnienia płucnego jest opisany przez określenie takich cech składowych jak: metoda wywołania nadciśnienia płucnego (rodzaj, dawka, sposób podania czynnika indukującego), czas trwania indukcji schorzenia, gatunek zwierząt doświadczalnych.

Ocenie poddano najczęściej wykorzystywane i najlepiej poznane modele zwierzęce nadciśnienia płucnego: model ekspozycji na przewlekłe niedotlenienie (hipoksję) (CH), model monokrotaliny (MCT) oraz ich modyfikacje: model Sugenu 5416 w połączeniu z ekspozycją na przewlekłe niedotlenienie oraz opcjonalnie z warunkami normoksji (po zakończeniu ekspozycji na przewlekłą hipoksję), model monokrotaliny w połączeniu z ekspozycją na przewlekłe niedotlenienie (MCT+CH) lub z usunięciem lewego płuca (LP+MCT), model ekspozycji na przewlekłe niedotlenienie w połączeniu z hiperkapnią (CH+HC).

Wpływ cech składowych wybranych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego na stopień rozwoju i ciężkość schorzenia oraz efektywność nowych związków oceniono w oparciu o odnotowane zmiany (pogorszenie lub poprawa) najczęściej raportowanych parametrów hemodynamicznych i przerostowych w badaniach eksperymentalnych z zakresu nadciśnienia płucnego. Były to: średnie i/lub skurczowe ciśnienie w prawej komorze serca (RVP, RVSP), średnie ciśnienie w tętnicy płucnej (mPAP), przerost mięśnia prawej komory serca (RVH) i przyrost ściany tętnic płucnych (WT).

Cele pracy zrealizowano dokonując:

- a) przeglądu systematycznego artykułów opublikowanych od 1 stycznia 1995 roku do 31 grudnia 2015 roku w elektronicznych bazach danych – Medline i ISI Web of Science, wg przyjętych kryteriów włączenia i wyłączenia, bez ograniczeń językowych (podrozdział 3.1.1),
- b) szeregu analiz jednoczynnikowych i wieloczynnikowych danych pozyskanych z publikacji, które spełniły przyjęte kryteria włączenia, z uwzględnieniem:
 - meta-analizy (model z efektem zmiennym) oraz analizy skumulowanej, analizy w podgrupach, analizy niejednorodności i analizy wrażliwości (podrozdział 3.1.3.2, 3.1.3.3, 3.1.4),
 - analizy metaregresji wieloczynnikowej (model z efektem zmiennym) (podrozdział 3.1.6),
- c) oceny błędu publikacji z wykorzystaniem wykresów lejkowych oraz testów statystycznych (podrozdział 3.1.5):
 - testu Begga i Mazumdar,
 - testu Eggera,
 - procedury *Trim and Fill*.

W niniejszej pracy sformułowano następujące hipotezy badawcze:

1. Modele zwierzęce nadciśnienia płucnego są zróżnicowane,
2. Stopień rozwoju i ciężkość wywołanych zmian hemodynamicznych i przerostowych zależy od wyboru modelu zwierzęcego nadciśnienia płucnego,
3. Rodzaj zastosowanego w badaniach przedklinicznych modelu zwierzęcego nadciśnienia płucnego może wpływać na efektywność ocenianych związków.

Na potrzebę weryfikacji postawionych hipotez:

- przeprowadzono ocenę jakościową składowych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego,
- dokonano ilościowej oceny wpływu składowych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego na stopień rozwoju i ciężkość schorzenia, wyrażonego przez zmianę analizowanych parametrów hemodynamicznych i przerostowych,
- przeprowadzono ilościową ocenę efektywności testowanych związków oraz grup terapeutycznych/farmakologicznych (wg przyjętej w pracy klasyfikacji [168]) dla dwóch miar efektu – różnicy średnich (D) oraz ilorazu różnic średnich (R),
- oceniono efektywność związków z dziesięciu najczęściej analizowanych przez badaczy grup terapeutycznych/farmakologicznych (ustalonych wg przyjętej w pracy klasyfikacji [168]).

Uwzględniono także rodzaj schematu badawczego (model prewencyjny i terapeutyczny). Za miarę efektu przyjęto iloraz różnic średnich (R).

2. Część teoretyczna

2.1. Nadciśnienie płucne

2.1.1. Definicja

Nadciśnienie płucne (PH) definiuje się jako stan patofizjologiczny, w którym średnie ciśnienie w tętnicy płucnej oznaczone metodą cewnikowania prawego serca (RHC), jest równe lub przekracza 25 mmHg w spoczynku. W zależności od wartości dodatkowych parametrów hemodynamicznych, takich jak ciśnienie zaklinowania w tętnicy płucnej (PAWP), definiuje się nadciśnienie płucne przedwłośniczkowe ($PAWP \leq 15$ mmHg) oraz nadciśnienie płucne pozawłośniczkowe ($PAWP > 15$ mmHg) [69].

2.1.2. Klasyfikacja kliniczna i epidemiologia

Obecna klasyfikacja kliniczna PH (V Światowe Sympozjum Nadciśnienia Płucnego, Nicea, 2013) wyróżnia pięć głównych grup schorzenia: tętnicze nadciśnienie płucne, nadciśnienie płucne spowodowane chorobami lewej części serca, nadciśnienie płucne w przebiegu chorób płuc i/lub hipoksji, przewlekłe zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne (CTEPH), nadciśnienie płucne o niewyjaśnionym i/lub wieloczynnikowym patomechanizmie (**Tabela 1**) [72, 173]. Grupy te różnią się etiologią, epidemiologią, obrazem zmian patomorfologicznych, rokowaniem oraz podejściem terapeutycznym. Szczególnie ciężką i postępującą postacią choroby jest tętnicze nadciśnienie płucne, nazywane także „złośliwym” ze względu na charakter zmian histopatologicznych powstających w naczyniach płucnych, w obrębie których może dojść do rozwoju pleksogennej arteriopatii [25, 87].

Tabela 1. Skrócona klasyfikacja kliniczna nadciśnienia płucnego (na podstawie [69]); * – receptor białka morfogenetycznego kości typu 2 (BMPR2)

1. Tętnicze nadciśnienie płucne (PAH)	3. Nadciśnienie płucne w przebiegu chorób płuc i/lub hipoksji
1.1. Idiopatyczne 1.2. Dziedziczne 1.2.1. Mutacje BMPR2* 1.2.2. Inne mutacje 1.3. Wywołane przez leki lub toksyny 1.4. PAH związane z: 1.4.1. Chorobami tkanki łącznej 1.4.2. Zakażeniem HIV 1.4.3. Nadciśnieniem wrotnym 1.4.4. Wadami wrodzonymi serca 1.4.5. Schistosomatozą 1.' Choroba zarostowa żył płucnych i/lub kapilarna hemangiomatoza płucna 1." Przetrwale PH noworodków	3.1. Przewlekła obturacyjna choroba płuc 3.2. Śródmiąższowa choroba płuc 3.3. Inne choroby płuc z mieszanymi zmianami restrykcyjnymi i obturacyjnymi 3.4. Zaburzenia oddychania w czasie snu 3.5. Zaburzenia wentylacji pęcherzykowej 3.6. Przewlekła ekspozycja na duże wysokości 3.7. Wady rozwojowe płuc
	4. Przewlekłe zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne i inne zawężenia tętnic płucnych
	4.1. Przewlekłe zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne (CTEPH) 4.2. Inne zawężenia tętnic płucnych: 4.2.1. <i>Angiosarcoma</i> 4.2.2. Inne nowotwory wewnątrznaczyniowe 4.2.3. Zapalenie tętnic 4.2.4. Wrodzone zwężenia tętnic płucnych 4.2.5. Pasożyty (hydridozy)
2. Nadciśnienie płucne spowodowane chorobą lewej części serca	5. Nadciśnienie płucne o niewyjaśnionym i/lub wieloczynnikowym patomechanizmie
2.1. Zaburzenia czynności skurczowej lewej komory serca 2.2. Zaburzenia czynności rozkurczowej lewej komory serca 2.3. Wady zastawkowe 2.4. Wrodzone lub nabyte zawężenie drogi napływu lub odpływu lewej komory serca lub kardiomiopatie wrodzone 2.5. Wrodzone/nabyte zwężenia żył płucnych	

Szacuje się, że w Polsce na tętnicze nadciśnienie płucne choruje około 1000 osób, a około 500 osób – na przewlekłe zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne. Zapadalność na PAH wynosi około 30,8 przypadków/mln [110, 114]. Dane epidemiologiczne dotyczące chorobowości tętniczego nadciśnienia płucnego w Polsce przedstawiono w **Tabeli 2**. Średni wiek pacjentów z tętnicznym nadciśnieniem płucnym wynosi 45–50 lat, a liczba zachorowań wśród kobiet jest większa niż wśród mężczyzn [14, 147]. Ważne jest wczesne i prawidłowe rozpoznanie choroby oraz szybkie wdrożenie odpowiedniego leczenia.

Tabela 2. Chorobowość tętniczego nadciśnienia płucnego w Polsce (na podstawie [110, 114])

Stan na	Liczba dorosłych pacjentów z tętnicznym nadciśnieniem płucnym	Chorobowość
2013	571	18,2/mln
2014	667	21,3/mln
2015	753	24,1/mln
2016	871	27,8/mln
2017	934	29,8/mln
2018	970	30,8/mln

2.1.3. Rozpoznawanie

Ocena chorych z podejrzeniem nadciśnienia płucnego wymaga przeprowadzenia szeregu badań. Mają one na celu potwierdzenie rozpoznania choroby, określenie grupy klinicznej PH oraz etiologii w obrębie PAH; dokonuje się też oceny zaburzeń czynnościowych, biochemicznych i hemodynamicznych. Rozpoznanie schorzenia służy algorytm diagnostyczny zawarty w wytycznych Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego i Europejskiego Towarzystwa Oddechowego (ESC, ERS) [69]. Zdiagnozowanie nadciśnienia płucnego we wczesnym stadium jest trudne; początkowe objawy kliniczne PH są niespecyficzne (np. duszność, osłabienie, omdlenia) i mogą przypominać inne schorzenia, takie jak astma oskrzelowa czy przewlekła obturacyjna choroba płuc. W konsekwencji schorzenie często jest rozpoznawane późno, w zaawansowanym stadium [68, 132]. Wskazuje się, że średni czas od wystąpienia pierwszych objawów tętniczego nadciśnienia płucnego do postawienia prawidłowej diagnozy wynosi około 3 lata [97].

Do badań szczególnie przydatnych w diagnostyce nadciśnienia płucnego zalicza się: elektrokardiografię (EKG), radiogram klatki piersiowej (Rtg klp), echokardiografię, scyntyografię perfuzyjną lub wentylacyjno-perfuzyjną płuc, tomografię komputerową wysokiej rozdzielczości, arteriografię tętnic płucnych, badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej oraz morfologię krwi, gazometrię, oznaczenie poziomu NT-proBNP i przeciwciał anty-HIV. Istotną rolę w diagnozowaniu

tętniczego nadciśnienia płucnego przypisuje się badaniom genetycznym, prowadzonym w kierunku mutacji takich genów jak BMPR2, ALK1, ENG, KCNK3 czy też CAV1. Badaniem kluczowym uznawanym za „złoty standard” w diagnostyce nadciśnienia płucnego jest cewnikowanie prawej części serca (RHC) [86, 132]. Służy ono potwierdzeniu rozpoznania schorzenia i ocenie stopnia ciężkości zmian hemodynamicznych oraz monitorowaniu odpowiedzi na wdrożone leczenie. Cewnikowanie prawej części serca wykorzystuje się również dla określenia wazoreaktywności krążenia płucnego, co decyduje o kwalifikacji pacjentów do leczenia wazodylatacyjnego antagonistami wapnia [107, 113].

W ocenie klinicznej pacjentów z nadciśnieniem płucnym stosuje się klasyfikację czynnościową WHO-FC/NYHA. W zależności od stopnia aktywności fizycznej chorego oraz od występowania takich objawów klinicznych jak duszność, zmęczenie czy ból w klatce piersiowej, pacjentów przyporządkowuje się do jednej z czterech klas (**Tabela 3**) [69, 203]. W celu określenia stopnia wydolności fizycznej chorego z nadciśnieniem płucnym, przeprowadza się test sześciominutowego marszu (6MWT) oraz analizę spiroergometryczną (CPET), czyli sercowo-płucny test wysiłkowy. Klasyfikacja czynnościowa WHO-FC/NYHA określa stopień ciężkości choroby i rokowanie pacjentów. Jej pogorszenie świadczy o postępie schorzenia, a osiągnięcie przez pacjentów 1–2 klasy czynnościowej stanowi jeden z celów terapii nadciśnienia płucnego [68].

Tabela 3. Klasyfikacja czynnościowa w nadciśnieniu płucnym, zmodyfikowana na podstawie klasyfikacji czynnościowej NYHA zgodnie z klasyfikacją WHO z 1998 roku (na podstawie [69])

Klasa 1	Chorzy z nadciśnieniem płucnym bez ograniczonej aktywności fizycznej. Zwykła aktywność fizyczna nie powoduje (nadmiernej) duszności ani zmęczenia, bólu w klatce piersiowej oraz stanu przedomdleniowego.
Klasa 2	Chorzy z nadciśnieniem płucnym powodującym niewielkie ograniczenie aktywności fizycznej, bez dolegliwości w spoczynku. Zwykła aktywność fizyczna powoduje (nieproporcjonalną) duszność lub zmęczenie, ból w klatce piersiowej lub stan przedomdleniowy.
Klasa 3	Chorzy z nadciśnieniem płucnym powodującym znaczne ograniczenie aktywności fizycznej, bez dolegliwości w spoczynku. Aktywność mniejsza od zwykłej powoduje duszność, zmęczenie, ból w klatce piersiowej lub stan przedomdleniowy.
Klasa 4	Chorzy z nadciśnieniem płucnym niezdolni do podejmowania jakiejkolwiek aktywności fizycznej bez pojawienia się objawów. Mają objawy niewydolności prawokomorowej serca. Duszność i/lub zmęczenie mogą występować już w spoczynku. Aktywność fizyczna nasila objawy.

2.1.4. Patomechanizm

Z przedstawionej klasyfikacji klinicznej nadciśnienia płucnego wynika, że niejednokrotnie do rozwoju PH dochodzi w następstwie innych schorzeń, takich jak choroby serca czy choroby płuc. Nadciśnienie płucne może również występować samoistnie, czego przykładem jest idiopatyczne tętnicze nadciśnienie płucne (IPAH). Dotychczas udowodniono, że w przebiegu PAH dochodzi do upośledzenia czynności kanałów potasowych mięśni gładkich i dysfunkcji śródbłonka tętnic płucnych z zaburzeniem równowagi pomiędzy szlakami sygnałowymi z udziałem substancji o działaniu wazodylatacyjnym, antymitotycznym i antyproliferacyjnym (tlenek azotu – NO, prostacyklina PGI₂) a substancjami o działaniu prozapalnym, mitogennym i wazokonstrykcyjnym (endotelina-1, tromboksan A₂) [154]. W konsekwencji obserwuje się nadmierną proliferację i oporność na proces apoptozy komórek śródbłonka i mięśni gładkich, a także zmiany prozakrzepowe i prozapalne w obrębie naczyń płucnych. Opisane zaburzenia prowadzą do skurczu, przebudowy tętnic płucnych (tzw. remodeling) oraz do ograniczenia łożyska naczyniowego. Dochodzi do wzrostu płucnego oporu naczyniowego (PVR) oraz postępującego wzrostu średniego ciśnienia w tętnicy płucnej (mPAP). Skutkiem opisanych zmian może być większe obciążenie następcze prawej komory serca, przerost jej ścian oraz rozwój niewydolności prawokomorowej [185, 191, 207]. Wiele badań wskazuje, że do podobnej dysfunkcji śródbłonka tętnic płucnych może dochodzić również w rozwoju przewlekłego zakrzepowo-zatorowego nadciśnienia płucnego oraz nadciśnienia płucnego spowodowanego niedotlenieniem [163, 186].

2.1.4.1. Szlak endoteliny-1 (ET-1)

Endoteliny należą do rodziny białek złożonych z 21 aminokwasów o silnym działaniu naczynioskurczowym. Dotychczas wyodrębniono trzy izopeptydy: ET-1, ET-2 oraz ET-3. Najlepiej zbadanej endotelinie-1 (ET-1) przypisuje się udział w patogenezie wielu chorób układu sercowo-naczyniowego, w tym nadciśnienia płucnego [52, 111]. W warstwie mięśniowej i śródbłonkowej tętnic płucnych oraz w zmianach spłotowatych pacjentów z PH dochodzi do podwyższenia poziomu endoteliny-1 oraz jej prekursora – preproendoteliny. Zaobserwowano również zwiększoną ilość receptorów dla ET-1 u osób z idiopatycznym tętniczym nadciśnieniem płucnym (IPAH) oraz PAH wywołanym przez wrodzone wady serca [40]. Endotelina-1 jest wydzielana przez komórki śródbłonka naczyń krwionośnych. U chorych z PH skutkuje to skurczem i przebudową tętnic płucnych. Peptyd wykazuje działanie wazokonstrykcyjne, mitogenne, prozapalne, a także stymuluje proces proliferacji i włóknienia fibroblastów. Działa przez dwa typy receptorów związanych z białkiem G: ET-A oraz ET-B, które są zlokalizowane w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Typ ET-B występuje także w komórkach śródbłonka. Aktywacja receptorów dla endoteliny-1 powoduje skurcz mięśni gładkich i w efekcie – zwężenie naczyń krwionośnych oraz nasilenie procesu proliferacji. Pobudzenie śródbłonkowych receptorów ET-B prowadzi do

zwiększonego uwalniania substancji o działaniu wazodylatacyjnym: NO i PGI₂, oraz do zahamowania procesu apoptozy komórek śródbłonna i mięśni gładkich w łożysku płucnym [40, 175].

2.1.4.2. Szlak prostacykliny PGI₂

W patomechanizmie nadciśnienia płucnego dochodzi również do zaburzeń związanych ze szlakiem sygnałowym prostaglandyny I₂. U osób z PH obserwuje się zmniejszone wytwarzanie śródbłonkowej PGI₂.

Prostacyklina PGI₂ powstaje w wyniku przemian kwasu arachidonowego pod wpływem cyklooksygenazy (COX-2). Związek działa przez aktywację receptorów I₂ związanych z białkiem G, które znajdują się m. in. w komórkach śródbłonna naczyń płucnych. Efektem ich pobudzenia jest zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia cyklicznego adenozymonofosforanu (cAMP). Poprzez aktywację kinazy białkowej A, cAMP powoduje zwiększenie zewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca²⁺, co prowadzi do rozkurczu mięśni gładkich w obrębie naczyń płucnych [142]. Dodatkowo PGI₂, oprócz opisanego działania wazodylatacyjnego, wykazuje aktywność antyproliferacyjną, antymitogenną, immunomodulującą oraz przeciwzapalną. Działa także przeciwzakrzepowo i hamuje agregację płytek krwi [39, 199]. Upośledzenie syntezy PGI₂ przebiega równocześnie z pobudzeniem drugiej ścieżki przemian kwasu arachidonowego i nasileniem syntezy tromboksanu A₂ (TXA₂), który wykazuje aktywność wazokonstrykcyjną oraz stymuluje agregację płytek krwi [41].

2.1.4.3. Szlak tlenku azotu (NO)

Tlenek azotu jest uwalniany z komórek śródbłonna naczyń płucnych. Powoduje rozkurcz tętnic płucnych, hamuje proliferację mięśni gładkich oraz agregację płytek krwi. U osób z nadciśnieniem płucnym dochodzi do zmniejszonego wydzielania i/lub zaburzonego działania tlenku azotu oraz enzymu katalizującego syntezę NO – śródbłonkowej syntazy NO (eNOS) [92]. Działanie tlenku azotu zależy w dużym stopniu od aktywacji rozpuszczalnej cyklicznej guanylanowej (sGC). Enzym ten pobudza produkcję cyklicznego guanozymonofosforanu (cGMP), który aktywuje kinazę białkową G. Prowadzi to do zmniejszenia wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia Ca²⁺, hiperpolaryzacji błony komórkowej mięśni gładkich i do rozszerzenia naczyń płucnych. Tlenek azotu wpływa także na ograniczenie produkcji działającej wazokonstrykcyjnie endoteliny-1. Upośledzenie wydzielania tlenku azotu przyczynia się do nadmiernego wytwarzania ET-1. Protekcyjną aktywność NO ograniczają wolne rodniki tlenowe, które nasilają działanie stresu oksydacyjnego [39, 96, 104]. U chorych z nadciśnieniem płucnym obserwuje się także zwiększoną aktywność fosfodiesterazy typu 5, która odpowiada za hydrolizę cGMP do nieaktywnego GMP i tym samym osłabia działanie NO [175].

Opisane powyżej szlaki sygnałowe wyjaśniają tylko częściowo patogenezę nadciśnienia płucnego. Wiadomo, że patomechanizm choroby jest wieloczynnikowy i obejmuje liczne szlaki biochemiczne oraz różne typy komórek i genów. W dalszym ciągu naukowcy poszukują innych mechanizmów zaangażowanych w patogenezę choroby. Ma to na celu pełne wyjaśnienie molekularnego podłoża nadciśnienia płucnego, znalezienie punktów uchwytu dla nowych leków oraz optymalizację obecnie stosowanej terapii. Zaburzenia przekazywania w obrębie szlaków sygnałowych dla endoteliny-1, prostacykliny I₂ oraz tlenu azotu stały się podstawą do wdrożenia terapii celowanej tętniczego nadciśnienia płucnego. Opiera się ona na lekach, dla których wymienione szlaki są punktami uchwytu.

2.1.5. Farmakoterapia

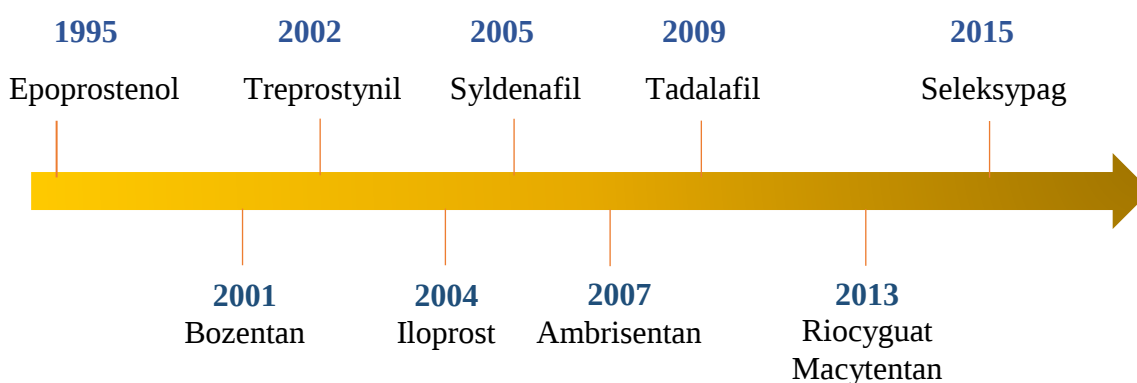
Celem farmakoterapii nadciśnienia płucnego jest zahamowanie postępu choroby, złagodzenie objawów klinicznych, poprawa jakości życia pacjentów oraz wydłużenie czasu przeżycia.

Terapia tętniczego nadciśnienia płucnego obejmuje farmakoterapię celowaną na tętniczki płucne, leczenie nieswoiste (objawowe) oraz chirurgiczne. Proces leczenia jest ściśle określony przez algorytmy terapeutyczne zawarte w europejskich wytycznych ESC/ERS [67]. U niektórych pacjentów z PAH początkowo wdraża się leczenie antagonistami wapnia (np. amlodypina, diltiazem). Do terapii kwalifikują się pacjenci z pozytywnym wynikiem ostrego testu wazoreaktywności. U chorych, u których nie zaobserwowano naczyniorozszerzającego działania leków blokujących kanały wapniowe rozpoczyna się właściwą terapię celowaną na tętniczki płucne [113]. Dobór tzw. leków swoistych wiąże się z zakwalifikowaniem pacjenta do odpowiedniej klasy czynnościowej WHO-FC/NYHA. W tym celu określa się wydolność fizyczną pacjenta w teście sześciominutowego marszu (6MWT) oraz stopień duszności towarzyszący wysiłkowi. Leki stosowane w terapii swoistej PAH wpływają na szlaki sygnałowe, których zaburzenia mają udokumentowany udział w patomechanizmie schorzenia. Zalicza się do nich opisane wcześniej (podrozdział 2.1.4.) szlaki sygnałowe związane z endoteliną-1, prostacykliną I₂ oraz tlenkiem azotu. Terapia celowana na tętniczki płucne jest obecnie stosowana w tętniczym nadciśnieniu płucnym oraz w przewlekłym zakrzepowo-zatorowym nadciśnieniu płucnym. W odniesieniu do pozostałych grup klinicznych, a w szczególności do nadciśnienia płucnego spowodowanego chorobami lewej części serca (grupa 2) oraz nadciśnienia płucnego w przebiegu chorób płuc i/lub hipoksji (grupa 3), postępowanie terapeutyczne polega na leczeniu choroby podstawowej. Obecnie nie zaleca się podawania leków swoistych dla PAH pacjentom z grup klinicznych 2 i 3 [87, 127]. Podejmuje się jednak próby zastosowania takiej terapii u chorych z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (sylденаfil, iloprost) oraz ze zdiagnozowanym CTEPH (sylденаfil, bozentan, treprostynil) [44, 50, 119, 164, 181, 192].

Pierwszy lek w terapii swoistej tętniczego nadciśnienia płucnego – epoprostenol, został zarejestrowany przez FDA w 1995 roku (**Rycina 1**) [121]. Od tego czasu nastąpił znaczący postęp w leczeniu PAH.

Obecnie farmakoterapia celowana na tętniczki płucne obejmuje pięć grup leków (wymieniono wg kolejności dopuszczenia na rynek farmaceutyczny przez FDA):

- prostacyklinę PGI₂ i jej analogi (prostanoidy),
- antagonisty receptorów endotelinowych (ERAs),
- inhibitory fosfodiesterazy typu 5 (PDE-5i),
- stymulator cyklicznej guanylanowej (riocyguat),
- agonistę receptora dla prostacykliny IP (seleksypag).



Rycina 1. Leki swoiste stosowane w terapii tętniczego nadciśnienia płucnego przedstawione chronologicznie wg daty dopuszczenia na rynek farmaceutyczny przez FDA

Efektom działania ww. leków jest normalizacja zaburzeń sygnałowych na poziomie molekularnym i poprawa funkcji śródbłonna tętnic płucnych. Prowadzi to do zmniejszenia powstałych oporów płucnych oraz poprawy wydolności wysiłkowej i parametrów hemodynamicznych. Towarzyszy temu złagodzenie objawów choroby i poprawa jakości życia. W praktyce klinicznej przekłada się to m. in. na utrzymanie pacjentów w 1–2 klasie czynnościowej WHO-FC/NYHA, brak objawów niewydolności prawokomorowej serca, wynik testu 6MWT powyżej 440 m oraz na poprawę parametrów hemodynamicznych i biochemicznych [97].

Leki stosowane w ramach farmakoterapii swoistej tętniczego nadciśnienia płucnego różnią się między sobą mechanizmem działania, skutecznością terapeutyczną oraz właściwościami farmakokinetycznymi, które determinują drogę podania leków oraz dawkowanie.

Przewlekłe zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne to postać PH, którą można całkowicie wyleczyć. Leczeniem z wyboru jest zabieg endarterektomii płucnej (PEA). U chorych niekwalifikujących się do PEA lub u których nadciśnienie płucne utrzymuje się pomimo przeprowadzonego zabiegu, zastosowanie znajduje farmakoterapia celowana. Lekiem swoistym zarejestrowanym w terapii przewlekłego zakrzepowo-zatorowego nadciśnienia płucnego jest riociguat. Chorzy powinni także otrzymywać bezterminowo leki przeciwzakrzepowe. W przypadku wystąpienia niewydolności prawokomorowej serca wdraża się leki moczopędne, natomiast w hipoksemii – tlenoterapię [103, 186].

2.1.5.1. Prostacyklina PGI₂ i jej analogi (prostanoidy)

Punktem uchwytu dla związków z grupy prostanoidów jest szlak prostacykliny. Leki te wykazują działanie naczyniorozszerzające, antyagregacyjne oraz antyproliferacyjne [176]. Pierwszym lekiem zarejestrowanym w terapii swoistej PAH był epoprostenol. To syntetyczna prostacyklina PGI₂ o krótkim okresie półtrwania wynoszącym 3–6 minut, stabilna w temperaturze pokojowej przez 8 godzin. Z tego względu epoprostenol podaje się w stałym wlewie dożylnym za pomocą pompy infuzyjnej. Obecnie jest dostępna termostabilna postać leku, zachowująca trwałość przez 24 godziny, zarejestrowana w Polsce pod nazwą Veletri w dawkach 0,5 i 1,5 mg. Lek jest wskazany do stosowania w 3–4 klasie czynnościowej WHO-FC/NYHA. Leczenie rozpoczyna się od dawki 2–4 ng/kg/min stopniowo ją zwiększając aż do uzyskania dawki optymalnej wynoszącej 20–40 ng/kg/min, co może ograniczyć działania niepożądane [33, 61, 80, 176]. Dalsze badania prowadzone nad grupą prostanoidów poskutkowały wprowadzeniem na rynek farmaceutyczny trzech innych stabilnych chemicznie analogów prostacykliny I₂: beraprostu, treprostynilu i iloprostu. Beraprost był pierwszym stabilnym chemicznie analogiem prostacykliny. Lek podawany doustnie poprawiał wydolność wysiłkową pacjentów. Efekt ten utrzymywał się jedynie przez 3 do 6 miesięcy; nie towarzyszyła mu zmiana parametrów hemodynamicznych. Beraprost został dopuszczony do leczenia PH w Japonii i w Korei Południowej [49, 82].

Treprostynil to trójpierścieniowy cykliczny analog epoprostenolu podawany doustnie, wziewnie lub dożylnie. Preferowaną drogą jest podanie podskórne za pomocą pompy mikroinfuzyjnej przez cewnik [117]. W Polsce substancja jest zarejestrowana w postaci roztworu do infuzji podskórnej w dawkach: 1; 2,5; 5 lub 10 mg/ml (Remodulin, Tresuvi, Trepulmix). Lek jest wskazany do stosowania w 3–4 klasie czynnościowej WHO-FC/NYHA. Leczenie rozpoczyna się od mniejszej dawki i stopniowo się ją zwiększa do uzyskania dawki optymalnej [29, 61, 69].

Innym chemicznie stabilnym analogiem prostacykliny I₂ jest iloprost. Lek można podawać dożylnie, wziewnie lub doustnie, chociaż skuteczność tej ostatniej formy nie została jeszcze potwierdzona [117]. W Polsce iloprost jest dostępny w postaci roztworu do nebulizacji pod nazwą Ventavis i Iloprost Zentiva, w dawkach 10 i/lub 20 mcg/ml. Jest wskazany do stosowania u pacjentów w 3 klasie czynnościowej WHO-FC/NYHA [67]. Dawkę przeznaczoną na jedną inhalację podaje się od 6 do 9 razy na dobę w zależności od indywidualnych potrzeb pacjentów. Czas inhalacji wynosi od 3 do 8 minut. Bezpieczeństwo i skuteczność działania leku wykazano w przypadku stosowania nebulizatorów Breelib, Venta-Neb i I-Neb AAD. Ze względu na różnice we właściwościach fizycznych aerozolu wytwarzanego przez nebulizatory, zmiany urządzenia dokonuje się pod nadzorem lekarza prowadzącego [34]. Konieczność przyjmowania leku kilka razy dziennie w postaci kilkuminutowych inhalacji może pogarszać komfort życia chorych. Leki z grupy prostanoidów są względnie dobrze tolerowane przez pacjentów. Charakteryzuje je wysoka skuteczność terapeutyczna. Wyniki badań klinicznych wskazują, że dożylne podawanie prostanoidów pozwala na uzyskanie istotnej poprawy przeżywalności i wydolności fizycznej w porównaniu do pozostałych form podania leków [12]. Prostanoidy są stosowane w leczeniu zaawansowanych postaci tętniczego nadciśnienia płucnego (3–4 klasa czynnościowa WHO-FC/NYHA). Działania niepożądane opisywanej grupy leków są w dużej mierze związane z koniecznością czasochłonnych inhalacji oraz iniekcjami dożylnymi bądź podskórnymi. W tym ostatnim przypadku może dochodzić do rozwoju miejscowego stanu zapalnego na przebiegu cewnika, infekcji bakteryjnych oraz bólu w miejscu wkłucia, zakrzepicy czy awarii pompy. Z kolei najczęściej raportuje się bóle głowy, biegunkę, bóle żuchwy i szczęki, wymioty, napady gorąca oraz zaczerwienie skóry [61].

2.1.5.2. Antagonisty receptorów endotelinowych (ERAs)

Antagonisty receptorów endotelinowych to kolejna grupa leków stosowana z powodzeniem w terapii tętniczego nadciśnienia płucnego. Mechanizm działania polega na blokowaniu receptorów dla ET-1 typu A i/lub typu B. Wyniki badań eksperymentalnych wskazują na korzyści stosowania leków nieselektywnych [67, 80]. Zaobserwowano, że niewybiórcza inhibicja receptorów ET-A oraz ET-B w większym stopniu ogranicza zmiany przerostowe naczyń płucnych w porównaniu do selektywnej blokady receptorów ET-A [93]. Leki z grupy ERAs są wskazane w leczeniu chorych w 2–3 klasie czynnościowej WHO-FC/NYHA. Bozentan – nieselektywny antagonist receptorów ET-A i ET-B, był pierwszym antagonistą receptorów endotelinowych wprowadzonym na rynek farmaceutyczny. Lek został zarejestrowany w 2001 roku przez FDA ze wskazaniem do leczenia tętniczego nadciśnienia płucnego u dzieci i u dorosłych. Bozentan jest dostępny w Polsce w postaci tabletek powlekanych (Tracleer 62,5; 125 mg, Stayveer 62,5; 125 mg, Bopaho 62,5; 125 mg, Bosentan Sandoz GmbH 62,5; 125 mg) oraz w postaci tabletek do sporządzania zawiesiny doustnej (Tracleer 32 mg). Chorzy leczeni bozentanem wymagają systematycznej kontroli czynności

wątroby, ponieważ działania niepożądane leku wiążą się ze zwiększeniem aktywności aminotransferaz. Zmniejszenie dawki lub odstawienie leku pozwala na normalizację parametrów wątrobowych [67]. Lek jest metabolizowany przez izoenzymy cytochromu P-450 – CYP3A4 i CYP2C9. Jest także ich induktorem. Ze względu na ryzyko wystąpienia interakcji zaleca się zachowanie ostrożności przy jednoczesnym stosowaniu bozentanu z innymi lekami [31, 117].

Modyfikacja struktury chemicznej bozentanu pozwoliła na otrzymanie macytentanu (FDA, 2013). Macytentan charakteryzuje wysoka lipofilność, dobre przenikanie do tkanek i wydłużony czas wiązania z receptorami endotelinowymi. W badaniu klinicznym SERAPHIN wykazano korzystny wpływ macytentanu, przyjmowanego doustnie w dawce 10 mg jeden raz na dobę, na zmniejszenie ryzyka zgonu, ograniczenie postępu choroby (o 45%) czy na złagodzenie objawów PH [111]. Nie zaobserwowano znaczącego działania hepatotoksycznego. Lek jest dostępny w Polsce pod nazwą Opsumit w postaci tabletek powlekanych [16, 28, 170].

Receptory ET-A są także selektywnie blokowane przez inne ERAs: ambrisentan i sitaksentan. Sitaksentan został wycofany z obrotu w 2010 roku z powodu ostrej niewydolności wątroby jaką wywoływał [170]. Preparat zawierający ambrisentan jest dostępny w Polsce pod nazwą Volibris w postaci tabletek powlekanych (5, 10 mg) [35].

Wszystkie opisane leki z grupy ERAs zwiększają ryzyko rozwoju obrzęków obwodowych [28, 31, 35].

2.1.5.3. Inhibitory fosfodiesterazy typu 5 (PDE-5i)

Hamowanie aktywności fosfodiesterazy typu 5, która rozkłada cykliczny monofosforan guanozyny (cGMP) do monofosforanu guanozyny (GMP), wzmacnia szlak sygnałowy NO/cGMP. Leki hamujące aktywność PDE-5 zwiększają wewnątrzkomórkowe stężenie cGMP, co prowadzi do rozszerzenia naczyń płucnych. Inhibitory fosfodiesterazy typu 5 wykazują działanie naczyniorozszerzające oraz antyproliferacyjne [137]. Obecnie znane są trzy leki będące selektywnymi inhibitorami PDE-5: sildenafil, tadalafil i wardenafil. Wardenafil nie uzyskał dotychczas rejestracji w terapii nadciśnienia płucnego przez Europejską Agencję Leków (EMA) oraz FDA.

Sildenafil był pierwszym inhibitorem PDE-5 dopuszczonym do obrotu przez FDA w 2005 roku ze wskazaniem w terapii PAH. W Polsce lek zarejestrowano pod nazwami Revatio, Granpidam, Remidia, Sildenafil Zentiva, Sildenafil Aurovitas do stosowania doustnego (proszek do sporządzania zawiesiny doustnej, tabletki powlekane). Lek jest wskazany w leczeniu tętniczego nadciśnienia płucnego u dorosłych oraz u dzieci od pierwszego roku życia [30, 170], a standardowe dawkowanie to 20 mg trzy razy na dobę. Tadalafil jest zarejestrowany w Polsce w postaci tabletek powlekanych (preparat Adcirca, 20 mg). Ze względu na dłuższy okres półtrwania, lek podaje się raz na dobę [67]. Inhibitory PDE-5 są wskazane w leczeniu pacjentów w 2–3 klasie czynnościowej WHO-FC/NYHA.

Omawiane leki są dobrze tolerowane przez chorych. Z działań niepożądanych wymienia się bóle głowy, zaczerwienienie skóry, krwawienia z nosa, bóle mięśni oraz uderzenia gorąca [23].

2.1.5.4. Stymulator cyklazy guanylanowej (riocyguat)

Działanie PDE-5i związane z hamowaniem rozkładu cGMP zależy od poziomu tlenu azotu, który jest zwykle zmniejszony u chorych na tętnicze nadciśnienie płucne. Z tego względu rozpoczęto badania nad opracowaniem leku, który w sposób bezpośredni pobudza tworzenie cGMP [170]. W 2013 roku FDA wydała pozwolenie na dopuszczenie do obrotu riocyguatu będącego stymulatorem rozpuszczalnej cyklazy guanylanowej (sGC). Podstawą rejestracji leku było randomizowane badanie kliniczne CHEST-1, w którym zaobserwowano poprawę funkcji czynnościowych oraz rokowania pacjentów. Riocyguat wykazuje działanie wazodylatacyjne oraz antyproliferacyjne. Jest dostępny w Polsce pod nazwą Adempas w postaci tabletek powlekanych, w dawkach 0,5–2,5 mg. Obecnie jest to jedyny lek na świecie zarejestrowany w terapii nieoperacyjnego lub przetrwałego, przewlekłego zakrzepowo-zatorowego nadciśnienia płucnego. Riocyguat stosuje się również w leczeniu tętniczego nadciśnienia płucnego u pacjentów w 2–3 klasie czynnościowej WHO-FC/NYHA. Wśród głównych działań niepożądanych leku wymienia się niedociśnienie. Ze względu na ryzyko wystąpienia ciężkiej hipotonii, riocyguatu bezwzględnie nie należy łączyć z donorami tlenu azotu (np. monoazotanem izosorbidu) oraz inhibitorami PDE-5 [27, 103, 188].

2.1.5.5. Agonisty receptora prostacykliny IP

Ograniczenia stosowania doustnych prostanoidów związane z krótkim okresem półtrwania oraz niską biodostępnością skłoniły badaczy do poszukiwań nowego, doustnego leku o podobnej aktywności. W 2014 roku zakończono pomyślnie trzecią fazę badania klinicznego GRIPHON, w którym oceniono efektywność terapeutyczną nowego leku – seleksypagu. W 2015 roku związek został dopuszczony do leczenia przez FDA, a w 2016 roku – przez EMA [53]. Seleksypag jest tym samym najnowszym lekiem zarejestrowanym w terapii swoistej tętniczego nadciśnienia płucnego. Będąc selektywnym, nieprostanoidowym agonistą receptora prostacykliny IP, wykazuje działanie naczyniorozszerzające oraz antyproliferacyjne. Lek jest hydrolizowany w wątrobie do aktywnego metabolitu ACT-333679 (MRE-269), który działa 37-krotnie silniej niż związek macierzysty. Seleksypag jest selektywny w stosunku do receptorów IP i nie wpływa na inne receptory prostanoidów, np. EP, FP, DP. W rezultacie nie wykazuje m.in. działania skurczowego w obrębie naczyń krwionośnych oraz przewodu pokarmowego. W badaniach na modelach zwierzęcych wykazano, że seleksypag, w przeciwieństwie do analogów prostacykliny PGI₂, nie powoduje zjawiska tachyfilaksji. Jest zarejestrowany w Polsce pod nazwą Uptravi, w postaci tabletek powlekanych, w dawkach 0,2–1,6 mg, w leczeniu pacjentów w 2–3 klasie czynnościowej WHO-

FC/NYHA. Seleksypag może wywołać takie działania niepożądane jak bóle głowy, mięśni i stawów, zaczerwienienie twarzy, biegunkę, wymioty [32, 82]. Obecnie trzecią fazę badań klinicznych przechodzi ralinepag (ADP811), należący do najnowszej generacji doustnych nieprostanoidowych agonistów receptorów prostacykliny [89]. Efektywność terapeutyczna związku jest badana u chorych na tętnicze nadciśnienie płucne. Wyniki zakończonego badania drugiej fazy pokazały znaczącą redukcję PVR oraz poprawę wydolności wysiłkowej [187]. Jego mechanizm działania jest zbliżony do seleksypagu. Nowy związek cechuje dłuższy okres półtrwania (24 godziny), w większym stopniu hamuje on agregację płytek krwi oraz znacząco podwyższa poziom cAMP. Ralinepag wywiera silniejsze działanie wazodylatacyjne niż iloprost, treprostynil oraz seleksypag. Wyniki badań *in vitro* i na modelach zwierzęcych potwierdziły też działanie antyproliferacyjne nowej cząsteczki [78, 189].

Opisane wyżej leki swoiste stosuje się w monoterapii lub terapii skojarzonej. Terapia skojarzona umożliwia zastosowanie dwóch lub trzech leków z różnych klas, o różnych mechanizmach działania, co jest standardem w leczeniu nadciśnienia płucnego. Wyniki randomizowanych badań klinicznych wskazują na znaczną poprawę parametrów hemodynamicznych, wydolności wysiłkowej oraz rokowania pacjentów dzięki wdrożeniu terapii skojarzonej [24]. Może być ona stosowana wg schematu terapii początkowej (*up-front*) lub sekwencyjnej. Terapia sekwencyjna polega na dołączeniu do monoterapii drugiego leku. Terapię sekwencyjną stosuje się u pacjentów w 2–4 klasie czynnościowej, w przypadku niewystarczających efektów terapeutycznych, takich jak brak poprawy przeżywalności bądź wydolności wysiłkowej. Obecnie wszystkie dostępne w Polsce leki celowane są objęte refundacją w ramach Programu Lekowego Narodowego Funduszu Zdrowia. Nowy zakres świadczeń obowiązuje od 1 stycznia 2021 roku. Program jest przeznaczony dla pacjentów w 2–4 klasie WHO-FC/NYHA ze zdiagnozowanym i udokumentowanym tętniczym nadciśnieniem płucnym. Dodatkowo od 2015 roku riociguat jest refundowany we wskazaniu do stosowania w nieoperowalnym lub przetrwałym CTEPH. W nowym programie refundacją objęto także seleksypag. Obecny zakres świadczeń daje możliwość łączenia ze sobą leków z grupy prostanoidów, ERAs i PDE-5i w terapii dwulekowej lub trójkowej. Przeciwwskazane jest jednoczesne stosowanie inhibitorów PDE-5 z riociguatem lub bozentanu z innymi ERAs ze względu na ryzyko interakcji lekowych. W ramach terapii skojarzonej początkowej, u pacjentów w 3 klasie czynnościowej WHO-FC/NYHA stosuje się leki doustne, a w 4 klasie czynnościowej – połączenia leków doustnych z prostacykliną PGI₂, podawaną dożylnie, domięśniowo lub wziewnie. W przypadku braku poprawy lub pogorszenia stanu chorego, do schematu leczenia dodaje się kolejny – trzeci lek [159].

Kryteria włączenia do terapii dwulekowej lub trójkowej objętej programem lekowym NFZ obejmują m.in.:

- nieskuteczne lub źle tolerowane dotychczasowe leczenie schematem lekowym do stosowania w monoterapii,
- 4 klasę czynnościową nadciśnienia płucnego w momencie rozpoznania choroby lub pomimo dotychczasowego leczenia [159].

W ramach farmakoterapii uzupełniającej tętniczego nadciśnienia płucnego stosuje się leki działające nieswoiście na tętniczki płucne. Zmniejszają one objawy kliniczne choroby, ale nie mają wpływu na przeżywalność pacjentów. Chorzy mogą otrzymywać leki przeciwzakrzepowe i/lub leki moczopędne (spironolakton, furosemid, hydrochlorotiazyd) – zmniejszające objawy prawokomorowej niewydolności serca. U pacjentów z tachykardią i nadkomorowymi zaburzeniami rytmu serca stosuje się leki inotropowo dodatnie (np. digoksynę). Tlenoterapię wdraża się do leczenia, jeśli u chorych rozwinie się hipoksemia [186].

2.2. Kierunki poszukiwań nowych możliwości terapeutycznych w nadciśnieniu płucnym

Pomimo znacznego postępu w diagnostyce i farmakoterapii oraz rozwoju leczenia operacyjnego, wiele postaci nadciśnienia płucnego w dalszym ciągu pozostaje nieuleczalne. Obecnie stosowane leki swoiste, choć poprawiają jakość życia pacjentów i wydłużają czas przeżycia, nie powodują całkowitego odwrócenia powstałych zmian patomorfologicznych i hemodynamicznych. Z tego względu badacze poszukują nowych punktów uchwytu dla potencjalnych leków i nowych możliwości terapeutycznych. Trudności dostarcza wieloczynnikowy i nie w pełni poznany patomechanizm choroby. Złożona etiologia schorzenia skłania do opracowania terapii skojarzonych, opierających się na hamowaniu lub pobudzaniu wielu ścieżek sygnałowych, których zaburzenia obserwuje się w przebiegu nadciśnienia płucnego. Uwagę zwraca także brak zarejestrowanych leków, które istotnie ograniczałyby przebudowę ścian naczyń płucnych. Leki dostępne w ramach terapii swoistej działają głównie wazodylatacyjnie, wykazując mniejszy wpływ na zmiany przerostowe. Z tego względu poszukiwanie nowych możliwości leczenia nadciśnienia płucnego jest w dużym stopniu ukierunkowane na zahamowanie i/lub odwrócenie powstałych zmian patomorfologicznych, co mogłoby pozwolić na całkowite wyleczenie. Uwagę naukowców zwraca również pewne podobieństwo patomechanizmu tętniczego nadciśnienia płucnego do kancerogenezy. W rozwoju PAH, analogicznie do procesu nowotworzenia, obserwuje się dysfunkcję mitochondriów i nasilenie glikolizy tlenowej [160]. Dochodzi do nadmiernej migracji i proliferacji komórek, rozwoju oporności komórek na apoptozę, a także do zaburzenia szlaków sygnałowych związanych z czynnikami wzrostu (PDGF, EGF, FGF) oraz z kinazą aktywowaną mitogenami (MAPK).

Z tego powodu działanie niektórych leków przeciwnowotworowych, w szczególności leków antyproliferacyjnych, zostało poddane ocenie w kierunku potencjalnego wykorzystania w terapii tętniczego nadciśnienia płucnego [79, 185].

W kolejnych podrozdziałach (2.2.1–2.2.11) omówiono obecnie najpopularniejsze kierunki poszukiwań nowych szlaków sygnałowych w farmakoterapii nadciśnienia płucnego. Szlaki te mogą stanowić punkty uchwytu dla potencjalnych, nowych leków.

2.2.1. Układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS)

Wydzielanie reniny w nerkach aktywuje ogólnoustrojową kaskadę enzymatyczno-hormonalną zwaną układem renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS). Układ RAAS odpowiada m.in. za regulację ciśnienia krwi oraz gospodarkę wodno-elektrolitową organizmu. Zbadano także obecność układów renina-angiotensyna w obrębie serca, mózgu, nerek, naczyń krwionośnych oraz nadnerczy. U pacjentów z tętniczym nadciśnieniem płucnym może dochodzić do zwiększenia aktywności układu RAAS i tkankowych układów renina-angiotensyna [73]. Potwierdzono także związek między wzrostem tej aktywności a rozwojem PAH [22].

Pierwszym etapem aktywacji układu RAAS jest wydzielanie reniny, która przekształca powstały w wątrobie angiotensynogen w nieaktywny deka-peptyd – angiotensynę 1 (Ang-1). Następnie, za pośrednictwem enzymu konwertującego angiotensynę (ACE), powstaje główny efektor układu RAAS – angiotensyna 2 (Ang-2). Enzym ACE jest rozpowszechniony w tkankach płuc [22]. Konwersja Ang-1 do Ang-2 może również zachodzić pod wpływem chymazy obecnej m. in. w komórkach tucznych, mięśniach szkieletowych oraz w sercu. Dodatkowo ACE inaktywuje bradykininę oraz kalidynę – działające wazodylatacyjnie [129]. Nasiloną aktywność angiotensyny 2 w przebiegu nadciśnienia płucnego przyczynia się do przewagi procesów wazokonstrykcyjnych i proliferacyjnych. Angiotensyna 2 działa przez dwa typy receptorów: AT₁ i AT₂. Pobudzenie receptora AT₁ powoduje skurcz naczyń krwionośnych i wzrost resorpcji sodu w nerkach, co prowadzi do wzrostu ciśnienia krwi i objętości krwi krążącej. Działanie to jest nasilone przez jednoczesne wydzielanie aldosteronu w wyniku pobudzenia receptorów AT₁ w obrębie nadnerczy. Ponadto Ang-2 stymuluje proliferację i migrację komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych, prowadząc tym samym do ich przebudowy. Angiotensyna 2 przyczynia się do rozwoju procesów zapalnych i oksydacyjnych m.in. poprzez aktywację szlaku sygnałowego kinaz tyrozynowych oraz kinazy aktywowanej mitogenami. Uczestniczy także w rozwoju stresu oksydacyjnego przez wzmożoną produkcję reaktywnych form tlenu w następstwie pobudzenia oksydazy NADPH [36, 129]. Nadaktywność układu RAAS jest związana z rozwojem przewlekłego stanu zapalnego w obrębie naczyń płucnych, do którego dochodzi w przebiegu nadciśnienia płucnego. Wynika to z pobudzenia przez angiotensynę 2 mediatorów prozapalnych, takich jak interleukiny IL-1 i IL-6, TNF- α , TGF- β czy białko chemotaktyczne monocytów (MCP-1). Ponadto dochodzi do zwiększenia

aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, co skutkuje nasileniem stresu oksydacyjnego i procesu zapalnego [36].

Uwagę badaczy poszukujących nowych możliwości terapeutycznych w leczeniu nadciśnienia płucnego zwraca efekt pobudzenia receptorów AT₂. Może to skutkować rozszerzeniem naczyń płucnych, zahamowaniem procesu proliferacji i migracji komórek naczyń krwionośnych oraz miocytów, a także redukcją stanu zapalnego oraz stresu oksydacyjnego. Wymienione działania wpływają korzystnie na ograniczenie rozwoju tętniczego nadciśnienia płucnego. Alternatywny szlak przemian Ang-2 w układzie RAAS jest związany z jej przekształceniem do postaci Ang (1-7). Konwersja może zachodzić pod wpływem enzymów: neprylizyny, endopeptydazy proliłowej, karboksypeptydazy proliłowej lub enzymu konwertującego angiotensynę 2 (ACE2), który jest homologiczny z ACE. Angiotensyna (1-7) działa przez pobudzenie związanego z białkiem G receptora Mas i hamuje aktywność Ang-2, wykazując działanie przeciwwazopryężające, antyproliferacyjne oraz wazodylatacyjne. W badaniach eksperymentalnych dowiedziono, że zwiększony poziom ACE2 oraz Ang (1-7) zapobiega hipertrofii i włóknieniu miocytów. Może to wynikać m.in. z korzystnego wpływu na metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP), które predysponują do przebudowy mięśnia sercowego [129, 171]. Określenie udziału kaskady RAAS w patomechanizmie tętniczego nadciśnienia płucnego pozwoliło na identyfikację nowych punktów uchwytu dla potencjalnych leków w terapii PH.

W oparciu o obecny stan wiedzy zaproponowano strategię terapeutyczną opartą na wzmocnieniu osi ACE2–Ang(1-7)–Mas, przy zahamowaniu wpływu osi ACE–Ang-2–AT₁. Ma to na celu przywrócenie równowagi pomiędzy zaburzonymi procesami wazokonstrykcyjnymi a wazodylatacyjnymi oraz zahamowanie postępu choroby. W badaniach eksperymentalnych z zakresu nadciśnienia płucnego oceniano poddano związki regulujące aktywność układu RAAS, takie jak aktywatory ACE2, analogi Ang (1-7), inhibitory ACE, antagoniści receptorów AT₁ oraz agonisty receptorów AT₂ [96].

2.2.2. Kinazy tyrozynowe (TKs)

Kinazy tyrozynowe warunkują potranslacyjną fosforylację białek i wpływają na mechanizmy kontrolujące procesy wzrostu, różnicowania, proliferacji, migracji, przemian metabolicznych i apoptozy komórek. Zarówno w przebiegu tętniczego nadciśnienia płucnego jak i wielu chorób nowotworowych może dochodzić do nasilenia aktywności kinaz tyrozynowych oraz ich receptorów. Stało się to punktem wyjścia do podjęcia prób eksperymentalnych z wykorzystaniem leków stosowanych dotychczas w terapii ostrych i przewlekłych białaczek szpikowych, raka trzustki czy jelita grubego. Mechanizm działania inhibitorów kinaz tyrozynowych polega na hamowaniu kinaz Bcr-Abl oraz receptorów TK. Receptory TKs to transbłonowe glikoproteiny, przez które działają czynniki wzrostu i inne zewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnałowe. W przebiegu tętniczego

nadciśnienia płucnego może dochodzić do nasilenia aktywności receptorów kinaz tyroynowych, takich jak receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) i płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGFR α i β) oraz receptor czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR) [99, 155]. Wyniki badań eksperymentalnych i klinicznych świadczą o dużej roli wymienionych mediatorów w rozwoju PAH, a zwłaszcza w przebudowie naczyń płucnych. Płytkopochodny czynnik wzrostu jest wytwarzany przez wiele typów komórek, w tym przez komórki mięśni gładkich i fibroblasty naczyń płucnych. Ma strukturę dimerycznej cząsteczki, która jest zbudowana z dwóch polipeptydowych łańcuchów połączonych ze sobą mostkami disiarczkowymi. Obecnie znane są cztery izoformy łańcuchów: PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C i PDGF-D. Płytkopochodny czynnik wzrostu wywiera działanie przez aktywację dwóch błonowych receptorowych kinaz tyrozynowych: PDGF- α i PDGF- β , które po przyłączeniu PDGF ulegają autofosforylacji. Reakcja ta pobudza wiele szlaków wewnątrzkomórkowych, które regulują procesy wzrostu, proliferację, migrację i przeżycie komórek. Są to m.in. szlaki związane z Ras/MAPK, PI3K, PLC- γ , Src, kinazą Akt czy z omawianym wcześniej układem RAAS [6]. W oparciu o obecny stan wiedzy sugeruje się, że inhibitory kinaz tyrozynowych (TKI) jako leki antyproliferacyjne mogą przeciwdziałać zmianom przerostowym w przebiegu tętniczego nadciśnienia płucnego [139].

2.2.3. Szlak sygnałowy ROS/RNS

Wyniki dotychczasowych badań świadczą o udziale reaktywnych form tlenu i azotu w patogenezie nadciśnienia płucnego. Badacze wskazują, że obserwowana w przebiegu choroby nadprodukcja ROS oraz RNS może odgrywać rolę w skurczu i w przebudowie naczyń płucnych. Do reaktywnych form tlenu (ROS) zalicza się: nadtlenek (O_2^-), nadtlenek wodoru (H_2O_2), rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) i anion podchlorynowy (OCl^-). Reaktywne formy tlenu biorą udział w wielu procesach komórkowych, takich jak wzrost, proliferacja, apoptoza czy ekspresja genów. Ich nadprodukcja prowadzi do rozwoju stresu oksydacyjnego, który definiuje się jako brak równowagi pomiędzy produkcją reaktywnych form tlenu a procesami antyoksydacyjnymi. Stres oksydacyjny aktywuje reakcje utleniania, które mogą doprowadzić do uszkodzenia wielu struktur komórkowych, powodując różne dysfunkcje oraz mutacje genów [148]. Wskazuje się, że mutacje genu BMPR2, rozpoznane w patogenezie dziedzicznego i idiopatycznego tętniczego nadciśnienia płucnego, mogą być związane z nadprodukcją ROS. W świetle badań nad patogenezą nadciśnienia płucnego wykazano liczne powiązania pomiędzy działaniem reaktywnych form tlenu a rozwojem schorzenia. Ich aktywacja wpływa także na zmniejszenie dostępności tlenu azotu, upośledzenie funkcji wazodylatacyjnej naczyń płucnych, nasilenie procesów prozapalnych i proliferacyjnych. Wśród komórkowych źródeł reaktywnych form tlenu wyróżnia się rodzinę enzymów NADPH (Nox), mitochondria, oksygenazy lipidowe (cyklooksygenaza, lipooksygenaza, cytochrom P-450), syntazy tlenu azotu oraz oksydazę ksantynową [63].

Do reaktywnych form azotu (RNS) należy m.in. peroksynitryt (ONOO^-), który powstaje w wyniku reakcji wolnego rodnika tlenu azotu z nadtlakiem. Jego toksyczne działanie jest związane z reakcją nitrowania białek wielu szlaków sygnałowych, co prowadzi do upośledzenia ich funkcji. Przykładowo, nitrowanie kinazy białkowej G zaburza jej funkcje, w tym działanie wazodylatacyjne. Wykazano także zdolność peroksynitrytu do aktywacji ERK, p38 MAPK oraz kinazy białkowej C. Enzymy te biorą udział w proliferacji komórek śródbłonna i mięśni gładkich naczyń płucnych, co może wskazywać na udział ONOO^- w patomechanizmie nadciśnienia płucnego [60, 183].

W badaniach na modelach zwierzęcych tętniczego nadciśnienia płucnego wykazano zwiększoną aktywność enzymów Nox2 oraz Nox4, które mogą być odpowiedzialne za wytwarzanie ROS w ścianie naczyń płucnych. Rodzina enzymów Nox obejmuje siedem transbłonowych oksydoreduktaz (Nox1–5 oraz Duox1–2). Enzym Nox4 odpowiada za różnicowanie i proliferację komórek w obrębie mięśni gładkich w warunkach hipoksji, a Nox2 kontroluje napięcie naczyń płucnych oraz procesy wzrostu komórek, angiogenezy i zapalenia w śródbłonie naczyniowym [63, 66]. Sugeruje się, że aktywacja omawianych izoenzymów prowadzi do indukcji szlaków sygnałowych z udziałem MAPK oraz NF- κ B. Wykazano także, że Nox mogą być aktywowane przez inne związki, które są badane pod kątem udziału w patomechanizmie nadciśnienia płucnego. Wśród nich wymienia się: serotoninę, tromboksan A_2 , angiotensynę 2, czynnik TNF- α oraz TGF- β . Z tych względów podjęto próbę wykorzystania enzymów Nox jako punktów uchwytu dla nowej grupy leków w terapii nadciśnienia płucnego [183].

Badania eksperymentalne nad patogenezą PH wskazują na upośledzenie aktywności dysmutazy nadtlakowej (SOD) w mitochondriach komórek naczyń płucnych [60]. Enzym ten przekształca anion O_2^- do nadtlaku wodoru. Zmniejszona ekspresja SOD prowadzi do nadprodukcji O_2^- i nasilenia jego toksycznego działania. Nie bez znaczenia pozostaje również ograniczenie wytwarzania fizjologicznego nadtlaku wodoru. H_2O_2 , poprzez wpływ na liczne szlaki sygnałowe, np. szlak kinazy AMPK, bierze udział w kontroli napięcia naczyń płucnych, procesów proliferacji i apoptozy [183].

Wśród potencjalnych punktów uchwytu dla nowych leków w terapii nadciśnienia płucnego, wymienia się inne źródło ROS – śródbłonkową syntazę tlenu azotu niesprężoną ze swoim kofaktorem lub substratem (*uncoupled* eNOS). Enzym ten aktywuje produkcję O_2^- , przez co dochodzi do zmniejszenia syntezy i dostępności NO. Uważa się, że niesprężona eNOS odgrywa istotną rolę w rozwoju wielu chorób układu sercowo-naczyniowego, w tym nadciśnienia płucnego. U osób z tętniczym nadciśnieniem płucnym aktywność niesprężonej eNOS może być zwiększona [3].

2.2.4. Stan zapalny

Zainteresowanie naukowców poszukujących nowych możliwości terapeutycznych w nadciśnieniu płucnym, skupia się również na rozwoju stanu zapalnego w patogenezie schorzenia. Od ponad dwóch dekad badacze próbują znaleźć odpowiedź na pytanie czy stan zapalny jest przyczyną czy konsekwencją rozwoju PH [194]. Brak jednoznacznej odpowiedzi może wynikać z różnych patomechanizmów choroby w zależności od rozpatrywanej postaci klinicznej. O udziale stanu zapalnego w rozwoju i przebiegu PH może świadczyć obecność komórek zapalnych w obrębie tętniczek płucnych, takich jak makrofagi, komórki dendrytyczne, limfocyty T i B, komórki tuczne. Stan zapalny rozwija się także w obrębie mięśnia sercowego u osób z PAH. W krążeniu systemowym chorych może dochodzić do podwyższenia poziomu niektórych cytokin (IL-1B, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α) i chemokin (CCL2, CCL5, CXCL3). Sugeruje się, że niektóre komórki zapalne biorą udział w procesie przebudowy naczyń płucnych, pobudzając proliferację mięśni gładkich (np. IL-1, IL-6) oraz hamując apoptozę komórek śródbłonna (np. TNF- α) [158, 168].

2.2.5. Kinaza RhoA/ROCK

Istotną rolę w patomechanizmie nadciśnienia płucnego przypisuje się także szlakowi kinazy RhoA/ROCK. Kinaza RhoA/ROCK pobudza agregację płytek krwi oraz procesy prozapalne w obrębie naczyń krwionośnych. Dotychczasowe badania wskazują na związek pomiędzy szlakiem RhoA/ROCK a zaburzeniami ścieżek sygnałowych związanych z tlenkiem azotu oraz endoteliną-1. Wyniki prób eksperymentalnych pokazują negatywny wpływ nasilonego przekazywania RhoA/ROCK na ekspresję NOS, aktywność eNOS oraz dostępność tlenu azotu. Inne badania wskazują na związek pomiędzy wzmożoną aktywnością omawianego szlaku a podwyższonym poziomem endoteliny-1 w przebiegu nadciśnienia płucnego [11, 95].

Białka RhoA to małe, monomeryczne GTP-azy, należące do nadrodziny białek Ras. Są zaangażowane w różne aktywności komórkowe, takie jak skurcz mięśni gładkich, organizacja cytoszkieletu, proliferacja, migracja i apoptoza komórek, przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej, a także ekspresja genów. Białka RhoA oscylują między postacią aktywną – związaną z GTP i nieaktywną – związaną z GDP. Ich efekтором jest kinaza serynowo/treoninowa zależna od Rho (ROCK), należąca do rodziny kinaz AGC (kinazy proteinowe A, G, C). Pobudzenie ROCK może nastąpić pod wpływem kwasu arachidonowego lub wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} [46]. Obecnie wyróżnia się dwie izoformy ROCK: ROCK1(β) oraz ROCK2(α). Kinazy ROCK katalizują fosforylację łańcuchów lekkich miozyny, zmniejszając tym samym aktywność ich fosfatazy (MLCP), co prowadzi do skurczu mięśni gładkich [11, 43, 83].

Inhibicja szlaku sygnałowego RhoA/ROCK stała się kolejnym, potencjalnym punktem uchwytu dla nowej grupy leków w farmakoterapii nadciśnienia płucnego.

Badacze wskazują, że zahamowanie aktywności opisywanego układu może przyczynić się do relaksacji naczyń płucnych oraz do ograniczenia ich przebudowy [100].

Do inhibitorów układu RhoA/ROCK należą statyny. To dobrze znana grupa leków stosowana z powodzeniem w leczeniu hipercholesterolemii oraz w prewencji pierwotnej i wtórnej chorób układu sercowo-naczyniowego. Uwagę zwraca ich działanie plejotropowe. Mechanizm działania statyn opiera się na kompetycyjnej inhibicji reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMG-CoA), która prowadzi do zahamowania przekształcenia kwasu β -hydroksy- β -metyloglutarylowego do kwasu mewalonowego, ograniczenia syntezy izoprenoidów i biosyntezy cholesterolu. W konsekwencji potranslacyjna prenylacja białka RhoA zostaje zahamowana, co wpływa negatywnie na przekąźnictwo układu RhoA/ROCK [118]. Wykazano, że statyny poprawiają funkcje śródbłonna naczyń krwionośnych poprzez zwiększenie aktywności śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) oraz indukcję apoptozy komórek śródbłonna, w wyniku aktywacji kaspazy-3. Hamują również proliferację komórek mięśni gładkich, tłumią proces zapalny, wykazują aktywność antyoksydacyjną, zapobiegają zakrzepicy *in situ* oraz ograniczają nadmierną ekspresję genu BMPR2. Wyniki licznych badań sugerują, że terapia skojarzona statyn z lekami zarejestrowanymi w tętniczym nadciśnieniu płucnym może korzystnie wzmocnić efekty ich działania [101, 130, 197].

2.2.6. Układ serotonergiczny

Serotonina (5-HT) jest endogenną aminą, wytwarzaną w mózgu, płytkach krwi oraz w komórkach enterochromatofilych jelit, gdzie pełni rolę neuroprzekaźnika [105]. Udział składowych układu serotonergicznego w patomechanizmie tętniczego nadciśnienia płucnego został potwierdzony w badaniach eksperymentalnych i klinicznych. Pierwsze przypuszczenia o związku serotoniny z rozwojem PAH pojawiły się w latach sześćdziesiątych po wprowadzeniu na rynek leków anoreksygennych, w tym fenfluraminy, które podnosiły stężenie 5-HT w obrębie krążenia płucnego [2]. Zwiększoną liczbę przypadków osób chorych na tętnicze nadciśnienie płucne powiązano ze stosowaniem fenfuraminy.

Serotonina powstaje w wyniku hydrolizy L-tryptofanu pod wpływem działania hydroksylazy tryptofanowej (Tph) w komórkach śródbłonna naczyń płucnych. Powoduje skurcz tętnic płucnych poprzez pobudzenie receptorów serotonergiczych, głównie 5-HT_{1B} oraz 5-HT_{2A}. Serotonina jest przenoszona do komórek mięśni gładkich tętnic płucnych przez transporter serotoniny (5-HTT, SERT). Działając przez kinazę RhoA i jej efektor ROCK i/lub reaktywne formy tlenu, 5-HT powoduje skurcz naczyń oraz proliferację warstwy śródbłonkowej, mięśni gładkich i fibroblastów. Podwyższony poziom serotoniny sprzyja wzmożonej agregacji płytek krwi i miejscowemu wykrzepianiu w naczyniach. U chorych na tętnicze nadciśnienie płucne zaobserwowano zwiększoną aktywność Tph w komórkach mięśni gładkich i śródbłonna naczyń płucnych oraz podwyższony poziom serotoniny w osoczu krwi. Dodatkowo w badaniach na zwierzętach wykazano nasilone

działanie transportera serotoniny w komórkach mięśni gładkich tętnic płucnych (PASMCs) [18, 56, 57]. Składowe układu serotonergicznego, biorące udział m. in. w syntezie i transporcie 5-HT, stały się potencjalnymi punktami uchwytu dla nowych leków w terapii nadciśnienia płucnego. Badania eksperymentalne w tym zakresie dotyczą możliwości hamowania nadmiernego przekazywania serotonergicznego. W obszarze zainteresowań badaczy znalazły się selektywne/nieselektywne antagonisty receptorów 5-HT_{1B} i 5-HT_{2A} oraz inhibitory Tph [85]. Wskazuje się także na korzyści jednoczesnej blokady receptorów 5-HT_{1B} oraz transportera serotoniny. Wynika to z wzajemnego krzyżowania się komórkowych szlaków pobudzenia 5-HT_{1B} oraz SERT, w których pośredniczy kinaza ROCK [105].

2.2.7. Receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów typu gamma (PPAR γ)

Receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów to czynniki transkrypcyjne należące do receptorów jądrowych. Ich rola polega głównie na kontroli przemian kwasów tłuszczowych oraz glukozy. Dotychczas poznano trzy izotypy PPAR: α , β , γ , które mogą występować w różnych tkankach i są aktywowane przez różne związki [182]. Uwagę naukowców badających patomechanizm nadciśnienia płucnego zwraca szczególnie szlak sygnałowy związany z receptorami aktywowanymi proliferatorami peroksysomów typu γ , które wpływają na procesy komórkowe, takie jak proliferacja i różnicowanie komórek. Aktywatory PPAR γ stały się celem terapii przeciwnowotworowych, ponieważ ograniczają proliferację komórek nowotworowych i wpływają na procesy proapoptyczne. Ligandy PPAR γ hamują też procesy angiogenezy [88]. Wyniki badań przedklinicznych i klinicznych dowodzą, że szlaki sygnałowe kontrolowane przez PPAR γ mają udział w patomechanizmie nadciśnienia płucnego. W tkankach płuc zmienionych chorobowo geny kodujące receptory typu γ miały zmniejszoną ekspresję. Przeprowadzone próby eksperymentalne wskazują, że aktywacja opisywanych receptorów może prowadzić do relaksacji mięśni gładkich naczyń płucnych. Wynika to z pobudzenia produkcji NO i zmniejszonego uwalniania ET-1 [88, 122, 179].

2.2.8. Przekazywanie β -adrenergiczne

Receptory β -adrenergiczne stały się kolejnym, nowym punktem uchwytu w terapii nadciśnienia płucnego. U osób z PH może dochodzić do zwiększenia aktywności układu współczulnego oraz do zmniejszenia liczby i wrażliwości receptorów β -adrenergicznych (regulacja w dół). Skutkuje to rozwojem nadciśnienia tętniczego, zwiększonym zapotrzebowaniem mięśnia sercowego na tlen czy też jego przebudową [153]. Uzasadnienie podjęcia prób przedklinicznych i klinicznych z wykorzystaniem tej grupy leków jest związane z ich działaniem inotropowym i przeciwdziałaniem arytmii nadkomorowym. Wskazuje się również na korzystną normalizację zużycia tlenu przez mięsień sercowy, co jest szczególnie istotne przy współistniejącej

prawokomorowej niewydolności serca, obserwowanej w zaawansowanym stadium schorzenia [75]. Dotychczasowe badania pokazują, że pobudzenie receptorów β_3 zapobiega neurohormonalnej przebudowie mięśnia sercowego [168]. Sugeruje się zastosowanie w terapii PAH leków selektywnie blokujących receptory β_1 , zwłaszcza należących do trzeciej generacji, dodatkowo pobudzających receptory β_3 oraz szlak syntezy NO.

2.2.9. Modulacja czynności mitochondriów

Obserwowana w przebiegu nadciśnienia płucnego nadmierna proliferacja komórek mięśni gładkich naczyń płucnych oraz ich oporność na apoptozę, może być związana z upośledzeniem funkcji mitochondriów. Mitochondria pełnią istotną rolę w kontroli przeżywalności komórek, warunkowanej produkcją ATP. Apoptoza komórek zależna od mitochondriów wpływa na utrzymanie homeostazy, a jej supresja sprzyja proliferacji komórek. W mięśniach gładkich tętnic płucnych u osób z PAH może dochodzić do hiperpolaryzacji błony mitochondriów oraz do ograniczenia procesu utleniania glukozy i oddychania komórkowego. Podobnie jak w komórkach nowotworowych obserwuje się wtórne nasilenie glikolizy (tzw. efekt Warburga), która sprzyja proliferacji [152]. Jak dowodzą wyniki licznych badań nad patogenezą PAH, ograniczenie reakcji utleniania glukozy jest związane z zahamowaniem aktywności dehydrogenazy pirogronianowej (PDH). Opisano kilka mechanizmów inhibicji tego enzymu. Są to: indukcja kinazy dehydrogenazy pirogronianowej (PDK), hamowanie sirtuiny 3 (SIRT3) – głównej deacetylazy mitochondrialnej czy hamowanie uwalniania białka 2 (UCP2). Ten ostatni mechanizm prowadzi do zmniejszenia poziomu mitochondrialnego wapnia oraz do nasilenia β -oksydacji kwasów tłuszczowych [134]. Dodatkowo proces zapalny i hipoksja mogą powodować stres retikulum endoplazmatycznego (ER), czyli zaburzenie homeostazy retikulum endoplazmatycznego w wyniku nagromadzenia niezwinionych lub nieprawidłowo pofalowanych białek. Dochodzi wówczas do zwiększenia odległości pomiędzy ER a mitochondrium, co skutkuje ograniczeniem transportu jonów Ca^{2+} i aktywacją kinazy dehydrogenazy pirogronianowej. Zahamowanie utleniania glukozy i nasilenie przemian beztlenowych promuje procesy proliferacji komórek i ogranicza apoptozę. Związki, które pobudzają PDH i ograniczają przemiany beztlenowe mogą potencjalnie przeciwdziałać przebudowie tętnic płucnych w PH. Wymaga to jednak dalszego potwierdzenia w próbach przedklinicznych i klinicznych [168].

2.2.10. Mechanizmy epigenetyczne

Upośledzenie funkcji mitochondriów nie jest jednym zaburzeniem metabolicznym, które może leżeć u podstaw rozwoju nadciśnienia płucnego. Zainteresowanie badaczy wzbudzą również modyfikacje epigenetyczne, które odgrywają istotną rolę w patogenezie różnych chorób, głównie nowotworowych i neurodegeneracyjnych oraz w procesach starzenia. Epigenetykę w ogólnym ujęciu definiuje się jako dziedziczną zmianę aktywności oraz ekspresji genów, która zachodzi bez zmiany sekwencji DNA. Innymi słowy, modyfikacja epigenetyczna to zmiana w fenotypie komórki, która nie jest wynikiem zmian w sekwencji kodu genetycznego. Modyfikacje te mogą dotyczyć metylacji DNA oraz zmiany struktury i funkcji chromatyny w następstwie acetylacji/deacetylacji histonów [37]. Metylacja DNA mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej SOD2 może prowadzić do zmniejszenia jej ekspresji w przebiegu tętniczego nadciśnienia płucnego i tym samym spowodować zmniejszoną produkcję H_2O_2 i zwiększoną ekspresję czynnika indukowanego hipoksją (HIF-1 α). Zmiany te powodują nasilenie procesu proliferacji i ograniczenie apoptozy w obrębie komórek mięśni gładkich tętnic płucnych [7]. Sugeruje się, że zahamowanie procesu metylacji DNA dysmutazy ponadtlenkowej SOD2 może stanowić nową opcję w leczeniu PAH.

Innym potencjalnym punktem uchwytu dla nowych leków mogą być deacetylazy histonów (HDAC). Histony to białka zasadowe, które wraz z DNA tworzą strukturę chromatyny. Najczęstszą modyfikacją histonów jest ich acetylacja pod wpływem acetylotransferaz histonowych. Proces deacetylacji jest katalizowany przez deacetylazy histonowe. Enzymy te odrywają istotną rolę w epigenetycznej regulacji ekspresji genów, które wpływają na różne szlaki sygnałowe warunkujące procesy komórkowe, cykl komórkowy, proces angiogenezy oraz apoptozę. Zwiększoną ekspresję HDAC obserwuje się w przebiegu chorób nowotworowych oraz chorób o podłożu zapalnym. Wyniki licznych prób eksperymentalnych wskazują również, że HDAC mogą przyczyniać się do rozwoju nadciśnienia płucnego. Wśród proponowanych możliwości w terapii PH wymienia się inhibitory deacetylazy histonów (HDACi). Związki te mogą mieć korzystny wpływ na ograniczenie przebudowy mięśnia prawej komory serca oraz ścian naczyń płucnych. Wynika to ze wspomnianego już hamowania procesów proliferacji i angiogenezy oraz indukowania apoptozy komórek naczyń płucnych [37]. Próby eksperymentalne dowodzą także, że HDACi mogą zmniejszać poziom ROS oraz ekspresję NADPH [38].

2.2.11. Inne szlaki sygnałowe

Adenozyna to substancja rozszerzająca naczynia, stosowana alternatywnie w ostrym tęście wazoreaktywności u chorych na nadciśnienie płucne. Działa przez cztery typy receptorów: A_1 , A_{2A} , A_{2B} oraz A_3 , które są sprzężone z białkiem G. Są one obecne w sercu, w śródbłonku naczyń, w fibroblastach oraz w miocytach. Pobudzenie receptora A_{2A} powoduje rozszerzenie naczyń płucnych, aktywuje śródbłonkową syntazę tlenu azotu i zwiększa dostępność NO oraz hamuje

aktywność szlaku RhoA/ROCK. Wyniki prób eksperymentalnych pokazują, że aktywacja receptorów A_{2A} ogranicza migrację fibroblastów i agregację płytek krwi. Sugeruje się, że pobudzenie receptorów A_{2A} przyczynia się do ograniczenia stanu zapalnego w obrębie naczyń płucnych. Ma to związek ze zmniejszeniem ekspresji czynnika NF- κ B oraz ze zmniejszonym uwalnianiem cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α i IL-1 β [5, 128]. Stwarza to możliwość wykorzystania agonistów receptorów A_{2A} w leczeniu nadciśnienia płucnego.

Endogenne peptydy wazoaktywne odgrywają istotną rolę w patogenezie wielu chorób układu sercowo-naczyniowego, w tym nadciśnienia płucnego. Związki te biorą udział w kontroli napięcia naczyniowego i gospodarki wodno-elektrolitowej. Wśród nowych cząsteczek o potencjalnym zastosowaniu w terapii PH wymienia się m.in.: peptydy natriuretyczne (NPs), wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP) oraz adrenomedulinę (AM). Dotychczas poznano trzy główne peptydy natriuretyczne: przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ANP), peptyd natriuretyczny typu B (BNP) oraz typu C (CNP). NPs działają przez dwa typy receptorów: NPR-A oraz NPR-B, które są sprzężone z białkiem G. Ich aktywacja zwiększa wewnątrzkomórkowe stężenie cGMP. Peptydy natriuretyczne wykazują działanie wazodylatacyjne, antyproliferacyjne oraz przeciwzapalne. Ich wykorzystanie jako potencjalnych leków w nadciśnieniu płucnym może być jednak trudne ze względu na krótki okres półtrwania oraz niską biodostępność po podaniu doustnym. Z tego powodu prowadzone są badania nad opracowaniem bardziej stabilnych form podawania peptydów natriuretycznych (liposomy czy plastry transdermalne) [26, 157, 168].

Adrenomedulina (AM) jest polipeptydem rozpowszechnionym m. in. w obrębie płuc, serca, nerek. Działa przez swoiste receptory sprzężone z białkiem G. Jest produkowana i wydzielana przez śródbłonek oraz komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Możliwe wykorzystanie adrenomeduliny jako leku w terapii nadciśnienia płucnego wynika z jej działania plejotropowego. AM działa wazodylatacyjne, diuretyczne oraz natriuretyczne. Aktywność naczyniorozszerzająca peptydu opiera się na wzroście wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP, aktywacji kanałów potasowych i hiperpolaryzacji błony mięśniowej naczyń płucnych. Ponadto adrenomedulina aktywuje eNOS oraz szlak PIK3/Akt. Wyniki badań wskazują również na korzystne działanie antyproliferacyjne adrenomoduliny w obrębie serca i naczyń płucnych oraz na hamowanie stresu oksydacyjnego [76].

Wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP) działa przez dwa typy receptorów: VPAC1 oraz VPAC2, które są sprzężone z białkiem G. Pobudzenie receptorów VIP wpływa na zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP i cGMP, co skutkuje rozszerzeniem naczyń płucnych. W badaniach eksperymentalnych analogi VIP wykazywały działanie przeciwzapalne, antyproliferacyjne oraz przeciwzakrzepowe. U pacjentów z tętniczym nadciśnieniem płucnym może dochodzić do zmniejszenia poziomu wazoaktywnego peptydu jelitowego w krążeniu systemowym oraz płucnym, a także do nasilenia ekspresji receptorów VIP w obrębie tętnic płucnych. Uzasadnia

to zbadanie efektywności terapeutycznej wazoaktywnego peptydu jelitowego i jego analogów w farmakoterapii nadciśnienia płucnego [156].

Zainteresowanie badaczy zwraca także inhibitor fibrynolizy aktywowany trombiną (TAFI). Jest to glikoproteina produkowana w wątrobie i aktywowana w wyniku interakcji pomiędzy trombiną i trombomoduliną. TAFI hamuje proces fibrynolizy. U osób z przewlekłym zakrzepowozatorowym nadciśnieniem płucnym może dochodzić do podwyższenia osoczkowego poziomu TAFI, co przyczynia się do powstawania zakrzepów w tętnicach płucnych. Stąd sugeruje się wykorzystanie inhibitorów TAFI w leczeniu osób z CTEPH [169, 205].

W rozwoju nadciśnienia płucnego dochodzi do zaburzeń w obrębie wielu szlaków sygnałowych, które mogą być wzajemnie ze sobą powiązane. Złożona etiologia i wieloczynnikowy charakter schorzenia wskazują, że skuteczność przyszłych terapii może zależeć od wpływu leków na różne szlaki biochemiczne i typy komórek. Znajomość patomechanizmu nadciśnienia płucnego, umożliwia nie tylko optymalizację dotychczasowego leczenia, ale stanowi także fundament badań służących opracowaniu nowych cząsteczek – potencjalnych leków. Poszukiwaniom punktów uchwytu dla nowych substancji służą badania przedkliniczne.

2.3. Badania przedkliniczne

Badania przedkliniczne są istotnym etapem rozwoju każdego leku i wpływają na podjęcie decyzji o dalszych próbach klinicznych. Służą m. in. ocenie właściwości farmakologicznych, farmakokinetycznych oraz toksyczności potencjalnych leków, tym samym – wstępnej ocenie efektywności i bezpieczeństwa stosowania. Próby przedkliniczne w ocenie leku trwają zwykle od 2 do 5 lat [150]. Eksperymenty są prowadzone w warunkach *in vitro* na modelach komórkowych oraz *in vivo* na modelach zwierzęcych zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej oraz w świetle regulacji prawnych określonych m. in. w ustawie o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych z 15 stycznia 2015 roku (Dz.U. 2015 poz. 266) [90]. Modele zwierzęce stosowane w badaniach eksperymentalnych służą odzwierciedleniu procesów fizjologicznych lub patologicznych zachodzących u ludzi. Uwagę zwraca ich użyteczność w badaniach nad patogenezą chorób oraz przydatność w poszukiwaniu nowych szlaków sygnałowych, których zaburzenia leżą u podstaw rozwoju wielu schorzeń. Wyjaśnienie etiologii, podłoża molekularnego oraz fizjologicznego chorób dostarcza wiedzy niezbędnej do opracowania struktury i właściwości terapeutycznych nowych leków. Zastosowanie modeli zwierzęcych pozwala na prowadzenie badań w sposób, który nie byłby możliwy u ludzi ze względu na procedury inwazyjne. Większość gatunków zwierząt cechuje krótszy czas życia w porównaniu do człowieka. Umożliwia to pozyskanie istotnych informacji dotyczących wpływu badanych leków na poszczególne etapy cyklu życia zwierząt oraz na ich potomstwo. Oczekuje się, aby etiologia i fenotyp choroby w modelu zwierzęcym były odwzorowaniem schorzenia

występującego u ludzi. Dotychczas nie opracowano modeli, które całkowicie spełniają te wymogi. Wynika to m. in. z różnic międzygatunkowych odnoszących się do fizjologii i procesów biotransformacji ksenobiotyków, jakie zachodzą u zwierząt doświadczalnych i ludzi. Ponadto złożona i nie do końca poznana etiologia wielu chorób powoduje, że modele zwierzęce pozwalają na częściowe odwzorowanie procesu patologicznego. Wybór organizmu modelowego jest podyktowany wieloma czynnikami, takimi jak podobieństwo genetyczne, czynniki ekonomiczne i etyczne. Najwięcej wspólnych cech biologicznych z organizmem człowieka ma szympan. Z uwagi na względy etyczne i wysokie koszty prowadzenia eksperymentów, zwierzęta te są rzadko wykorzystywane w badaniach. Te najczęściej prowadzi się na gryzoniach, a w szczególności na szczurach i myszach. Wynika to z szybkiego wzrostu, dużej płodności, małego rozmiaru zwierząt i niskich kosztów prowadzenia eksperymentów. Ze względu na rodzaj prowadzonej hodowli można wyróżnić np. szczepy wsobne lub niekrewniacze, a także modyfikowane genetycznie, kongeniczne i zwierzęta hybrydowe. Odmiany te są zróżnicowane pod względem genetycznym i fenotypowym [135, 162, 201].

Wyróżnia się następujące rodzaje modeli zwierzęcych:

- indukowane,
- spontaniczne,
- modyfikowane genetycznie,
- ujemne,
- sieroce.

W badaniach przedklinicznych najczęściej stosuje się modele indukowane, które opierają się na sztucznym „wytworzeniu” choroby. Fenotyp obrazujący badane schorzenie można uzyskać przez ingerencję chirurgiczną (np. banding tętnicy płucnej), wdrożenie odpowiedniej diety (np. wysokocholesterolowej) czy modyfikacje warunków środowiskowych (np. ekspozycja na przewlekłe niedotlenienie). Modele indukowane mogą się opierać na wywołaniu choroby nowotworowej u zwierząt laboratoryjnych poprzez zastosowanie mutagenów lub wszczepienie komórek nowotworowych [201].

W badaniach z zakresu farmakologii eksperymentalnej często wykorzystuje się modele spontaniczne, w których obserwuje się samoistny rozwój choroby w wyniku określonych mutacji. Przykładowo, badania nad cukrzycą i otyłością prowadzi się na szczepach myszy z upośledzonym wydzielaniem leptyny (*ob/ob*) lub brakiem czynnych receptorów leptyny (*db/db*). Próby eksperymentalne z zakresu nadciśnienia tętniczego mogą być prowadzone z udziałem szczurów SHR, u których choroba rozwija się samoistnie czy też z udziałem sódowrażliwych szczurów Dahl SS (ang. *salt-sensitive*) [196].

Modyfikacje genetyczne zapewniają wywołanie określonych cech przez wprowadzenie do genomu fragmentów DNA lub ich usunięcie (ang. *knock-out*). Można je uzyskać m.in. poprzez mikroiniekcję DNA lub genu czy wszczepienie zmodyfikowanych komórek. Pozwala to na zbadanie roli różnych genów kodujących białka zaangażowane w szlaki sygnałowe związane z rozwojem chorób. Przykładowo, w badaniach z zakresu farmakokinetyki i farmakodynamiki wykorzystuje się myszy Mdr1a z brakiem genu kodującego glikoproteinę P, a w badaniach nad cukrzycą i miażdżycą – króliki pozbawione genu apolipoproteiny, która jest odpowiedzialna za metabolizm lipidów. Genetycznie zmodyfikowane myszy znalazły również szerokie zastosowanie jako modele do badań z zakresu onkologii. Tak zwane modele ujemne to modele zwierzęce odporne na czynniki chorobotwórcze. Wykorzystuje się je w badaniach nad mechanizmami oporności na dany czynnik. Z kolei modele sieroce znalazły zastosowanie w badaniach nad schorzeniami występującymi tylko u zwierząt [201].

Próby prowadzone na modelach zwierzęcych służą poszukiwaniom nowych leków w terapii nadciśnienia płucnego. Dobór właściwego modelu badawczego jest jednym z czynników decydującym o możliwości przeniesienia wyników prób przedklinicznych na badania kliniczne. Wymaga to pozyskania wiedzy o korzyściach i ograniczeniach modeli, a w szczególności znajomości charakteru indukowanych zmian hemodynamicznych i histopatologicznych.

2.4. Modele zwierzęce nadciśnienia płucnego

Wyróżnia się wiele rodzajów modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego. Różnice pomiędzy nimi mogą dotyczyć metodyki, mechanizmu indukcji schorzenia oraz obrazu wywoływanych zmian hemodynamicznych i histopatologicznych w obrębie krążenia płucnego (serce i naczynia płucne). Od modeli zwierzęcych oczekuje się powtarzalności uzyskanych wyników, braku działań toksycznych, małej inwazyjności oraz niskich kosztów prowadzenia eksperymentów. Obecnie nie jest znany model zwierzęcy, który w pełni odzwierciedla przebieg choroby u ludzi. Badacze wciąż poszukują modelu „idealnego”, który będzie obrazował zakres zmian hemodynamicznych i patomorfologicznych zgodny z przebiegiem schorzenia u ludzi. Wśród modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego można wyróżnić modele niegenetyczne oraz modele genetyczne. Do najlepiej poznanych i najczęściej wykorzystywanych modeli niegenetycznych należą modele klasyczne – model przewlekłej ekspozycji na niedotlenienie i model monokrotaliny, ich modyfikacje, oraz modele nadciśnienia płucnego związanego z wrodzonymi chorobami serca.

2.4.1. Modele klasyczne

2.4.1.1. Model ekspozycji na przewlekłe niedotlenienie (hipoksję)

Model ekspozycji na przewlekłe niedotlenienie (hipoksję) to jeden z najczęściej wykorzystywanych modeli w badaniach na zwierzętach doświadczalnych z zakresu nadciśnienia płucnego. Jest szczególnie przydatny w próbach eksperymentalnych dotyczących PH, które rozwija się w przebiegu chorób układu oddechowego i/lub hipoksji (grupa 3 wg klasyfikacji klinicznej). Model ten jest jednak często wykorzystywany w badaniach nad innymi postaciami schorzenia, co jest uznawane przez ekspertów za nieprawidłowe [161]. Przewlekłe niedotlenienie wywołuje się u zwierząt doświadczalnych poprzez umieszczenie w komorze normobarycznej w warunkach hipoksji (stężenie tlenu około 10%) lub w komorze hipobarycznej na okres 2–5 tygodni [190, 193]. Badania najczęściej prowadzone są na myszach lub szczurach. Ekspozycja na przewlekłe niedotlenienie powoduje przebudowę naczyń płucnych, głównie warstwy błony zewnętrznej oraz środkowej tętnic płucnych. Dochodzi do maskularyzacji małych tętniczek płucnych i tętnic przedwłośniczkowych oraz do przerostu tętnic proksymalnych. Zmiany te są spowodowane migracją i proliferacją komórek mięśni gładkich, akumulacją fibroblastów, miofibroblastów oraz składowych macierzy zewnątrzkomórkowej, tj. kolagenu, elastyny, fibronektyny i tenascyny. Zaletą modelu ekspozycji na przewlekłe niedotlenienie jest prosta technika indukcji nadciśnienia płucnego oraz relatywnie niskie koszty prowadzenia eksperymentów. Co więcej model ten charakteryzuje się powtarzalnością i przewidywalnością wyników otrzymanych z użyciem wybranego szczepu zwierząt [47]. Ograniczenia modelu CH dotyczą rozwoju nadciśnienia płucnego o umiarkowanym stopniu ciężkości oraz ryzyka normalizacji zmian hemodynamicznych i histopatologicznych w wyniku przerwania ekspozycji na niedotlenienie [13]. W badaniach nad modelem hipoksji nie zaobserwowano hiperplazji warstwy zewnętrznej, jej zwłóknienia oraz rozwoju zmian splotowatych charakterystycznych dla tętniczego nadciśnienia płucnego.

W modelu ekspozycji na przewlekłe niedotlenienie u szczurów Fawn-hooded (*Fawn-hooded rat pulmonary hypertension*) spontanicznie rozwija się ciężka postać tętniczego nadciśnienia płucnego. Może to wynikać z wrodzonego upośledzenia wychwytu serotoniny w płytkach krwi oraz ze zmniejszonej liczby pęcherzyków płucnych u szczurów Fawn-hooded. Dochodzi również do zwiększenia średniego ciśnienia w tętnicy płucnej, ciśnienia skurczowego w prawej komorze serca i jej przerostu, oraz do przebudowy naczyń płucnych. Model ten jest wykorzystywany głównie w badaniach nad udziałem czynników genetycznych w rozwoju PAH [167, 178].

2.4.1.2. Model monokrotaliny (MCT)

Obecnie najpopularniejszym modelem zwierzęcym nadciśnienia płucnego jest model monokrotaliny (MCT). Model ten został wykorzystany w badaniach nad lekami zarejestrowanymi obecnie w terapii swoistej PAH, takimi jak antagonisty receptora endoteliny, inhibitory fosfodiesterazy typu 5, analogi prostacykliny oraz seleksypag (EMA, 2016) [115, 141, 146]. Monokrotalina jest toksycznym alkaloidem pirolizydynowym otrzymywanym z nasion rośliny z gatunku *Crotalaria spectabilis*. Dokładny mechanizm indukcji nadciśnienia płucnego w modelu monokrotaliny nie jest w pełni poznany. Wiadomo, że za toksyczne działanie odpowiada aktywny metabolit – dehydromonokrotalina (MCTP), która powstaje w wątrobie w wyniku dehydratacji MCT pod wpływem izoenzymu cytochromu P-450 – CYP 3A4 [74]. Dehydromonokrotalina uszkadza śródbłonek naczyń płucnych oraz wywołuje stan zapalny w obrębie płuc, w wyniku akumulacji komórek tucznych, makrofagów oraz prozapalnych cytokin (m. in. IL-1 β , IL-6) [174, 178]. Technika indukcji nadciśnienia płucnego w modelu MCT polega na pojedynczym, podskórnym lub dootrzewnowym podaniu monokrotaliny w dawkach 40–80 mg/kg masy ciała (m.c.). Najczęściej stosuje się dawkę 60 mg/kg m.c. Czas wywołania PH wynosi zwykle 3–4 tygodnie [54, 85]. Gatunkiem preferowanym w opisywanym modelu jest szczur. Pozostałe gatunki, takie jak mysz czy pies, nie metabolizują MCT do dehydromonokrotaliny. W takim przypadku zwierzętom podaje się aktywny metabolit monokrotaliny [172, 178]. Zmiany przerostowe naczyń w modelu MCT przyczyniają się do wzrostu średniego ciśnienia w tętnicy płucnej oraz ciśnienia skurczowego w prawej komorze serca i jej przerostu. W konsekwencji może dojść do rozwoju niewydolności prawokomorowej serca [74, 146]. Model monokrotaliny charakteryzuje się przewidywalnością i powtarzalnością otrzymywanych wyników w odniesieniu do wybranego szczepu zwierząt, prostą techniką indukcji nadciśnienia płucnego i względnie niskimi kosztami prowadzenia badań. W przeciwieństwie do modelu ekspozycji na przewlekłe niedotlenienie, monokrotalina indukuje ciężką postać nadciśnienia płucnego, choć nie obserwuje się rozwoju zmian splotowatych charakterystycznych dla przebiegu schorzenia u ludzi. Ograniczeniem wykorzystania modelu MCT jest toksyczność monokrotaliny i związana z nią śmiertelność zwierząt. Monokrotalina może powodować tzw. „syndrom MCT”, który nie występuje w rozwoju nadciśnienia płucnego u ludzi i charakteryzuje się uszkodzeniem wątroby, nerek oraz serca [74].

2.4.2. Modele alternatywne

Brak modelu zwierzęcego nadciśnienia płucnego, który odzwierciedlałby w pełni ciężkość i obraz kliniczny schorzenia u ludzi, skłonił badaczy do dalszych poszukiwań metod indukcji PH. W tym celu zaproponowano modyfikacje metod klasycznych i opracowano modele alternatywne, do których zalicza się model monokrotaliny w połączeniu z usunięciem lewego płuca (LP) (LP+MCT), lub z przewlekłą ekspozycją na niedotlenienie (MCT+CH).

2.4.2.1. Model monokrotaliny w połączeniu z usunięciem lewego płuca (LP+MCT) lub z przewlekłą ekspozycją na niedotlenienie (MCT+CH)

Metoda łącząca monokrotalinę z usunięciem lewego płuca polega na podaniu induktora PH, najczęściej w dawce 60 mg/kg m.c. (s.c. lub i.p.) siedem dni po zabiegu pneumonektomii. Okres wywołania nadciśnienia płucnego wynosi zwykle 4 tygodnie od podania MCT. Gatunkiem z wyboru jest szczur [62, 123].

Technika modelu łączącego MCT z przewlekłą ekspozycją na niedotlenienie opiera się na umieszczeniu zwierząt w komorze normobarycznej lub hipobarycznej, a następnie jednorazowym podaniu monokrotaliny (60 mg/kg m.c., s.c. lub i.p.). Okres indukcji choroby wynosi zwykle 2–4 tygodnie od podania MCT [209].

2.4.2.2. Model Sugenu (Sugen 5416)

W badaniach przedklinicznych nad nadciśnieniem płucnym, a zwłaszcza tętniczym nadciśnieniem płucnym, wykorzystuje się też model oparty na połączeniu Sugenu 5416 z przewlekłą ekspozycją na niedotlenienie (Su+CH). Sugen 5416 jest inhibitorem receptora typu 2 czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF-R2). Receptor ten należy do rodziny receptorów kinaz tyrozynowych i powoduje apoptozę komórek śródbłonka naczyń krwionośnych. Pierwotnie związek był badany pod kątem aktywności przeciwnowotworowej. Wykazano, że w wyniku połączenia Sugenu 5416 z przewlekłą ekspozycją na niedotlenienie dochodzi do proliferacji komórek śródbłonka opornych na proces apoptozy, przebudowy naczyń płucnych, i w konsekwencji do rozwoju nadciśnienia płucnego [161, 166]. Technika indukcji PH w opisywanym modelu polega na pojedynczym, domięśniowym podaniu Sugenu 5416 w dawce 20 mg/kg m.c., a następnie umieszczeniu zwierząt w komorze normobarycznej lub hipobarycznej zwykle na okres 3–4 tygodni. Opcjonalnie, po zakończonej ekspozycji na hipoksję, zwierzęta można umieścić w warunkach normoksji na okres kilku tygodni [42, 64]. Brak normalizacji wywołanych zmian hemodynamicznych i histopatologicznych, świadczy o przetrwałym i nieodwracalnym charakterze zaindukowanego nadciśnienia płucnego w tym modelu. Gatunkiem z wyboru jest szczur. Połączenie z przewlekłym niedotlenieniem nie jest konieczne do wywołania ciężkiej postaci PH. Podobny zakres zmian hemodynamicznych i histopatologicznych można wywołać przez połączenie Sugenu 5416 z usunięciem lewego płuca lub z podaniem albuminy jaja kurzego [81, 136]. Model Su+CH pozwala na wywołanie przerostu warstwy śródbłonkowej z okluzją naczyń przedwłośniczkowych oraz na rozwój zmian spłotowatych i warstwy *neointima* [145, 178]. Dochodzi także do przerostu warstwy środkowej tętniczek płucnych oraz do ich maskularyzacji w wyniku proliferacji miocytów. Zmiany spłotowate pojawiają się u szczurów zwykle po zakończonej ekspozycji na niedotlenienie, tj. po około 10 tygodniach przebywania w warunkach normoksji [1, 167]. Wykorzystanie metody opartej na połączeniu Sugenu 5416 z przewlekłą hipoksją pozwala na wywołanie ciężkiej postaci

nadciśnienia płucnego z pleksogenną arteriopatią płucną charakterystyczną dla PAH. Obserwuje się także mniejszą toksyczność i śmiertelność w porównaniu do obecnie najczęściej wykorzystywanego modelu monokrotaliny [161]. W modelu Su+CH nie dochodzi do rozwoju zapalenia okołonaczyniowego. Stanowi to ograniczenie modelu podobnie jak różnice w obrazie histopatologicznym zmian spłotowatych, jakie obserwuje się u zwierząt laboratoryjnych i u ludzi [45, 145].

2.4.3. Modele indukcji nadciśnienia płucnego związanego z wrodzonymi chorobami serca

W badaniach nad nadciśnieniem płucnym, które rozwija się w następstwie wrodzonych chorób serca, zastosowanie znajdują modele zwierzęce opierające się na zwężeniu tętnicy płucnej, tzw. bandingu (PAB) lub wytworzeniu przecieku pomiędzy krążeniem systemowym i płucnym (ang. *left-to-right shunt*). Modele te odzwierciedlają zmiany hemodynamiczne i histopatologiczne związane z przerostem i przebudową prawej komory serca. Są również wykorzystywane w badaniach nad związkami o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu dysfunkcji prawej komory serca [124, 198].

2.4.4. Modele genetyczne

W ostatnich latach rośnie zainteresowanie modelami zwierzęcymi genetycznie modyfikowanymi. Badania eksperymentalne wskazują na udział w patogenezie nadciśnienia płucnego mutacji genów, które kodują białka szlaków sygnałowych związanych z rozwojem schorzenia. U osób z dziedzicznym oraz idiopatycznym PAH stwierdza się mutacje genu kodującego receptor typu 2 dla białka morfogenetycznego kości (BMPR2) oraz mutacje genów kodujących kinazę podobną do receptora aktywiny-1 i endogliny. Zbadano także mutacje heterozygotyczne genów kodujących kaweolinę-1 (CAV1) oraz genu KCNK3 kodującego białka kanału potasowego [69]. Modele genetyczne nadciśnienia płucnego opierają się na wprowadzeniu do genomu fragmentu DNA lub na jego usunięciu (ang. *knock-out*). Badania najczęściej prowadzi się z udziałem myszy, z uwagi na względnie łatwą ingerencję genetyczną. W modelach genetycznych nadciśnienia płucnego wykorzystuje się mutacje genów kodujących białka zaangażowane w rozwój PH. Wśród najpowszechniejszych wyróżnia się m. in. modele oparte na mutacji genu BMPR2, zmniejszonej ekspresji wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP) lub neprylizyny (NEP) oraz modele oparte na nadekspresji takich białek jak interleukina-6 (IL-6), angiopoetyna-1 lub błonowy transporter serotoniny (SERT) [77, 112, 138, 165, 200, 206].

2.4.5. Inne modele

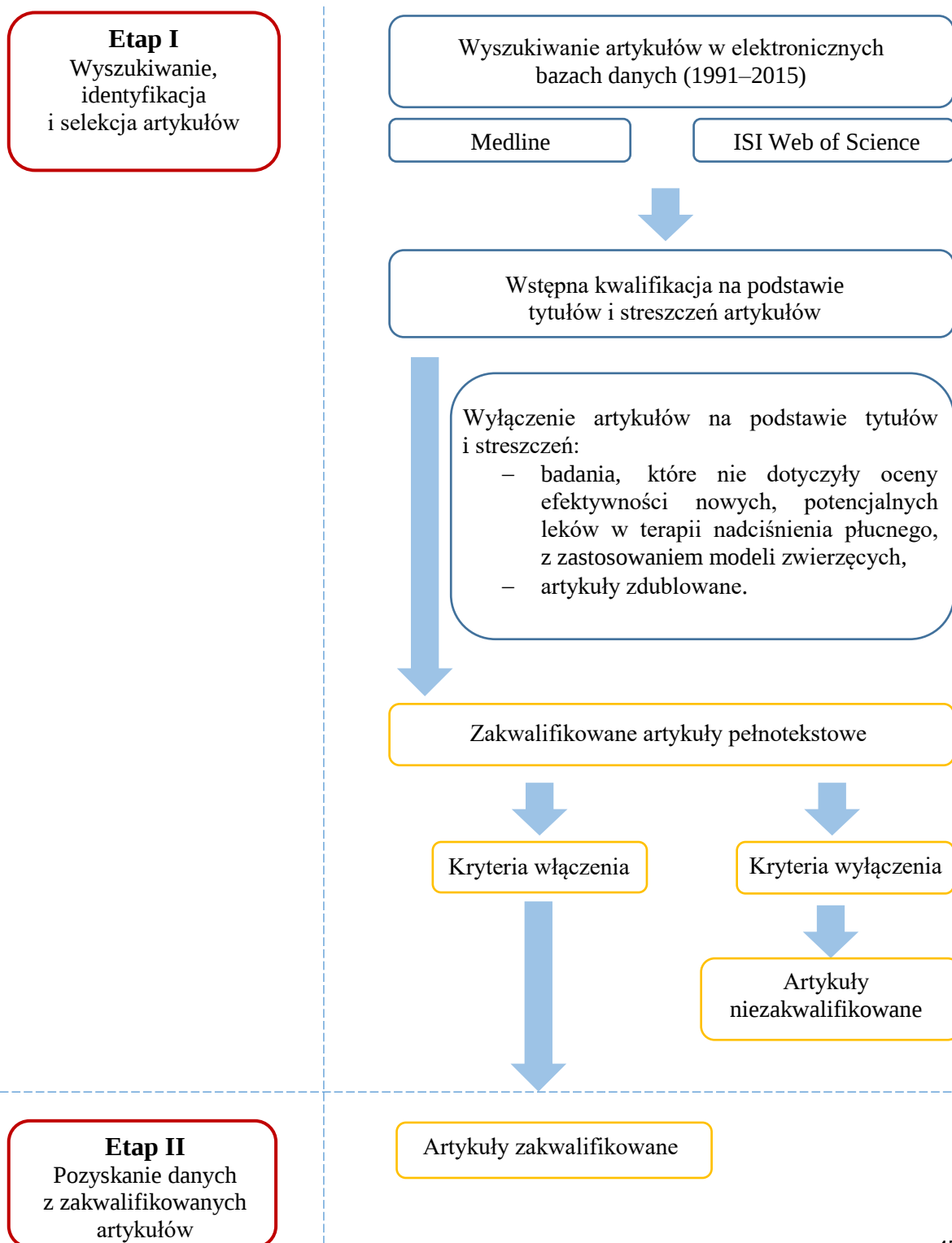
W badaniach przedklinicznych z zakresu nadciśnienia płucnego stosuje się również modele zwierzęce, w których indukcja schorzenia jest związana z podaniem czynnika zakaźnego. Wyróżnia się m. in. model indukowany ekspozycją na larwy przywry żyłnej *S. mansoni* lub na paciorkowce *Streptococcus B*. Pierwszy z wymienionych modeli dotyczy PAH spowodowanego schistosomatozą (grupa kliniczna 1). Podskórne wstrzyknięcie zawiesiny larw przywry żyłnej powoduje u zwierząt przebudowę naczyń płucnych oraz rozwój stanu zapalnego [145, 161].

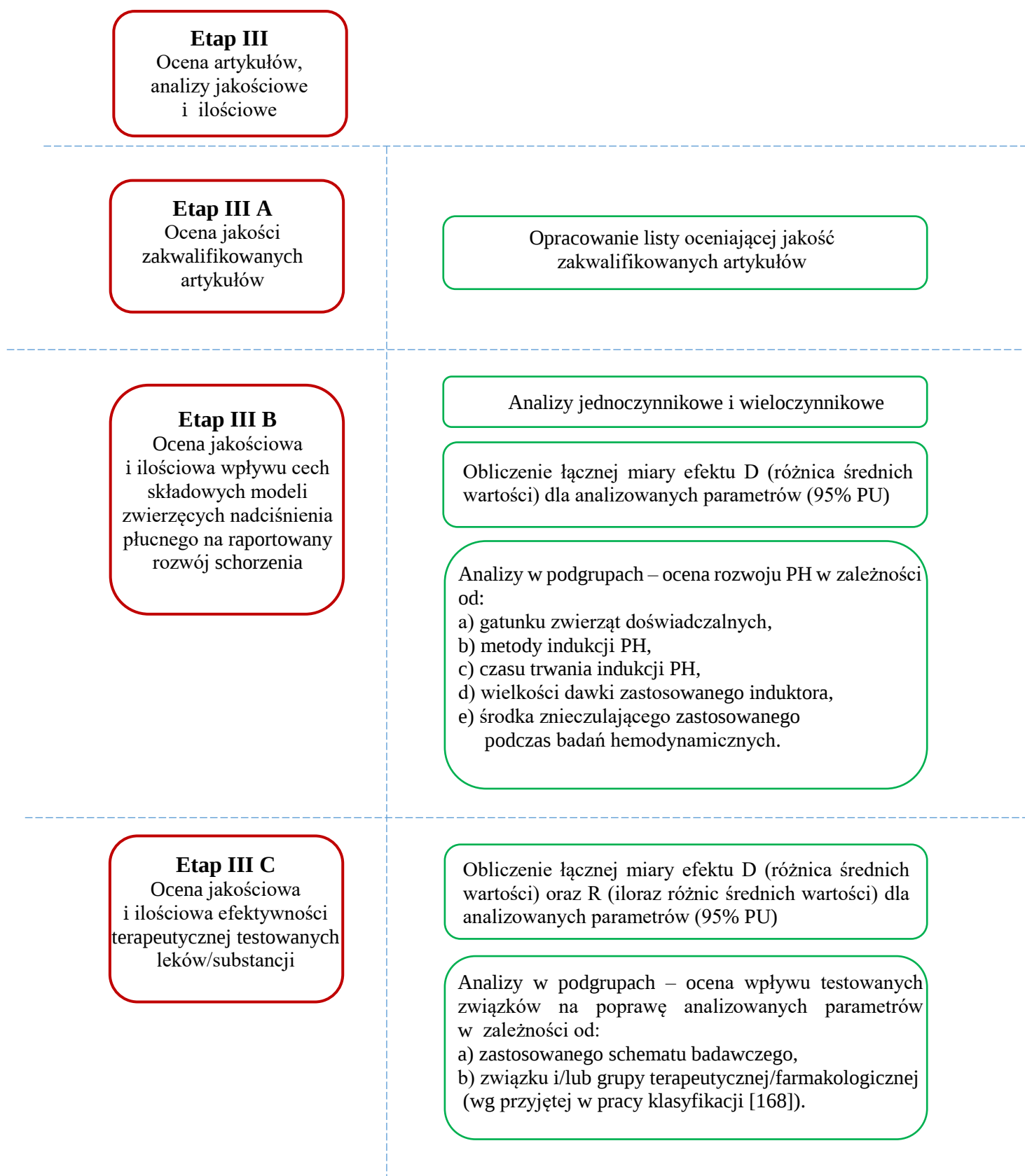
W ostatnich latach wzrosło także zainteresowanie badaczy metodą indukcji nadciśnienia płucnego bleomycyną. Jako zwierzęta doświadczalne wykorzystuje się myszy, szczury oraz króliki. Podanie dootrzewnowe lub dotchawicze bleomycyny powoduje maskularyzację naczyń płucnych, rozwój stanu zapalnego i zwłóknienie płuc. Obserwuje się również przerost mięśnia prawej komory serca. Model znajduje szczególne zastosowanie w badaniach nad nadciśnieniem płucnym w przebiegu śródmiąższowej choroby płuc [145].

3. Część doświadczalna

3.1. Materiały i metodyka

Metodykę badania przedstawiono schematycznie na **Rycinie 2**.





Rycina 2. Schemat badania

3.1.1. Wyszukiwanie, identyfikacja i selekcja artykułów (etap I)

W pierwszym etapie dokonano przeglądu dwóch elektronicznych baz danych – Medline oraz ISI Web of Science, od 1 stycznia 1991 roku do 31 grudnia 2015 roku, bez ograniczeń językowych. W celu wstępnej selekcji artykułów zastosowano kombinację słów kluczowych: *mice OR rat OR mammals AND pulmonary hypertension AND RVP OR PAP OR RVSP OR RVH OR wall thickness OR RV/LV + S OR pulmonary artery pressure OR remodeling*. Następnie przeanalizowano tytuły i streszczenia zakwalifikowanych prac. Wyłączono publikacje, które nie dotyczyły oceny efektywności nowych, niezarejestrowanych związków w nadciśnieniu płucnym na modelach zwierzęcych. Odrzucono prace powtarzające się. Pozostałe artykuły oceniono zgodnie z przyjętymi kryteriami włączenia i wyłączenia.

3.1.1.1. Kryteria włączenia artykułów

Kryteria włączenia artykułów obejmowały:

1. Zwierzęta doświadczalne z gatunku ssaków,
2. Klasyczne modele zwierzęce nadciśnienia płucnego:
 - model ekspozycji na przewlekłe niedotlenienie (hipoksję) (CH),
 - model monokrotaliny (MCT),
3. Modyfikacje klasycznych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego:
 - model Sugenu 5416 w połączeniu z ekspozycją na przewlekłe niedotlenienie (hipoksję) (Sugen 5416),
 - model monokrotaliny w połączeniu z usunięciem lewego płuca (LP+MCT),
 - model monokrotaliny w połączeniu z ekspozycją na przewlekłe niedotlenienie (hipoksję) (MCT+CH),
 - model ekspozycji na przewlekłe niedotlenienie (hipoksję) w połączeniu z hiperkapnią (CH+HC),
4. Wywołanie przewlekłego nadciśnienia płucnego u zwierząt doświadczalnych,
5. Przewlekłą ekspozycję zwierząt doświadczalnych na testowane związki,
6. Związki dotychczas niezarejestrowane w terapii nadciśnienia płucnego,
7. Ocenę zmian najczęściej raportowanych parametrów hemodynamicznych i przerostowych:
 - średniego i/lub skurczowego ciśnienia w prawej komorze serca (RVP i/lub RVSP),
 - średniego ciśnienia w tętnicy płucnej (mPAP),
 - przerostu mięśnia prawej komory serca opisanego indeksem Fultona (RV/LV + S),
 - przyrost ściany tętnic płucnych (WT%),

uwzględnienia artykułu w dalszych analizach było podanie wyniku przynajmniej jednego z parametrów: RVP i/lub RVSP, RVH, mPAP, WT.

Przyrost ściany tętnic płucnych (WT%) opisano wzorem:

$$WT = \frac{2 \times \text{grubość ściany tętnicy płucnej}}{\text{średnica zewnętrzna tętnicy płucnej}} \times 100\%$$

lub

$$WT = \frac{\text{średnica zewnętrzna tętnicy płucnej} - \text{średnica wewnętrzna tętnicy płucnej}}{\text{średnica zewnętrzna tętnicy płucnej}} \times 100\%$$

8. Ocenę analizowanych parametrów w trzech badanych grupach:
 - interwencji lekowej (zwierzęta poddane ekspozycji na testowane leki/substancje, u których wywołano PH),
 - kontroli pozytywnej (zwierzęta niepoddane ekspozycji na testowane leki/substancje, u których wywołano PH),
 - kontroli negatywnej (zwierzęta zdrowe, niepoddane ekspozycji na testowane leki/substancje, u których nie wywołano PH),
9. Określenie liczby zwierząt doświadczalnych w badanych grupach.

W analizach jakościowych uwzględniono również inne parametry hemodynamiczne: pojemność minutową serca (CO), objętość wyrzutową serca (SV), naczyniowy opór płucny (PVR), całkowity opór obwodowy (TPR) oraz średnie ciśnienie tętnicze krwi (MABP). Ocena ww. parametrów w publikacjach nie była warunkiem koniecznym do włączenia artykułu do pracy.

3.1.1.2. Kryteria wyłączenia artykułów

Kryteria wyłączenia publikacji obejmowały:

1. Zwierzęta modyfikowane genetycznie,
2. Zwierzęta nowonarodzone,
3. Zwierzęta ciężarne,
4. Zwierzęta z chorobami współistniejącymi,
5. Badania, których celem było pogorszenie ocenianych parametrów: RVP i/lub RVSP, mPAP, RVH lub WT,
6. Wywołanie ostrego nadciśnienia płucnego u zwierząt doświadczalnych,
7. Nieprecyzyjne określenie wielkości dawki ocenianych leków/substancji (brak przeliczenia na kg m.c.).

3.1.2. Pozyskanie danych z włączonych artykułów (etap II)

Z zakwalifikowanych artykułów pozyskano dane dotyczące:

1. Bibliografii publikacji:
 - autor,
 - tytuł czasopisma,
 - rok opublikowania artykułu,
2. Zwierząt doświadczalnych:
 - gatunek,
 - szczep,
 - płeć,
 - wiek,
 - waga zwierząt na początku doświadczenia (przed indukcją PH),
 - liczba zwierząt,
3. Metod indukcji nadciśnienia płucnego:
 - rodzaj czynnika indukującego,
 - dawka czynnika indukującego,
 - czas trwania indukcji nadciśnienia płucnego (liczony od dnia podania induktora do dnia badania hemodynamicznego),
4. Testowanych leków/substancji:
 - nazwa leku/substancji,
 - dawka jednorazowa,
 - dawka dobową,
 - czas ekspozycji,
 - droga podania,
5. Rodzaju schematu badawczego, w którym oceniano efektywność terapeutyczną badanych leków/substancji:
 - model prewencyjny (model badawczy, w którym związek podawano w celu prewencji zmian wywołanych w PH),
 - model terapeutyczny (model badawczy, w którym związek podawano w celu redukcji zmian wywołanych w PH),
6. Średnich wartości parametrów:
 - RVP i/lub RVSP,
 - mPAP,
 - RVH,
 - WT,

oraz wartości odchylenia standardowego (SD) lub błędu standardowego (SEM). W publikacjach, w których dane były prezentowane graficznie, kontaktowano się z autorami w celu uzyskania wyników badań. W razie potrzeby wartości danych odczytano z wykresów.

7. Rodzaju i dawki środka znieczulającego zastosowanego podczas badań hemodynamicznych.

3.1.2.1. Klasyfikacja ocenianych związków

Oceniane związki przyporządkowano do grup terapeutycznych/farmakologicznych w oparciu o ich wskazania terapeutyczne i/lub mechanizmy działania, zgodnie z klasyfikacją zaproponowaną przez Sardana i wsp. (2015) [168].

3.1.3. Analiza jakościowa i ilościowa (etap III)

3.1.3.1. Ocena jakości zakwalifikowanych artykułów (etap III A)

Przeprowadzono ocenę jakości artykułów włączonych do badania. W tym celu z analizowanych publikacji pozyskano informacje dotyczące:

1. Faktu opublikowania w recenzowanym czasopiśmie,
2. Oszacowania wielkości próby,
3. Losowego przydziału do grupy eksperymentalnej,
4. Zaślepienia rodzaju grupy eksperymentalnej,
5. Zaślepienia oceny wyników,
6. Prowadzenia badań z użyciem zwierząt z chorobami towarzyszącymi,
7. Oświadczenia o zgodności z prawnymi regulacjami dotyczącymi badań na zwierzętach,
8. Oświadczenia w sprawie potencjalnych konfliktów interesów,
9. Współczynnika oddziaływania *impact factor*.

W oparciu o punkty 1–8 opracowano listę oceniającą jakość zakwalifikowanych publikacji. Za każdą odpowiedź twierdzącą na pytania w punktach 1–8 przypisywano wartość 1, za każdą odpowiedź przeczącą – wartość 0.

3.1.3.2. Meta-analiza

Meta-analizę przeprowadzono przy użyciu oprogramowania STATISTICA 12. Ze względu na niejednorodność badań zastosowano model z efektem losowym (zmiennym). Wielkość efektu względnego została obliczona z 95% przedziałem ufności (PU). Wartość $p < 0,05$ uznano za statystycznie istotną. Wyniki parametrów analizowano jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe (SD). W publikacjach, w których wyniki pomiarów przedstawiono za pomocą mediany, podając wartości minimum i maksimum i/lub zakres międzykwartylowy (IQR), wartości średnie obliczono za pomocą metody opisanej przez Wan i wsp. (2014) [195].

W publikacjach, w których za miarę rozrzutu przyjęto SEM, wartość SD obliczano za pomocą wzoru:

$$SD = SEM \times n$$

gdzie: n oznacza liczbę zwierząt w badanej grupie

3.1.3.2.1. Analiza wpływu cech składowych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego na rozwój nadciśnienia płucnego (etap III B)

Miarą rozwoju nadciśnienia płucnego w analizowanych modelach zwierzęcych było pogorszenie wybranych parametrów hemodynamicznych i/lub przerost mięśnia prawej komory serca (indeks Fultona) oraz przyrost ściany tętnic płucnych. Wartości ocenianych parametrów poddano analizie ilościowej.

W tym celu przeprowadzono klasyczne analizy w parach, stosując metodę DerSimonian – Laird [51]:

$$D = X_1 - X_3$$

gdzie: D – różnica średnich arytmetycznych, X_1 – średni wynik w grupie kontroli pozytywnej, X_3 – średni wynik w grupie kontroli negatywnej

Powyższe porównanie (D) zdefiniowano jako interwencję. Jeżeli w jednej publikacji przedstawiono wyniki dla kilku porównań pomiędzy kontrolą pozytywną a kontrolą negatywną, ze względu na inne warunki eksperymentu (rodzaj induktora, dawka induktora lub czas indukcji), to każde porównanie zdefiniowano jako osobną interwencję.

Dla analizowanych parametrów – RVP i/lub RVSP, mPAP, RVH, WT, obliczono łączną miarę efektu (D) z 95% przedziałem ufności (PU).

3.1.3.2.1.1. Analiza w podgrupach

Dla parametrów RVSP, RVP, mPAP, RVH, WT przeprowadzono analizy w podgrupach wyznaczonych przez:

- a) gatunek zwierząt doświadczalnych,
- b) rodzaj metody indukcji nadciśnienia płucnego,
- c) skategoryzowaną zmienną: czas trwania indukcji nadciśnienia płucnego,
- d) skategoryzowaną zmienną: wielkość dawki induktora,
- e) rodzaj środka znieczulającego zastosowanego podczas badań hemodynamicznych.

Wykorzystano model z efektem zmiennym i oddzielnym T^2 – estymatorem wariancji rzeczywistych efektów. Zastosowano testy porównujące wyniki badań w podgrupach: test Z oraz test chi-kwadrat (Q) oparty na analizie wariancji i analizie niejednorodności. Wyznaczono wartość Q niejednorodności pomiędzy grupami. Istotne wyniki testów Z i Q niejednorodności ($p < 0,05$) wskazywały na różnice między porównywanymi podgrupami w odniesieniu do analizowanej zmiennej.

a) Rozwój nadciśnienia płucnego w zależności od gatunku zwierząt doświadczalnych

Przeprowadzono analizy danych: różnice średnich wartości (D) parametrów RVP i/lub RVSP, mPAP, RVH, WT w dwóch podgrupach (gatunek szczur, gatunek mysz).

b) Rozwój nadciśnienia płucnego w zależności od wybranej metody indukcji PH

Przeprowadzono analizy danych: różnice średnich wartości (D) parametrów RVP i/lub RVSP, mPAP, RVH, WT w dwóch podgrupach (klasyczne metody indukcji nadciśnienia płucnego oraz ich modyfikacje) i dla dalszej oceny – różnice średnich wartości (D) parametrów RVP i/lub RVSP, mPAP, RVH, WT w podgrupach wyznaczonych przez poszczególne metody indukcji PH.

c) Rozwój nadciśnienia płucnego w zależności od czasu trwania indukcji schorzenia

Przeprowadzono analizy danych: różnice średnich wartości (D) parametrów RVP i/lub RVSP, mPAP, RVH, WT w podgrupach wyznaczonych przez skategoryzowany czas trwania indukcji nadciśnienia płucnego.

d) Rozwój nadciśnienia płucnego w zależności od zastosowanej dawki monokrotaliny

Przeprowadzono analizy danych: różnice średnich wartości (D) parametrów RVP i/lub RVSP, mPAP, RVH, WT w podgrupach wyznaczonych przez przyjęte kategorie dawek monokrotaliny.

e) Rozwój nadciśnienia płucnego w zależności od środka znieczulającego zastosowanego podczas badań hemodynamicznych

Przeprowadzono analizy danych: różnice średnich wartości (D) parametrów RVSP i mPAP w podgrupach wyznaczonych przez środek znieczulający zastosowany podczas badań hemodynamicznych.

3.1.3.2.2. Ocena efektywności nowych, potencjalnych leków w terapii nadciśnienia płucnego (etap III C)

Miarą efektywności testowanych związków była poprawa wybranych parametrów hemodynamicznych i (lub) zmniejszenie przerostu mięśnia prawej komory serca (indeks Fultona) oraz grubości ściany tętnic płucnych.

W celu oceny ilościowej przeprowadzono klasyczne analizy w parach, stosując metodę DerSimonian – Laird [51]:

$$D = X_1 - X_2$$

gdzie: D – różnica średnich arytmetycznych, X_1 – średni wynik w grupie kontroli pozytywnej, X_2 – średni wynik w grupie interwencji lekowej.

Dla parametrów – RVSP, mPAP, RVH, WT, obliczono łączną miarę efektu D z 95% przedziałem ufności (PU).

Porównanie D zdefiniowano jako interwencję.

W celu ujednolicenia wyników opisujących działanie testowanych związków na różnych modelach zwierzęcych PH, zaproponowano wzór:

$$R = \frac{X_1 - X_2}{X_1 - X_3}$$

gdzie: R – iloraz różnic średnich arytmetycznych, X_1 – średni wynik w grupie kontroli pozytywnej, X_2 – średni wynik w grupie interwencji lekowej, X_3 – średni wynik w grupie kontroli negatywnej.

Dla parametrów – RVSP, mPAP, RVH, WT, obliczono łączną miarę efektu R z 95% przedziałem ufności (PU).

Iloraz R zdefiniowano jako interwencję. Jeżeli w jednej publikacji przedstawiono wyniki dla kilku porównań pomiędzy kontrolą pozytywną a interwencją lekową, ze względu na różne warunki eksperymentu (rodzaj substancji, dawka leku, droga podania leku, czas podawania leku, rodzaj modelu badawczego – prewencyjny/terapeutyczny), to każde porównanie D oraz R zdefiniowano jako osobną interwencję.

3.1.3.2.2.1. Analiza w podgrupach

Dla parametrów RVSP, mPAP, RVH, WT – przeprowadzono analizy w podgrupach wyznaczonych przez:

- a) związki i/lub grupy terapeutyczne/farmakologiczne,
- b) rodzaj schematu badawczego (model prewencyjny/terapeutyczny).

Wykorzystano model z efektem zmiennym i oddzielnym T^2 – estymatorem wariancji rzeczywistych efektów. Zastosowano testy porównujące wyniki badań w podgrupach: test Z oraz test chi-kwadrat (Q) oparty na analizie wariancji i analizie niejednorodności. Wyznaczono wartość Q niejednorodności pomiędzy grupami. Istotne wyniki testów Z oraz Q niejednorodności ($p < 0,05$) wskazywały na różnice między porównywanymi podgrupami.

a) Wpływ testowanych leków/substancji na poprawę analizowanych parametrów w zależności od wyboru związku i/lub grupy terapeutycznej/farmakologicznej (wg przyjętej w pracy klasyfikacji [168])

Przeprowadzono analizy danych: iloraz różnic średnich wartości (R) parametrów RVSP, mPAP, RVH, WT w podgrupach wyznaczonych przez oceniany związek oraz grupę terapeutyczną/farmakologiczną.

b) Wpływ testowanych leków/substancji na poprawę analizowanych parametrów w zależności od zastosowanego schematu badawczego

Przeprowadzono analizy danych: iloraz różnic średnich wartości (R) parametrów RVSP, mPAP, RVH, WT odpowiednio w dwóch podgrupach (model prewencyjny, model terapeutyczny).

Przeprowadzono również analizy mające na celu określenie wpływu rodzaju zastosowanego modelu zwierzęcego nadciśnienia płucnego na odnotowaną efektywność ocenianych związków w zakwalifikowanych publikacjach. W tym celu porównano interwencje, w których testowano te same leki/substancje, z zachowaniem zbliżonych warunków eksperymentów, ale na różnych modelach PH.

3.1.3.3. Analiza niejednorodności

Heterogenność badań oceniono ilościowo za pomocą wartości Q Cochрана, która została obliczona jako ważona suma kwadratów różnic między poszczególnymi efektami badań i efektem łącznym wszystkich prób. Współczynnik Q pochodzi z rozkładu chi-kwadrat z k (liczba badań) minus 1 stopień swobody. Przyjęto, że statystycznie istotna wartość Q pomiędzy badanymi grupami ($p < 0,05$) potwierdza heterogenność badań, natomiast nieistotna statystycznie wartość Q w poszczególnych grupach ($p > 0,05$) wskazuje na ich jednorodność. Zastosowano także inną miarę niejednorodności – statystykę I^2 , która przedstawia udział procentowy zmienności rzeczywistej do łącznej. Wielkości efektów wyrażono jako średnią różnicę (MD) i 95% przedział ufności (PU).

3.1.4. Analiza wrażliwości

Przeprowadzono analizę wrażliwości przy użyciu metody wyłączania (*leave-one-out method*) z meta-analizy poszczególnych badań, w celu oceny ich wpływu na ogólną wielkość efektu. Zastosowana metoda polega na wielokrotnym powtarzaniu meta-analizy i obliczaniu wartości efektu łącznego, po wyłączeniu każdego pojedynczego badania.

3.1.5. Błąd publikacji (*publication bias*)

Do oceny błędu publikacji wykorzystano metodę wykresów lejkowych (*funnel plot*) oraz testy asymetrii Begga i Mazumdar, korelacji rang Begga i liniowej regresji ważonej Eggera. Zastosowano procedurę *Trim and Fill* opracowaną przez Duval i Tweedie w celu określenia liczby brakujących publikacji do uzyskania symetrii wykresów lejkowych i obliczenia wielkości efektu po skorygowaniu o błąd publikacji [17, 55, 58].

3.1.6. Meta-regresja

Przeprowadzono analizę meta-regresji wieloczynnikowej, aby ocenić wpływ czasu trwania indukcji nadciśnienia płucnego na pogorszenie ocenianych parametrów w zależności od zastosowanego modelu zwierzęcego [9, 19].

3.1.7. Inne analizy statystyczne

Wstępne jednoczynnikowe analizy przeprowadzono z zastosowaniem testów parametrycznych (test t Studenta dla prób niezależnych lub jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA) bądź testów nieparametrycznych (test U-Manna Whitneya lub test Kruskala-Wallisa). Analizy przeprowadzono po uprzedniej weryfikacji założeń:

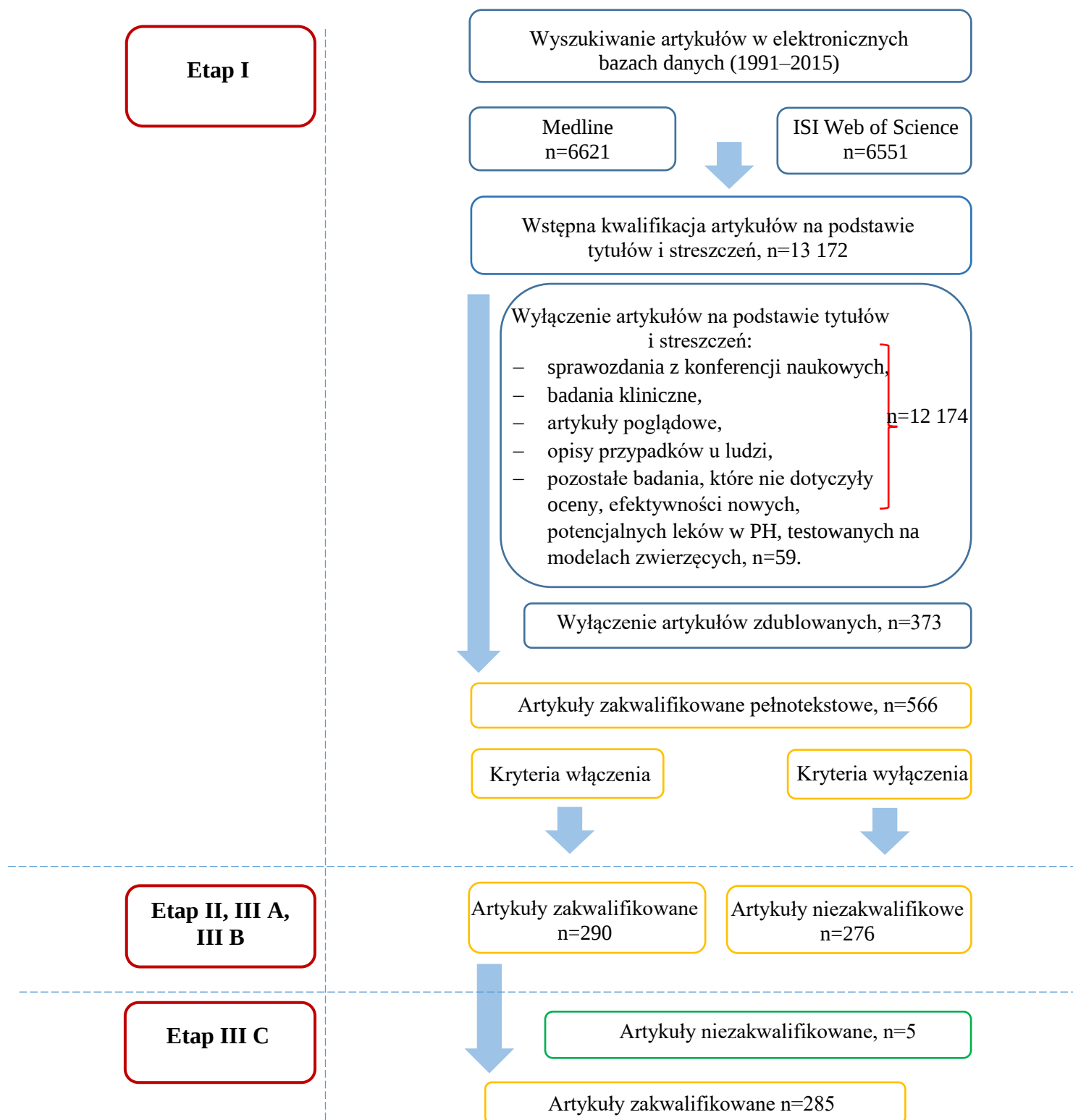
- zgodności rozkładu badanej zmiennej z rozkładem normalnym (test Shapiro-Wilka),
- jednorodności wariancji (test Browna-Forsythe'a).

Wartość $p < 0,05$ uznano za statystycznie istotną.

3.2. Wyniki

3.2.1. Wyszukiwanie, identyfikacja i selekcja artykułów

Szczegółowe wyniki wyszukiwania, identyfikacji i selekcji artykułów przedstawiono na **Rycinie 3**.



Rycina 3. Schemat wyszukiwania, identyfikacji i selekcji artykułów

Do analizy zakwalifikowano 566 publikacji pełnotekstowych. Odrzucono 276 artykuły, które nie spełniły kryteriów włączenia. Odrzucono badania, w których:

- eksperymenty przeprowadzono na zwierzętach modyfikowanych genetycznie, nowonarodzonych, ciężarnych lub z chorobami współistniejącymi (n=59),
- u zwierząt doświadczalnych indukowano ostre nadciśnienie płucne (n=5),
- nieprecyzyjnie określono wielkości dawek ocenianych związków, tj. nie podano dawki w przeliczeniu na kg/m.c. (n=27),
- nie podano liczebności badanych grup (n=14),
- oceniane związki nie były podawane zwierzętom przewlekłe (n=26),
- nie oceniano parametrów: RVP i/lub RVSP, mPAP, RVH, WT (n=145).

Ocenę wpływu cech składowych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego na stopień rozwoju choroby (etap III B) przeprowadzono w oparciu o dane pozyskane z 290 publikacji (611 interwencji). Wykaz zakwalifikowanych publikacji przedstawiono w **Załączniku 1**. Do dalszej części badania, tj. analizy efektywności terapeutycznej potencjalnych leków w terapii PH (etap III C), zakwalifikowano 285 artykułów (522 interwencji). Odrzucono pięć publikacji z uwagi na:

- brak wyników dla parametrów: RVP i/lub RVSP, mPAP, RVH, WT (2 artykuły),
- znaczne pogorszenie raportowanych parametrów (2 artykuły),
- ocenę terapii skojarzonej, bez wyników monoterapii (1 artykuł).

3.2.2. Charakterystyka zakwalifikowanych badań

Szczegółową charakterystykę zakwalifikowanych badań przedstawiono w **Tabeli 1 (Załącznik 2)**.

3.2.2.1. Charakterystyka zwierząt doświadczalnych

W 290 zakwalifikowanych artykułach (611 interwencji) przedstawiono wyniki prób eksperymentalnych przeprowadzonych z użyciem łącznie 11 535 zwierząt. Liczba ta stanowi sumę zwierząt biorących udział we wszystkich interwencjach, tj. przydzielonych do trzech grup: interwencji lekowej, kontroli pozytywnej i negatywnej. Badania prowadzono na dwóch gatunkach zwierząt doświadczalnych – szczurach (568/611 interwencji; 92,96%) oraz na myszach (43/611 interwencji; 7,04%).

W większości analizowanych interwencji wykorzystano szczepy szczurów:

- Sprague-Dawley (57,28%),
- Wistar (34,53%),
- Wistar-Kyoto (8,19%).

Najpopularniejszym szczepem wśród myszy były zwierzęta C57BL (34/611; 5,56%).

W pozostałych badaniach zastosowano szczepy BALB/c oraz FVB.

Łącznie 94,92% (580/611) interwencji przeprowadzono na osobnikach płci męskiej.

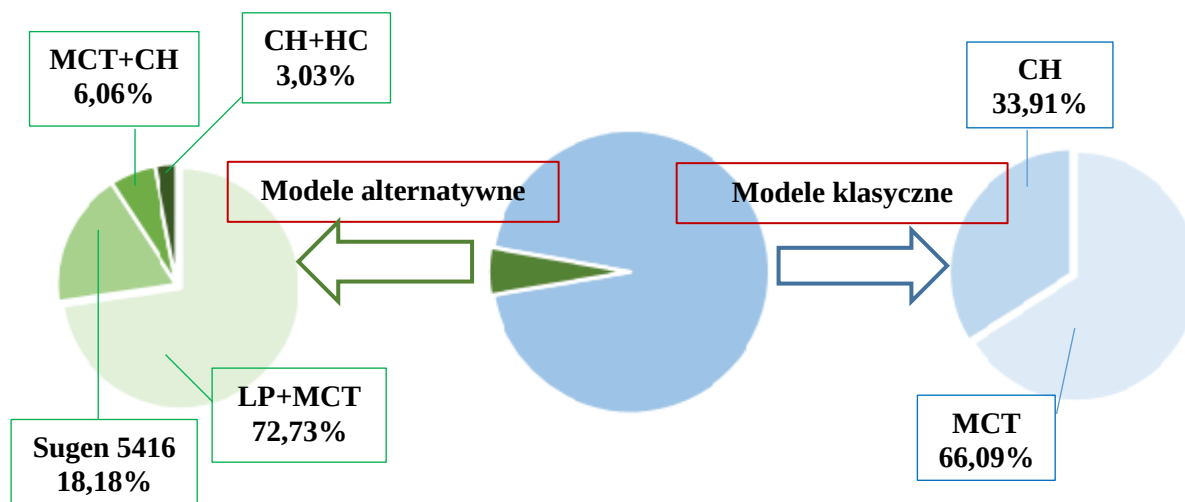
Informację o wieku zwierząt podano w 141/290 publikacjach (48,62%). Młode osobniki, tj. w wieku od trzech do dwunastu tygodni, użyto w 83/141 badaniach (58,87%).

Dane dotyczące początkowej wagi zwierząt doświadczalnych (tj. przed indukcją nadciśnienia płucnego) zamieszczono w 223 artykułach spośród 290 włączonych prac (76,90%). Większość badań przeprowadzono na szczurach o masie początkowej od 221 do 450 gramów oraz na myszach o masie początkowej od 18 do 25 gramów.

3.2.2.2. Charakterystyka modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego

a) Rodzaj metody indukcji nadciśnienia płucnego

Większość interwencji przeprowadzono z zastosowaniem klasycznych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego (578/611 interwencji; 94,60%). Nadciśnienie płucne najczęściej indukowano przez podanie monokrotaliny (MCT) (382/611; 62,52%) (**Rycina 4**).



Rycina 4. Klasyczne i alternatywne modele zwierzęce nadciśnienia płucnego stosowane w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych

Monokrotalinę podawano w pojedynczej iniekcji podskórnej lub dootrzewnowo, w zakresie dawek od 40 mg/kg m.c. (63/611; 10,31%) do 80 mg/kg m.c. (9/611; 1,47%). W większości analizowanych badań stosowano MCT w dawce 60 mg/kg m.c. (312/611; 51,06%).

W dalszych analizach uwzględniono trzy kategorie dawek monokrotaliny:

- poniżej 60 mg/kg m.c.,
- 60 mg/kg m.c.,
- powyżej 60 mg/kg m.c.

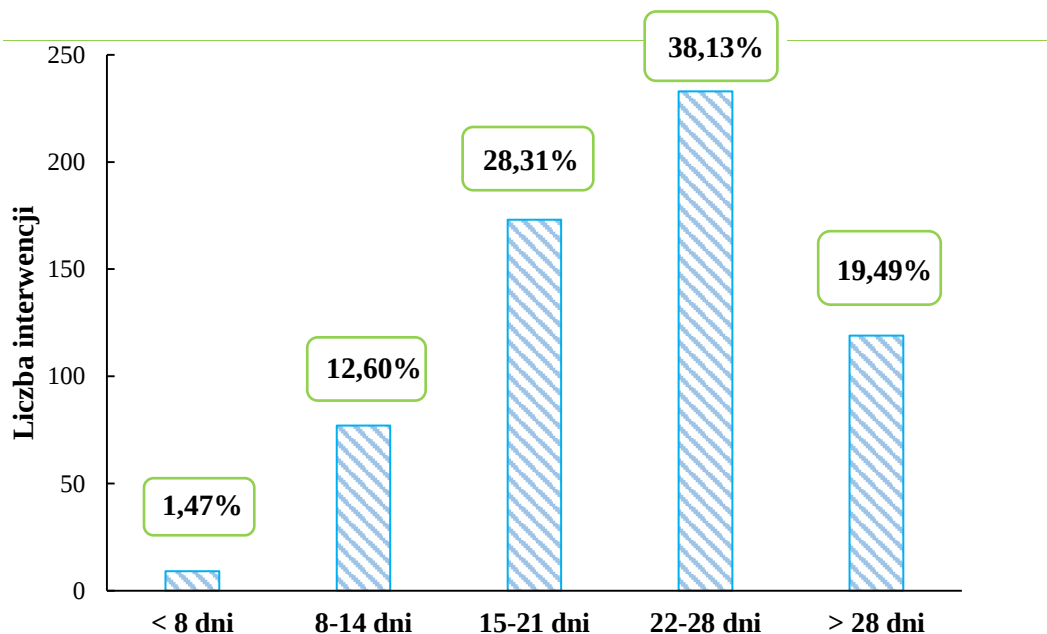
W sześciu interwencjach (6/611; 0,98%) czynnikiem indukującym nadciśnienie płucne był Sugenu 5416. W dwóch interwencjach zastosowano metodę opartą na połączeniu Sugenu 5416 z przewłęką hipoksją. W czterech interwencjach połączono iniekcję Sugenu 5416 z ekspozycją na przewłęką hipoksję, po zakończeniu której zwierzęta poddano dalszej ekspozycji w warunkach normoksji.

b) Czas trwania indukcji nadciśnienia płucnego

Z uwagi na duże zróżnicowanie czasu trwania indukcji PH w ocenianych artykułach przyjęto następujące kategorie:

- poniżej 8 dni,
- od 8 do 14 dni,
- od 15 do 21 dni,
- od 22 do 28 dni,
- powyżej 28 dni.

Mediana liczby dni od podania czynnika indukującego nadciśnienie płucne do oceny parametrów hemodynamicznych wynosiła 28 (IQR: 21-28 dni). W większości zakwalifikowanych badań czas trwania indukcji schorzenia wynosił od 22 do 28 dni (233/611; 38,13%) (**Rycina 5**).



Rycina 5. Kategorie czasu trwania indukcji nadciśnienia płucnego w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych. % – odsetek ogólnej liczby interwencji (n=611)

3.2.2.3. Charakterystyka testowanych związków

W 285 (522 interwencji) zakwalifikowanych badaniach oceniono efektywność terapeutyczną 206 związków. Spośród 522 interwencji, 41 było nieefektywnych, tj. oceniane substancje nie spowodowały poprawy lub pogorszyły oceniane parametry. Interwencje te nie zostały uwzględnione w dalszej analizie jakościowej i ilościowej.

a) Klasyfikacja testowanych leków/substancji

W oparciu o wskazania terapeutyczne i/lub mechanizmy działania analizowane związki zakwalifikowano do dwudziestu sześciu grup terapeutycznych/farmakologicznych [168]. Pozostałe związki, takie jak acetazolamid, kwas γ -aminomasłowy, MK571 (inhibitor białka oporności wielolekowej MRP4), U50,488H, ze względu na inne mechanizmy działania nie przydzielono do żadnej z grup.

Klasyfikację ocenianych leków/substancji przedstawiono w kolejności alfabetycznej. Do dalszych analiz wyodrębniono dziesięć najczęściej badanych grup, które oznaczono „*”:

- 1) acetazolamid,
- 2) agonisty receptorów aktywowanych proliferatorami peroksysomów (PPAR),
- 3) agonisty receptorów/pochodne estrogeny (18/522; 3,45%)*,
- 4) aktywatory kanałów potasowych ATP-zależnych (20 interwencji/522 interwencji; 3,83%)*,
- 5) analogi/agonisty prostacykliny PGI₂,
- 6) antagonisty receptorów adrenergicznych,
- 7) antagonisty receptorów urotensyny II,
- 8) antagonisty receptorów/inhibitory endoteliny-1 (ET-1),
- 9) antagonisty wapnia,
- 10) inhibitory cyklooksygenazy (COX),
- 11) inhibitory deacetylazy histonów (HDAC),
- 12) inhibitory fosfodiesterazy (PDE),
- 13) inhibitory kinaz serynowo-treoninowych (Ser-Thr)/kinaz tyrozynowych (TKI) (24/522; 4,60%)*,
- 14) inhibitory proteazy HIV,
- 15) inhibitory reduktazy HMG-CoA (statyny) (46/522; 8,81%)*,
- 16) inhibitory stresu retikulum endoplazmatycznego (ER) i dysfunkcji mitochondriów,
- 17) inhibitory szlaku przemian serotoniny (5-HT) (49/522; 9,39%)*,
- 18) inhibitory szlaku RhoA/ROCK (20/522; 3,83%)*,
- 19) kwas γ -aminomasłowy (GABA),
- 20) leki przeciwzakrzepowe/przeciwpłytkowe,
- 21) MK571,
- 22) peptydy wazoaktywne,
- 23) regulatory układu RAAS (38/522; 7,28%)*,
- 24) stymulatory rozpuszczalnej cyklazy guanylanowej (sGC),
- 25) U50,488H (agonista receptora κ -opiodowego),
- 26) związki o działaniu antyremodelingowym (30/522; 5,75%)*,
- 27) związki o działaniu przeciwzapalnym (51/522; 9,77%)*,
- 28) związki pochodzenia roślinnego (67/522; 12,84%)*,
- 29) związki redukujące stres oksydacyjny,
- 30) związki zwiększające poziom tlenku azotu (NO).

Do grupy związków o działaniu antyremodelingowym (punkt 26) zakwalifikowano substancje o właściwościach antyproliferacyjnych i/lub proapoptycznych, których mechanizmy działania, opisane dotychczas dla nadciśnienia płucnego, były inne niż w pozostałych grupach. Leki/substancje należące do dziesięciu najczęściej badanych grup w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych zestawiono w **Tabeli 4**. Związki należące do pozostałych grup przedstawiono w **Tabeli 2**, (**Załącznik 2**).

Tabela 4. Leki/substancje przydzielone do dziesięciu najczęściej badanych grup terapeutycznych/farmakologicznych (wg przyjętej w pracy klasyfikacji [168]) w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych

Lp.	Nazwa grupy terapeutycznej/farmakologicznej	Nazwa leku/substancji
1.	Agonisty receptorów/pochodne estrogenu	Agonisty receptorów estrogenowych: DPN, PPT, raloksyfen
		Pochodne estrogenu: 17 β -estradiol, 2-etoksyestradiol, 2-hydroksyestradiol, 2-metoksyestradiol
2.	Aktywatory kanałów potasowych ATP-zależnych	Iptakalim, nikorandyl, pinacydyl
3.	Inhibitory kinaz serynowo-treoninowych (Ser/Thr)/TKI	Imatynib, PH-797804, PK10453, SB203580, sorafenib, sunitynib, trycetyrybina
4.	Inhibitory reduktazy HMG-CoA (statyny)	Atorwastatyna, fluwastatyna, prawastatyna, rozuwastatyna, simwastatyna
5.	Inhibitory szlaku przemian serotoniny (5-HT)	Antagonisty receptora 5-HT_{1B}/SERT: LY393558
		Antagonisty receptorów serotoniny: C-122, DV-7028, GR127935, ketanseryna, PRX-08066, RS127445, sarpogrelat, terguryd
		Inhibitory hydroksylazy tryptofanowej (Tph): PCPA, LP533401
		Inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI): citalopram, fluoksetyna, sertralina

Tabela 4. cd.

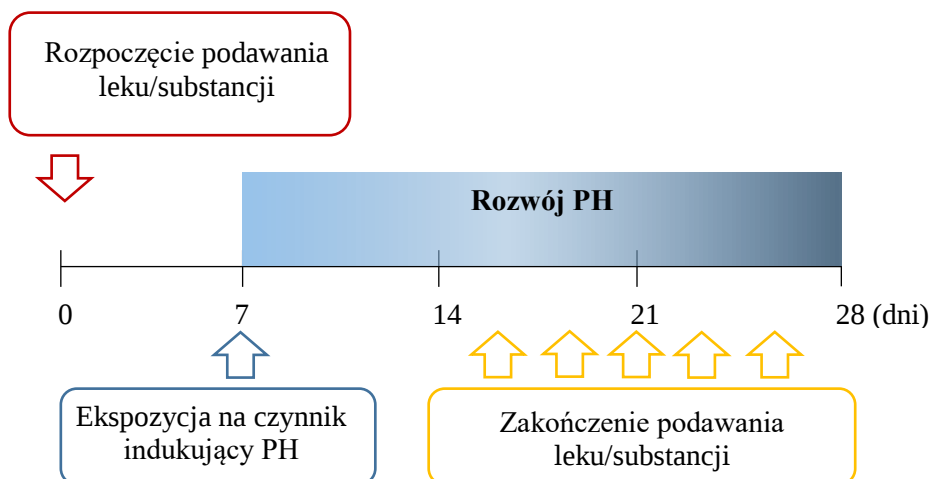
6.	Inhibitory szlaku RhoA/ROCK	Azaindol-1, fasudil, KMUP-1, KMUP-1A
7.	Regulatory układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS)	Adenozyna i agonisty receptora A_{2A}: adenozyna, LASSBio-1359, LASSBio-1386
		Agonisty receptora AT₂: C21
		Aktywatory konwertazy angiotensyny 2: NSC-354317, XNT
		Analogi angiotensyny: angiotensyna (1-7), cykliczny analog angiotensyny (1-7)
		Antagonisty aldosteronu: spironolakton
		Antagonisty receptora AT₁: GR138950C, losartan, olmesartan, telmisartan
7.	Regulatory układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS)	Inhibitory konwertazy angiotensyny (ACEI): enalapryl, peryndopryl, kwinaapryl
8.	Związki o działaniu antyremodelingowym	A-484954, AICAR, amiloryd, batimastat, bortezomib, DAPT, doksycyklina, EIPA, elafina, fenamil, LY294002, M249314, MDL28170, metformina, paklitaksel, ATRA, YM155, ZD0892
9.	Związki o działaniu przeciwzapalnym	DHEA, deksametazon, BI113823, etanercept, IMD-0354, interferon alfa-2b, infliksymab, kromoglikan dwusodowy, OA-NO ₂ , melatonina, montelukast, mykofenolan mofetylu, n-3 nienasycone kwasy tłuszczowe (kwas dokozapentaenowy, kwas dokozaheksaenowy), pirogronian etylu, PDTC, przeciwciała anty-TGF-β, rapamycyna, RAD, T9429
10.	Związki pochodzenia roślinnego	Azjatykozyd, bajkalina, brewiskapina, chryzyna, diosgenina, genisteina, ginkgolid B/ <i>Ginkgo biloba</i> glikozydy, glicyryzyna, kapsaicyna, kwas elagowy, kwercetyna, naryngenina, oridonina, oksymatryna, PNS, plumbagina, resweratrol, ruskogenina, rutakarpina, salidrozyd, sezamina, sulfonian sodowy <i>tanshinone IIA</i> (STS), tetrandryna, trimetoksystylben, tryptolid

b) Rodzaj schematu badawczego

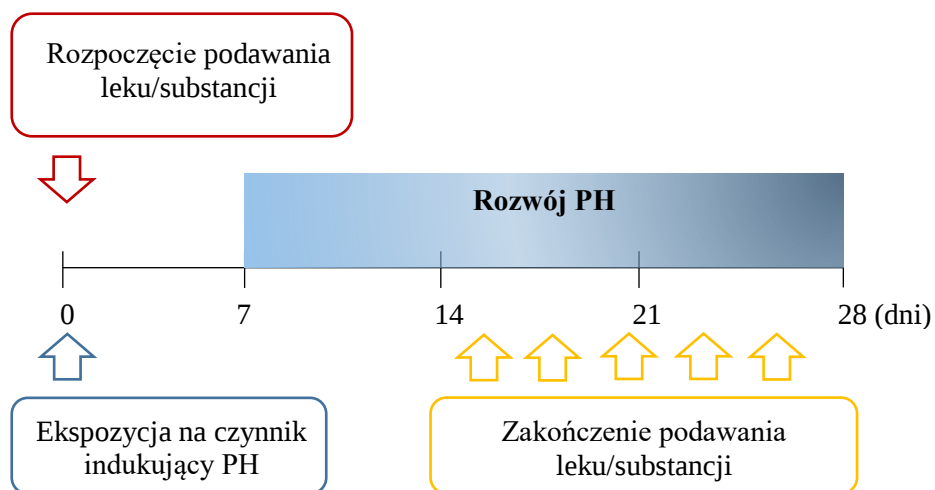
W analizowanych próbach eksperymentalnych zastosowano różne schematy badawcze. Testowane związki podawano w celu zapobiegania (model prewencyjny) lub cofnięcia (model terapeutyczny) zmian wywołanych w PH. W modelu prewencyjnym związki podawano zwierzętom przed indukcją schorzenia lub w krótkim czasie (np. w tym samym dniu) po ekspozycji na czynnik wywołujący PH, w modelu terapeutycznym – w trakcie rozwoju PH, po zaindukowaniu schorzenia.

Przykłady schematów badawczych stosowanych w zakwalifikowanych badaniach przedstawiono na **Rycinie 6**.

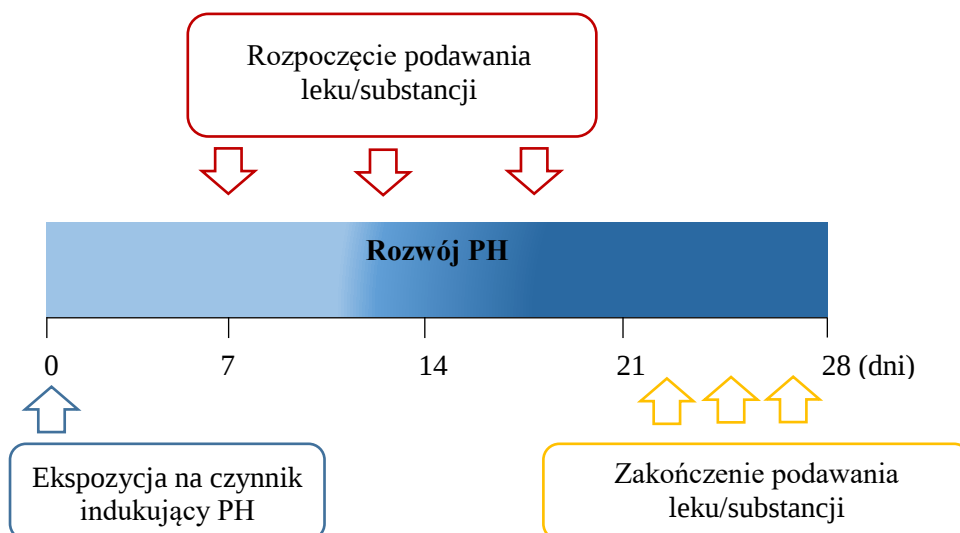
a)



b)

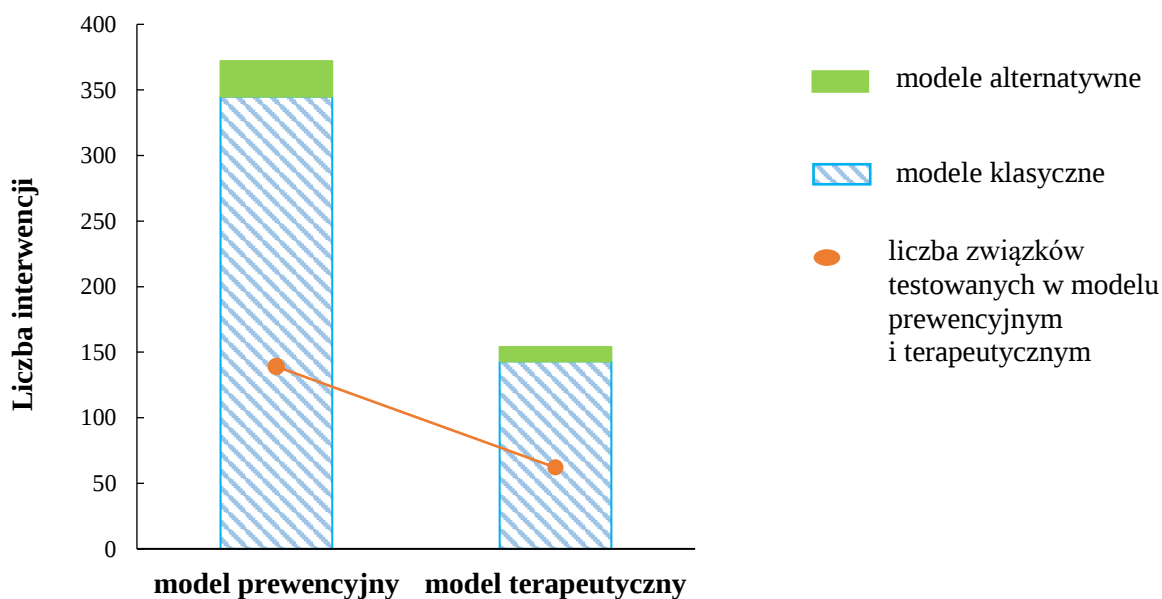


c)



Rycina 6. Przykłady schematów badawczych zastosowanych w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych: a) i b) model prewencyjny, c) model terapeutyczny. Rozwój nadciśnienia płucnego – pogorszenie ocenianych parametrów (oznaczono gradientem koloru niebieskiego), w zależności od czasu trwania indukcji PH

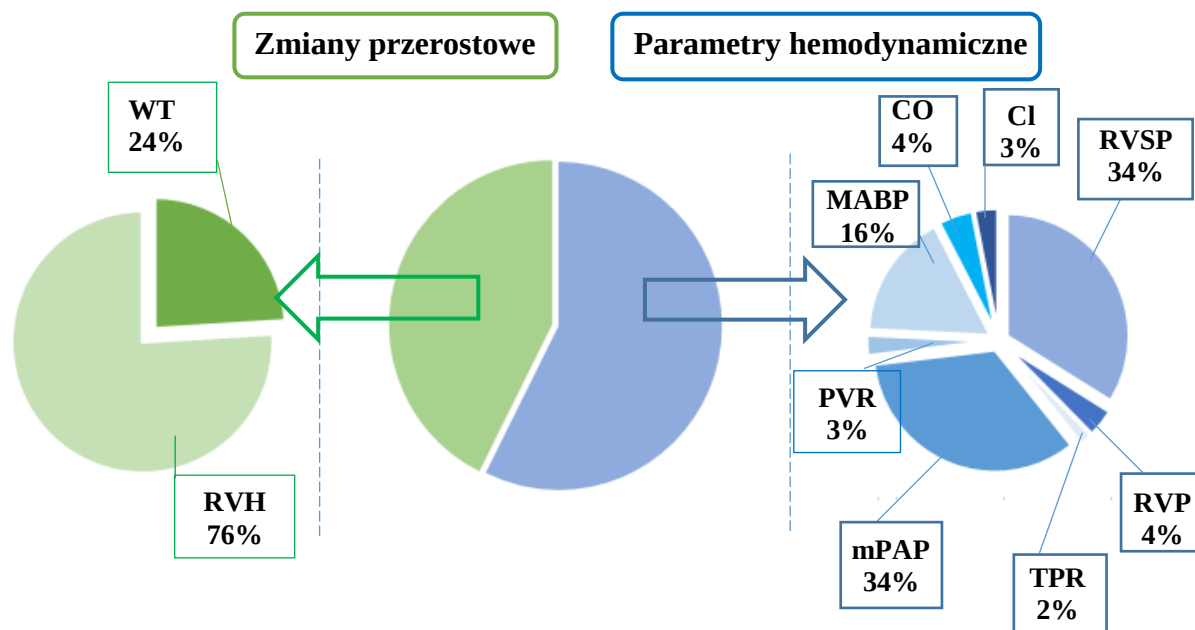
Większość analizowanych interwencji przeprowadzono w celu prewencji zmian związanych z rozwojem nadciśnienia płucnego (372/522; 71,26%) (**Rycina 7**).



Rycina 7. Rodzaje schematów badawczych zastosowanych w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych

3.2.2.4. Analizowane parametry hemodynamiczne i zmiany przerostowe

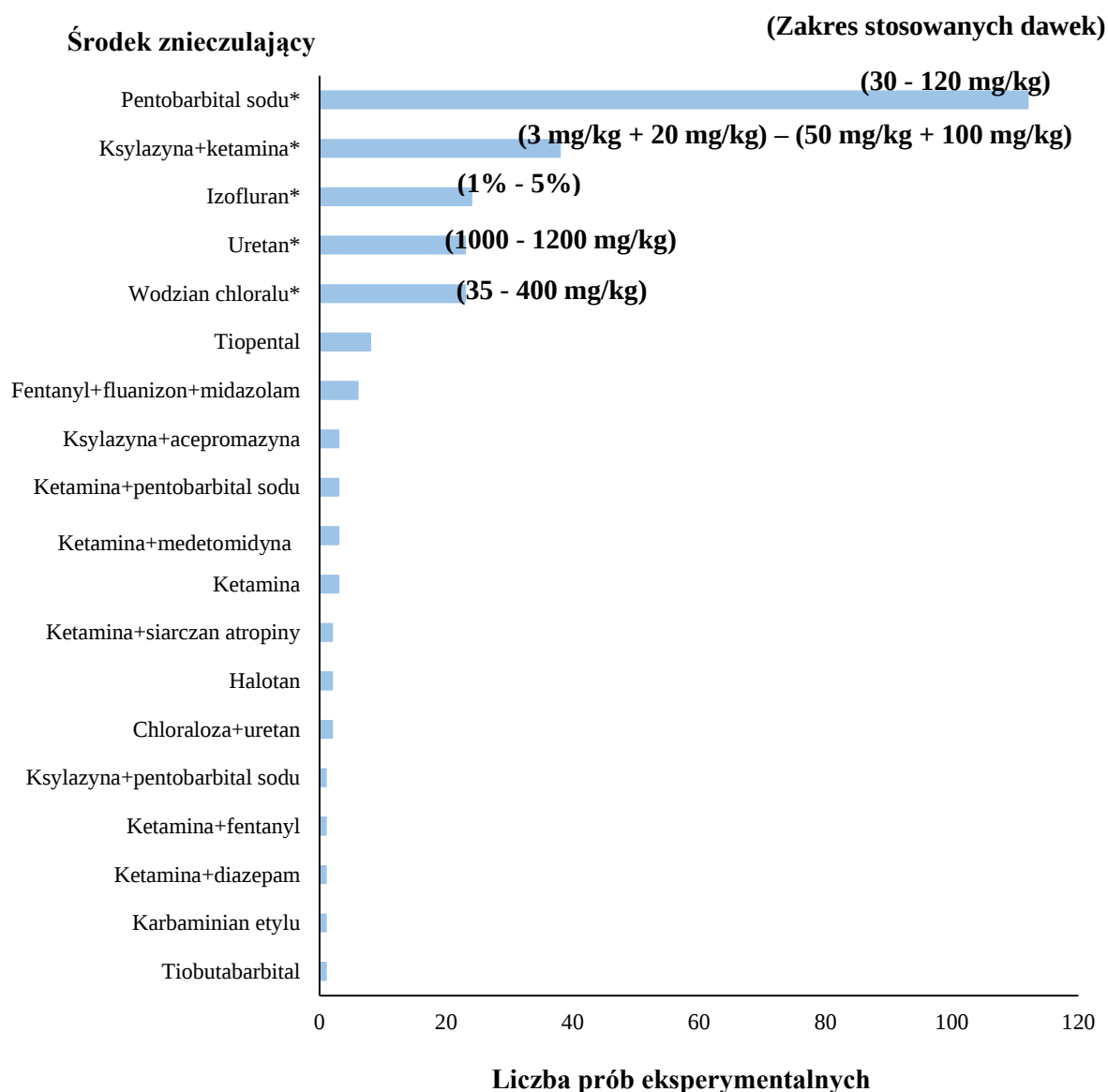
W zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych najczęściej badano przerost mięśnia prawej komory serca (indeks Fultona, 275/611; 45,01%) oraz parametry hemodynamiczne: średnie ciśnienie w tętnicy płucnej (165/611; 27,00%) i skurczowe ciśnienie w prawej komorze serca (165/611; 27,00%) (**Rycina 8**).



Rycina 8. Oceniane parametry hemodynamiczne i zmiany przerostowe w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych. % – odsetek ogólnej liczby interwencji (n=611)

3.2.2.5. Środki znieczulające zastosowane podczas badań hemodynamicznych

W 260 publikacjach (260/290; 89,66%) podano informacje o zastosowanych środkach znieczulających. W zakwalifikowanych badaniach użyto łącznie dziewiętnaście różnych związków lub ich połączeń. Środki znieczulające podawano w iniekcji dootrzewnowej, domięśniowej lub wziewnie. Większość interwencji (235/611; 38,46%) przeprowadzono z użyciem pentobarbitalu sodu, który podawano w zakresie dawek od 30 do 120 mg/kg m.c. Do dalszej analizy ilościowej wybrano pięć środków znieczulających, najczęściej stosowanych w analizowanych próbach eksperymentalnych – oznaczono * (**Rycina 9**).



Rycina 9. Środki znieczulające zastosowane podczas badań hemodynamicznych w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych

3.2.3. Ocena jakości zakwalifikowanych badań

Dla każdej ocenianej interwencji obliczono sumę punktów przyznanych za odpowiedzi w pozycjach 1–8 listy oceniającej jakość zakwalifikowanych publikacji. Mediana sum wszystkich interwencji wyniosła 3 (IQR: 2–3). Wyniki każdego z badań zostały opublikowane w recenzowanym czasopiśmie. Spośród 290 prób eksperymentalnych, w 193 (66,55%) badaniach podano informację o randomizowanym przydziale do badanych grup, w trzech (1,03%) o zaślepieniu przydziału do grupy badanej, w czterech (1,38%) o zaślepieniu oceny wyników, a w dwóch badaniach (0,69%) oszacowano wielkość próby. W 238 publikacjach (238/290; 82,07%) stwierdzono zgodność z wymogami regulującymi badania eksperymentalne na zwierzętach, a w 99 badaniach (34,14%)

odniesiono się do zaistnienia potencjalnego konfliktu interesów. Nie stwierdzono istotnej różnicy między próbami zaślepionymi i niezaślepionymi oraz między eksperymentami z losowym przydziałem do grup badanych oraz próbami nierandomizowanymi, w odniesieniu do średniego wzrostu RVSP, mPAP oraz RVH.

3.2.4. Analiza wpływu cech składowych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego na rozwój schorzenia

Stosowane w pracach poszczególne metody indukcji nadciśnienia płucnego wpłynęły istotnie na pogorszenie parametrów hemodynamicznych oraz nasilenie zmian przerostowych prawej komory serca i ściany tętnic płucnych. W porównaniu do kontroli negatywnej, wartości skurczowego ciśnienia w prawej komorze serca (RVSP) wzrosły średnio o 29,13 mmHg (27,27 – 30,99; $p < 0,00001$; 165 interwencji; 2661 zwierząt), średniego ciśnienia w prawej komorze serca (RVP) – o 21,29 mmHg (16,88 – 25,70; $p < 0,00001$; 18 interwencji; 275 zwierząt), średniego ciśnienia w tętnicy płucnej (mPAP) – o 17,32 mmHg (16,16 – 18,47; $p < 0,00001$; 165 interwencji; 2799 zwierząt), wartość parametru opisującego przerost mięśnia prawej komory serca (RVH) – o 0,22 (0,21 – 0,23; $p < 0,00001$; 275 interwencji; 4555 zwierząt), a przebudowę naczyń płucnych (WT) – o 19,58 (17,64 – 21,51; $p < 0,00001$; 122 interwencji; 2183 zwierząt). Przeprowadzona analiza niejednorodności wskazała na heterogenność wyników badań dla ocenianych parametrów: RVSP – $Q=6755,71$; $I^2=97,57\%$; $df=164$; $p < 0,00001$; RVP – $Q=861,23$; $I^2=98,03\%$; $df=17$; $p < 0,00001$; mPAP – $Q=6416,34$; $I^2=97,44\%$; $df=164$; $p < 0,00001$; RVH – $Q=12939,56$; $I^2=97,88\%$; $df=274$; $p < 0,00001$; WT – $Q=11300,36$; $I^2=98,93\%$; $df=121$; $p < 0,00001$.

3.2.4.1. Analiza w podgrupach

Określono wpływ cech składowych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego na pogorszenie parametrów hemodynamicznych i zmian przerostowych.

a) Rozwój nadciśnienia płucnego w zależności od gatunku zwierząt doświadczalnych

Próby eksperymentalne, w których zastosowano metodę indukcji nadciśnienia płucnego opartą na ekspozycji na przewlekłe niedotlenienie (CH), przeprowadzono z użyciem gatunku szczura lub myszy. Odnotowano różnice międzygatunkowe w odpowiedzi zwierząt na zastosowany model badawczy. Szczury, w porównaniu do myszy, w większym stopniu rozwinęły nadciśnienie płucne; potwierdziło to znamienne pogorszenie parametrów RVSP, RVH oraz WT ($p < 0,00001$). Badania z wykorzystaniem innych modeli przeprowadzono tylko na szczurach. Podobnie jak próby, w których oceniano przyrost średniego ciśnienia w tętnicy płucnej (mPAP).

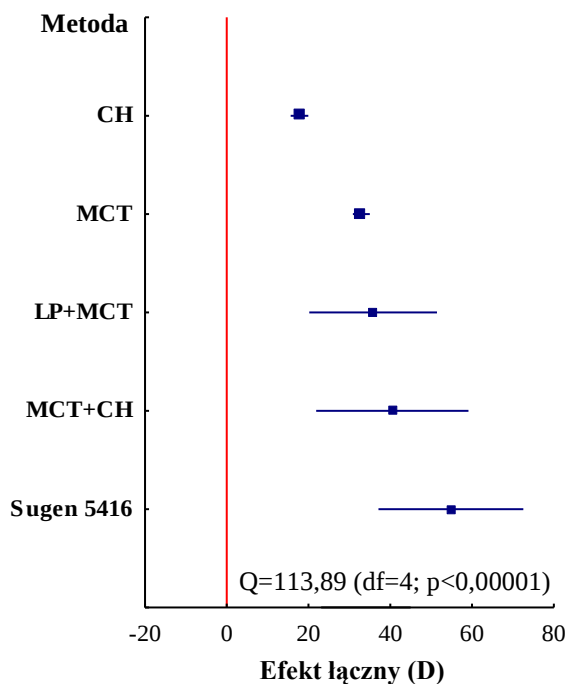
b) Rozwój nadciśnienia płucnego w zależności od wybranej metody indukcji schorzenia

Wszystkie zastosowane w próbach eksperymentalnych metody indukcji nadciśnienia płucnego, tj.: CH, MCT, CH+HC, LP+MCT, MCT+CH i/lub Sugén 5416, wpłynęły na pogorszenie analizowanych parametrów ($p < 0,05$). Klasyczne metody indukcji PH wywoływały słabszy rozwój schorzenia w porównaniu z metodami alternatywnymi. W modelu ekspozycji na przewlekłą hipoksję odnotowano najmniejszy przyrost wartości analizowanych parametrów. W próbach eksperymentalnych przeprowadzonych z użyciem Sugenu 5416 jako induktora, wykazano największy przyrost RVSP i WT. Znaczne pogorszenie RVH oraz mPAP uzyskano w metodach opartych na połączeniu usunięcia lewego płuca z monokrotaliną. Model Sugenu 5416 nie był oceniany z uwagi na brak wyników odnoszących się do parametrów RVH i mPAP we włączonych badaniach. Analiza niejednorodności wskazała na brak efektu wspólnego pomiędzy badanymi metodami indukcji PH ($p < 0,05$), co dało podstawy do odrzucenia hipotezy o jednorodności badań. Szczegółowe wyniki przedstawiono w **Tabeli 5** oraz na **Rycinie 10**.

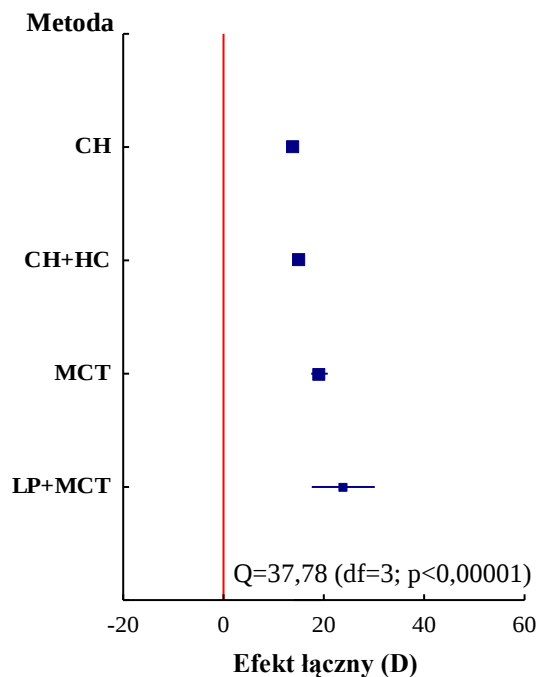
Tabela 5. Wpływ wybranych metod indukcji nadciśnienia płucnego na rozwój schorzenia. Efekt łączny wyrażony jako różnica średnich (D) (model z efektem zmiennym)

Parametr	Metoda indukcji PH	D	95% PU	p
RVSP [mmHg]	Metody klasyczne	28,19	26,37–30,00	<0,00001
	CH	17,80	15,65–19,95	<0,00001
	MCT	32,93	30,88–34,98	<0,00001
	Metody alternatywne	42,89	33,80–51,97	<0,00001
	Sugen 5416	54,84	31,12–72,56	<0,00001
	MCT+CH	40,52	21,90–59,14	<0,00001
	LP+MCT	35,83	20,22–51,45	<0,00001
RVP [mmHg]	MCT	27,17	17,20–37,14	<0,00001
	CH	11,90	8,45–15,35	<0,00001
mPAP [mmHg]	Metody klasyczne	16,45	15,42–17,47	<0,00001
	CH	13,62	12,53–14,71	<0,00001
	MCT	19,13	17,49–20,78	<0,00001
	Metody alternatywne	23,36	17,94–28,78	<0,00001
	LP+MCT	23,89	17,62–30,16	<0,00001
	CH+HC	14,92	14,00–15,84	<0,00001
RVH	Metody klasyczne	0,21	0,20–0,22	<0,00001
	CH	0,16	0,15–0,18	<0,00001
	MCT	0,23	0,22–0,25	<0,00001
	Metody alternatywne	0,38	0,35–0,41	0,00001
	Sugen 5416	0,42	0,34–0,50	<0,00001
	MCT+CH	0,30	0,18–0,42	<0,00001
	LP+MCT	0,38	0,35–0,41	<0,00001
WT [%]	Metody klasyczne	19,01	17,11–20,91	<0,00001
	CH	11,97	9,65–14,28	<0,00001
	MCT	22,64	19,89–25,40	<0,00001
	Metody alternatywne	31,87	16,98–46,77	<0,00001
	MCT+CH	16,83	3,19–30,55	=0,0162
	LP+MCT	41,71	28,99–54,43	<0,00001

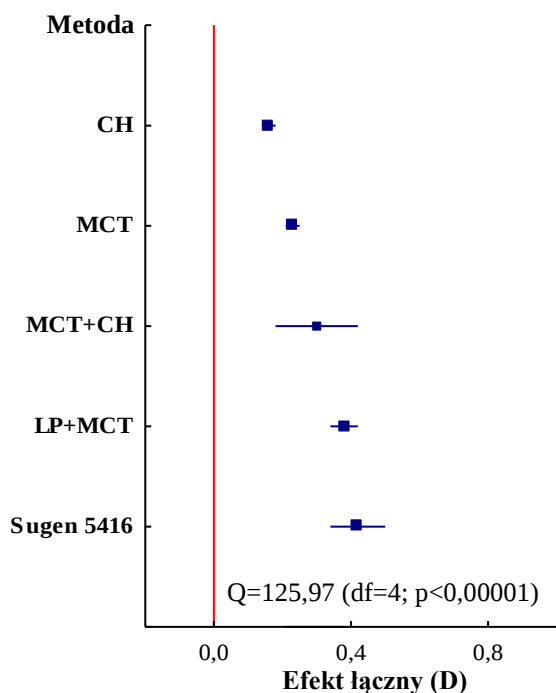
a)



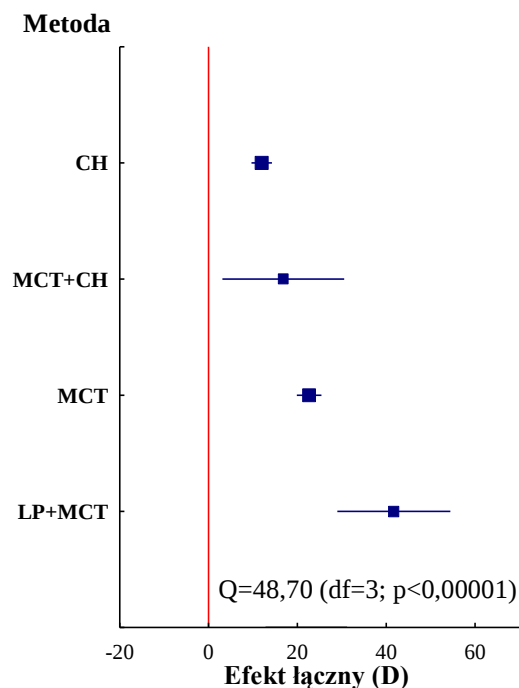
b)



c)

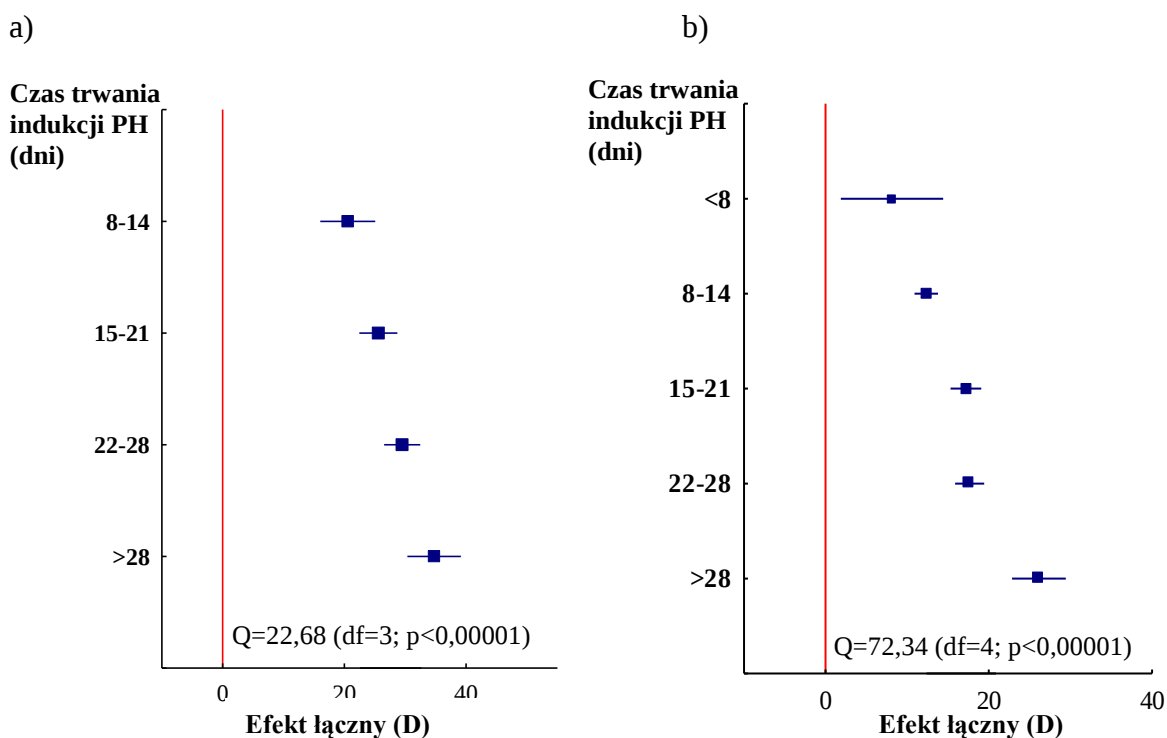


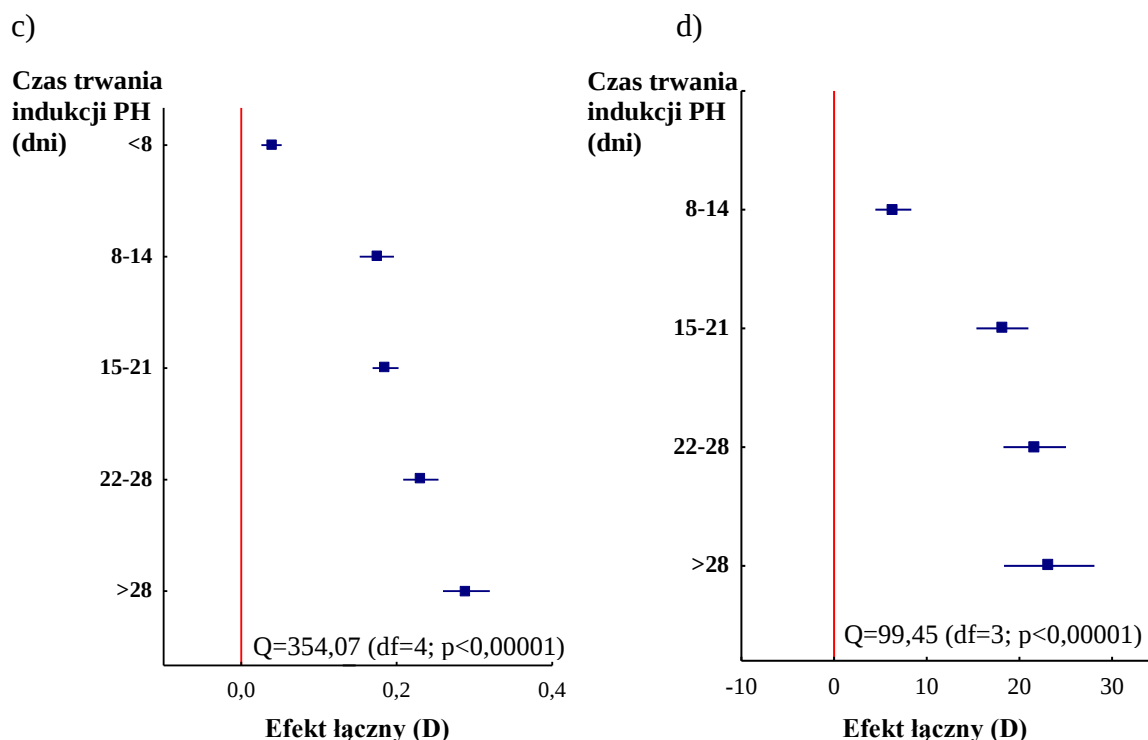
d)



Rycina 10. Wpływ metod indukcji nadciśnienia płucnego na pogorszenie parametrów: a) RVSP, b) mPAP, c) RVH, d) WT. Efekt łączny wyrażony jako różnica średnich (D) (model z efektem zmiennym). Poziome słupki błędów odpowiadają 95% przedziałowi ufności. Wielkość znaczników jest proporcjonalna do wagi badań, która stanowi odwrotność wariancji wewnątrz badań, powiększonej o wariancję pomiędzy badaniami (zmienność). Q – współczynnik Cochra; df - liczba stopni swobody

W analizowanych próbach eksperymentalnych wydłużenie czasu indukcji nadciśnienia płucnego skutkowało pogorszeniem ocenianych parametrów ($p < 0,05$). Największy przyrost RVSP, mPAP oraz RVH zaobserwowano, gdy indukcja schorzenia trwała powyżej 28 dni, a WT – powyżej 14 dni. Przeprowadzona analiza niejednorodności wskazała na istotną zmienność wyników w badanych grupach, które zostały wyznaczone przez podgrupy – kategorie czasu trwania indukcji PH ($p < 0,05$) (Rycina 11).





Rycina 11. Wpływ czasu trwania indukcji nadciśnienia płucnego na pogorszenie parametrów: a) RVSP, b) mPAP, c) RVH, d) WT. Efekt łączny wyrażony jako różnica średnich (D) (model z efektem zmiennym). Poziome słupki błędów odpowiadają 95% przedziałowi ufności. Wielkość znaczników jest proporcjonalna do wagi badań. Q – współczynnik Cochran’a; df – liczba stopni swobody

d) Rozwój nadciśnienia płucnego w zależności od zastosowanej dawki monokrotaliny

W zakwalifikowanych próbach przedklinicznych zwiększenie dawki czynnika indukującego nadciśnienie płucne – monokrotaliny, spowodowało pogorszenie ocenianych parametrów hemodynamicznych i zmian przerostowych. Z uwagi na znaczną zmienność wyników przeprowadzono dalsze analizy w podgrupach. Odnotowano, że większe dawki MCT miały istotny wpływ na przyrost skurczowego ciśnienia w prawej komorze serca w tych badaniach, gdzie czas trwania indukcji nadciśnienia płucnego przekraczał 14 dni ($p < 0,00001$). Zastosowanie monokrotaliny w dużych dawkach – powyżej 70 mg/kg m.c. nie wpłynęło istotnie na dalsze pogorszenie ciśnienia skurczowego w prawej komorze serca. Istotną zależność pomiędzy zwiększeniem dawki MCT i pogorszeniem RVH odnotowano w modelach, w których zastosowano dawkę induktora większą niż 60 mg/kg m.c., a czas wywołania schorzenia przekraczał 28 dni ($p < 0,00001$).

e) Rozwój nadciśnienia płucnego w zależności od rodzaju zastosowanego środka znieczulającego podczas badań hemodynamicznych

Wybór środka znieczulającego do badań hemodynamicznych wpływał na wartość ocenianych parametrów. Przykładowo, wartości skurczowego ciśnienia w prawe komorze serca (RVSP) i średniego ciśnienia w tętnicy płucnej (mPAP) odczytane podczas pomiarów były znacząco wyższe w tych próbach przedklinicznych, w których zastosowano izofluran. W tych próbach eksperymentalnych, gdzie zastosowano chloral sodu przyrost RVSP był najmniejszy. Podobną zależność wykazano, gdy wzięto pod uwagę wybrane metody indukcji, tj. MCT lub CH, a czas trwania indukcji nadciśnienia płucnego wynosił więcej niż 14 dni (**Tabela 6**).

Tabela 6. Wpływ środka znieczulającego zastosowanego podczas badań hemodynamicznych na rozwój nadciśnienia płucnego w zależności od składowych modelu zwierzęcego PH: czasu trwania i metody indukcji PH. Efekt łączny wyrażony jako różnica średnich (D) (model z efektem zmiennym)

Parametr	Składowa modeli zwierzęcych PH	Środek znieczulający	D	95% PU	p
RVSP [mmHg]	Czas trwania indukcji PH (wszystkie kategorie)	Izofluran	30,35	30,24–40,48	<0,00001
		Uretan	30,65	21,89–39,42	<0,00001
		Pentobarbital sodu	28,17	25,38–30,96	<0,00001
		Ksylazyna+ketamina	22,13	17,62–26,64	<0,00001
		Wodzian chloralu	21,66	14,10–29,21	<0,00001
	Czas trwania indukcji PH > 14 dni	Izofluran	37,72	32,14–43,30	<0,00001
		Uretan	30,65	21,89–39,42	<0,00001
		Pentobarbital sodu	28,04	25,11–30,97	<0,00001
		Ksylazyna+ketamina	25,61	19,35–31,87	<0,00001
		Wodzian chloralu	21,66	14,10–29,21	<0,00001
	MCT (wszystkie kategorie czasu trwania indukcji PH)	Izofluran	36,60	29,80–43,39	<0,00001
		Uretan	35,64	27,27–44,01	<0,00001
		Pentobarbital sodu	31,19	28,05–34,34	<0,00001
		Ksylazyna+ketamina	29,52	21,87–37,17	<0,00001
		Wodzian chloralu	21,66	14,10–29,21	<0,00001
	CH (wszystkie kategorie czasu trwania indukcji PH)	Izofluran	20,89	15,62–26,16	<0,00001
		Pentobarbital sodu	20,08	16,80–23,35	<0,00001
		Uretan	16,86	6,07–27,66	=0,0022
		Ksylazyna+ketamina	13,02	8,73–17,31	<0,00001

Tabela 6 cd.

mPAP [mmHg]	Czas trwania indukcji PH (wszystkie kategorie)	Izofluran	24,84	18,07–31,61	<0,00001
		Uretan	16,50	13,17–19,84	<0,00001
		Pentobarbital sodu	14,37	13,06–15,68	<0,00001
		Ksylazyna+ketamina	20,08	15,85–24,31	<0,00001
		Wodzian chloralu	17,16	14,86–19,45	<0,00001
	Czas trwania indukcji PH > 14 dni	Izofluran	24,84	18,07–31,61	<0,00001
		Uretan	21,11	16,70–25,51	<0,00001
		Pentobarbital sodu	15,56	13,84–17,28	<0,00001
		Ksylazyna+ketamina	21,93	18,85–25,00	<0,00001
		Wodzian chloralu	17,16	14,86–19,45	<0,00001
	MCT (wszystkie kategorie czasu trwania indukcji PH)	Izofluran	24,84	18,07–31,61	<0,00001
		Ksylazyna+ketamina	22,38	18,74–26,02	<0,00001
		Uretan	20,28	13,66–26,90	<0,00001
		Wodzian chloralu	18,56	15,77–21,35	<0,00001
		Pentobarbital sodu	17,17	14,62–19,73	<0,00001
	CH (wszystkie kategorie czasu trwania indukcji PH)	Ksylazyna+ketamina	17,13	13,13–20,93	<0,00001
		Uretan	12,40	9,18–15,61	<0,00001
		Pentobarbital sodu	11,89	10,60–13,18	<0,00001
		Wodzian chloralu	10,60	8,73–12,47	<0,00001

3.2.4.2. Analiza wrażliwości

Przeprowadzona analiza wrażliwości wykazała, że żadna z zakwalifikowanych do meta-analizy interwencji nie wpłynęła istotnie na zmianę efektu łącznego wyrażonego jako różnica średnich (D) ($p < 0,00001$). Tym samym żadne z włączonych badań nie odbiegało od pozostałych na tyle, by znacząco wpływać na wartości ocenianych parametrów. W **Tabeli 7** zestawiono efekt łączny po uwzględnieniu wszystkich interwencji oraz po wyłączeniu interwencji o największym wpływie na całościowy wynik.

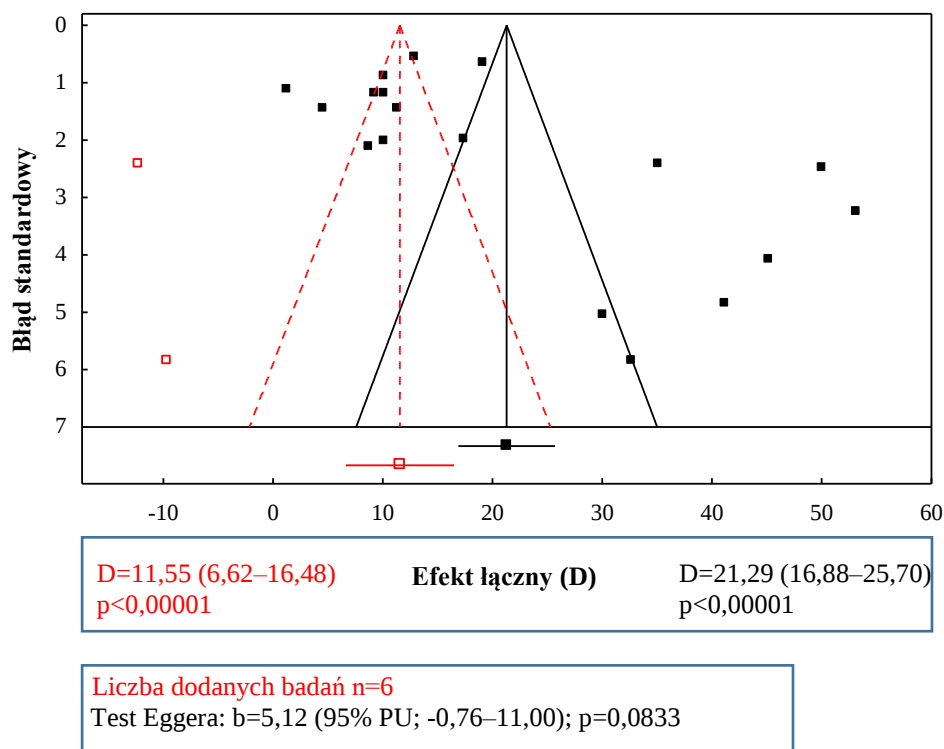
Tabela 7. Analiza wrażliwości przeprowadzona dla interwencji opisujących modele zwierzęce nadciśnienia płucnego, zastosowane w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych. Efekt łączny wyrażony jako różnica średnich (D) (model z efektem zmiennym)

Parametr		D	95% PU	p	Zmiana SD %
RVSP [mmHg]	Efekt łączny	29,13	27,27–30,99	<0,00001	0,00
	Efekt łączny po usunięciu interwencji*	29,22	27,28–31,16	<0,00001	4,44
		29,19	27,42–30,95	<0,00001	-4,99
mPAP [mmHg]	Efekt łączny	21,29	16,88–25,70	<0,00001	0,00
	Efekt łączny po usunięciu interwencji*	22,08	16,79–27,36	<0,00001	19,92
		19,30	15,33–23,28	<0,00001	-9,81
RVH	Efekt łączny	17,32	16,16–18,47	<0,00001	0,00
	Efekt łączny po usunięciu interwencji*	17,35	16,16–18,54	<0,00001	2,34
		18,36	16,30–18,43	<0,00001	-8,28
WT[%]	Efekt łączny	0,22	0,21–0,23	<0,00001	0,00
	Efekt łączny po usunięciu interwencji*	0,22	0,21–0,24	<0,00001	3,60
		0,22	0,20–0,23	<0,00001	-9,07

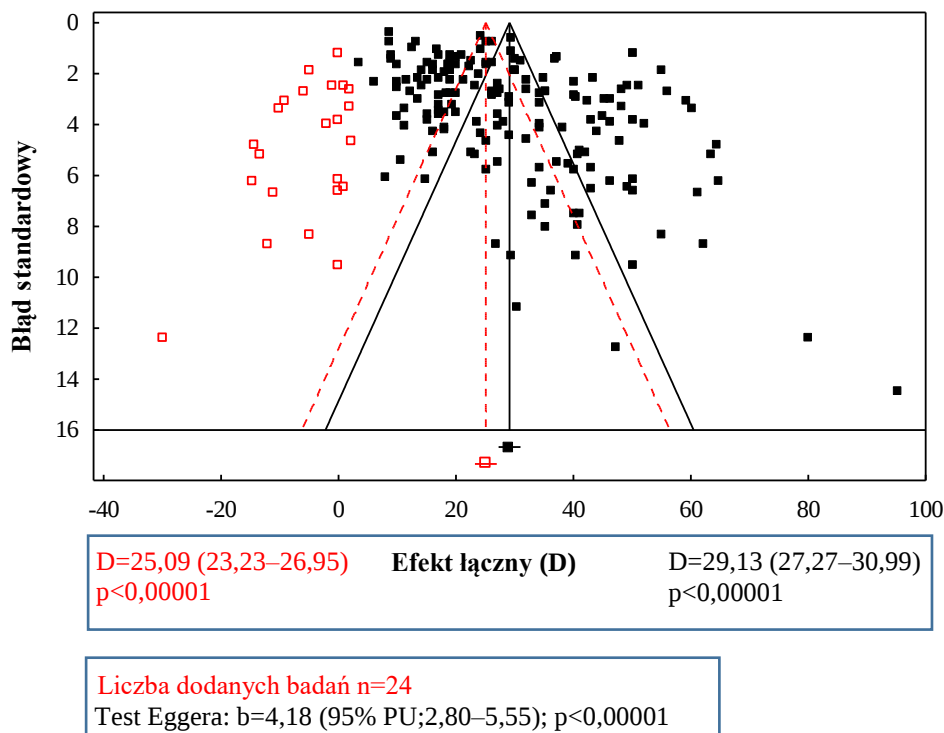
3.2.4.3. Błąd publikacji

Wykresy lejkowe dla parametrów RVSP, RVP, mPAP, RVH oraz WT obrazują niesymetryczny rozrzut wyników badań wokół efektu łącznego (D). Wskazuje to na obciążenie publikacyjne badanych prób. Wyniki testów asymetrii Begga i Mazumdar oraz test Eggera wskazały na istotną statystycznie zależność między błędem standardowym efektu a jego wartością dla parametrów RVSP, mPAP, RVH oraz WT. Potwierdza to obciążenie mierzonego efektu łącznego (D) błędem systematycznym. Przeprowadzona procedura *Trim and Fill* umożliwiła ocenę wielkości efektu po skorygowaniu o błąd publikacji dla parametrów RVSP, RVP, mPAP, WT i RVH (**Rycina 12**).

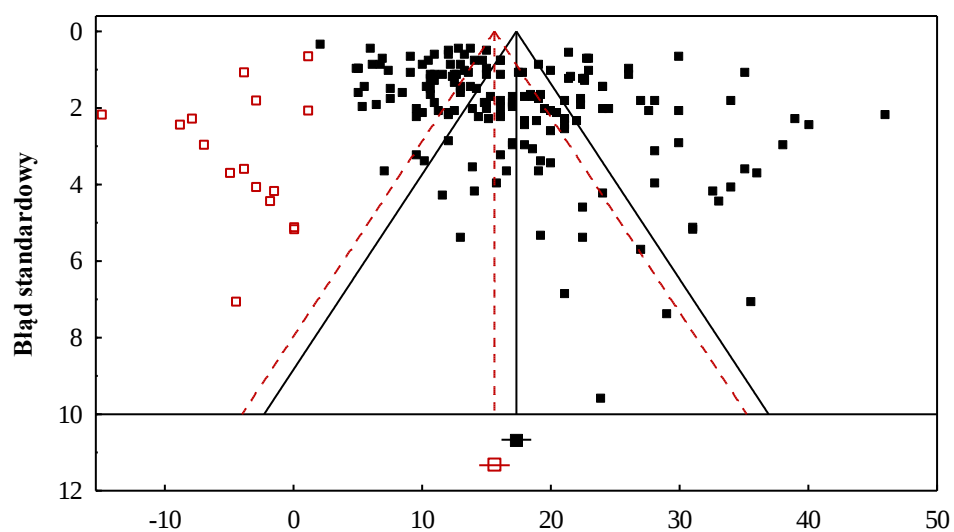
a)



b)



c)



$D=15,61$ (14,43–16,80)
 $p<0,00001$

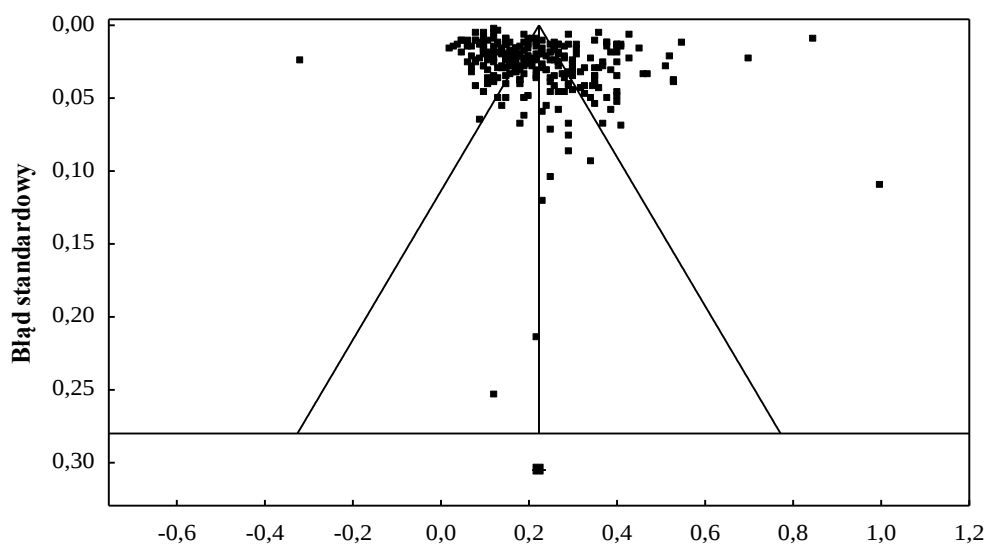
Efekt łączny (D)

$D=17,32$ (16,16–18,47)
 $p<0,00001$

Liczba dodanych badań $n=24$

Test Eggera: $b=4,11$ (95% PU; 2,53–5,69); $p<0,00001$

d)

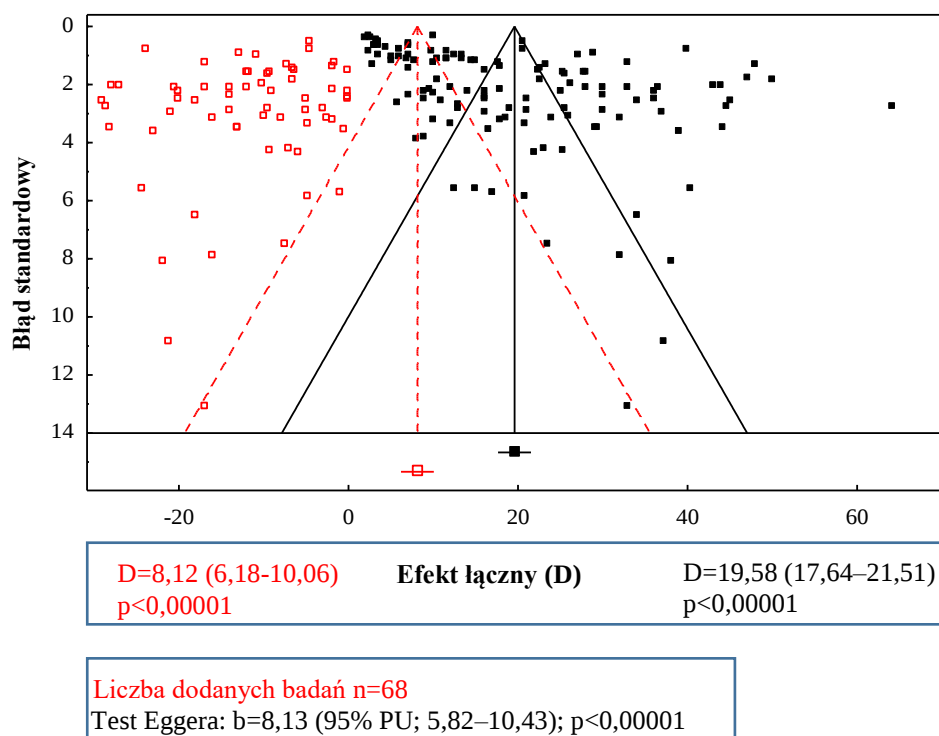


Efekt łączny (D)

$D=0,22$ (0,21–0,23)
 $p<0,00001$

Test Eggera: $b=2,72$ (95% CI; 1,36–4,08); $p=0,0001$

e)

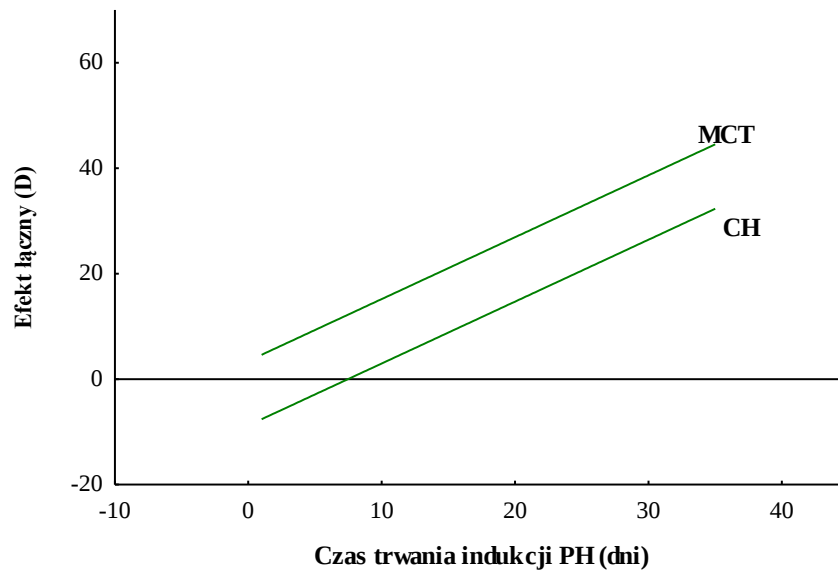


Rycina 12. Wykresy lejkowe (model z efektem zmiennym; 95% PU) z wynikami metody *Trim and Fill* dla parametrów: a) RVP, b) RVSP, c) mPAP, d) RVH, e) WT. Mierzony efekt łączny wyrażono jako D (różnica średnich). Wypełnione kwadraty oznaczają opublikowane badania zakwalifikowane do metaanalizy; niewypełnione, czerwone kwadraty – badania dodatkowe, potencjalnie brakujące. Linie ciągłe odnoszą się do rzeczywistego efektu łącznego (D) i rozrzutu wyników w badaniach włączonych do meta-analizy, linie przerywane opisują efekt łączny (D) po skorygowaniu o błąd publikacji i rozrzut wyników w badaniach dodatkowych

3.2.4.4. Meta-regresja

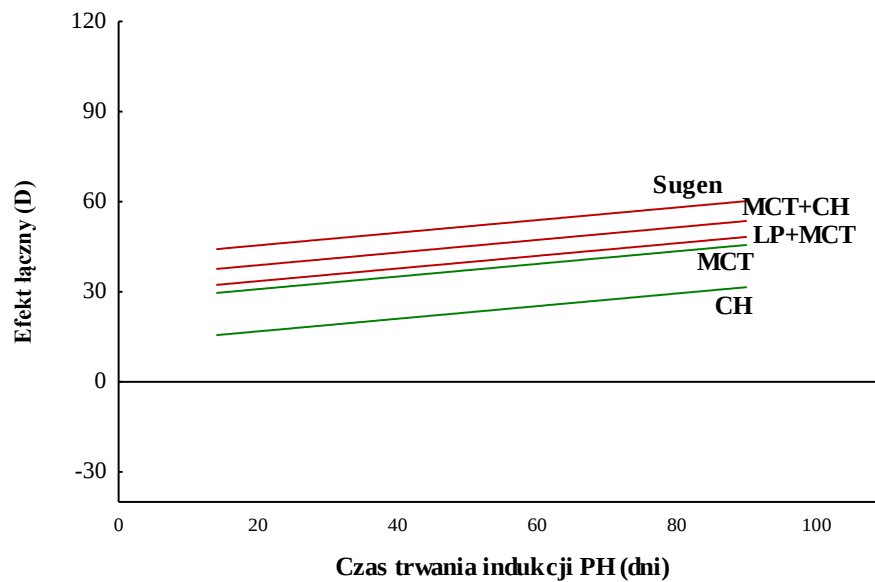
Wyniki analizy meta-regresji (model z efektem zmiennym) wskazują na istotny wpływ czasu trwania indukcji nadciśnienia płucnego oraz wybranej metody indukcji schorzenia na pogorszenie analizowanych parametrów hemodynamicznych i przerostowych ($p < 0,05$) (**Rycina 13**).

a)



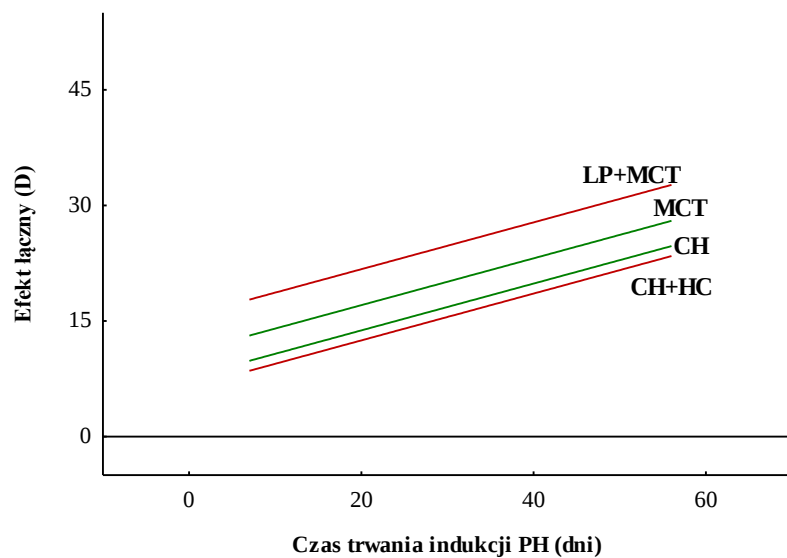
Równania regresji: **MCT:** $D = 3,44 + 1,17 \times x$ ($p < 0,05$)
CH: $D = -8,78 + 1,17 \times x$ ($p < 0,05$)

b)



Równania regresji: **Sugon:** $D = 41,25 + 0,21 \times x$ ($p < 0,05$)
MCT+CH: $D = 34,66 + 0,21 \times x$ ($p < 0,05$)
LP+MCT: $D = 29,34 + 0,21 \times x$ ($p < 0,05$)
MCT: $D = 26,66 + 0,21 \times x$ ($p < 0,05$)
CH: $D = 12,60 + 0,21 \times x$ ($p < 0,05$)

c)



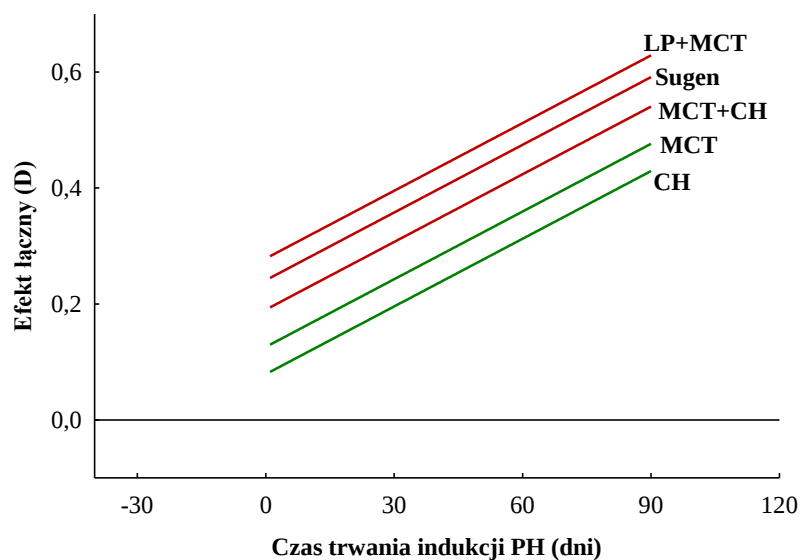
Równania regresji: **LP+MCT:** $D = 15,65 + 0,3 \times x$ ($p < 0,05$)

MCT: $D = 10,98 + 0,3 \times x$ ($p < 0,05$)

CH: $D = 7,71 + 0,3 \times x$ ($p < 0,05$)

CH+HC: $D = 6,41 + 0,3 \times x$ ($p < 0,05$)

d)



Równania regresji: **LP+MCT:** $D = 0,28 + 0,004 \times x$ ($p < 0,05$)

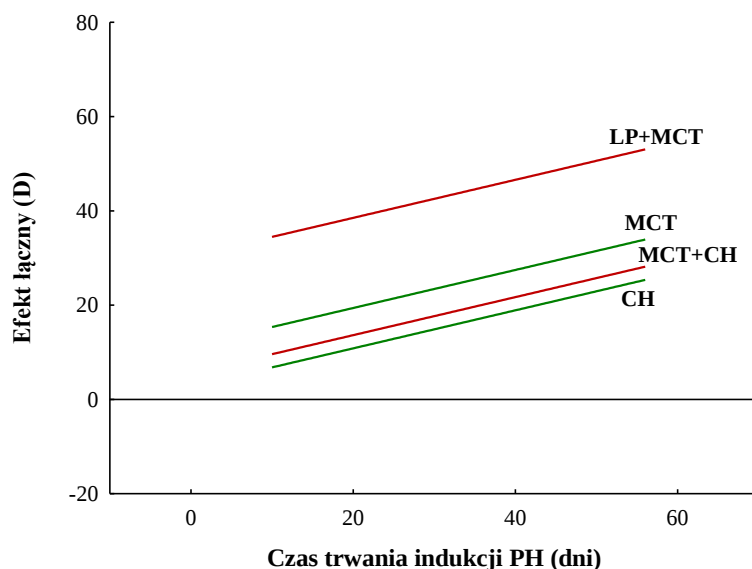
Sugen: $D = 0,24 + 0,004 \times x$ ($p < 0,05$)

MCT+CH: $D = 0,19 + 0,004 \times x$ ($p < 0,05$)

MCT: $D = 0,13 + 0,004 \times x$ ($p < 0,05$)

CH: $D = 0,08 + 0,004 \times x$ ($p < 0,05$)

e)



Równania regresji: **LP+MCT:** $D = 30,45 + 0,40 \times x$ ($p < 0,05$)

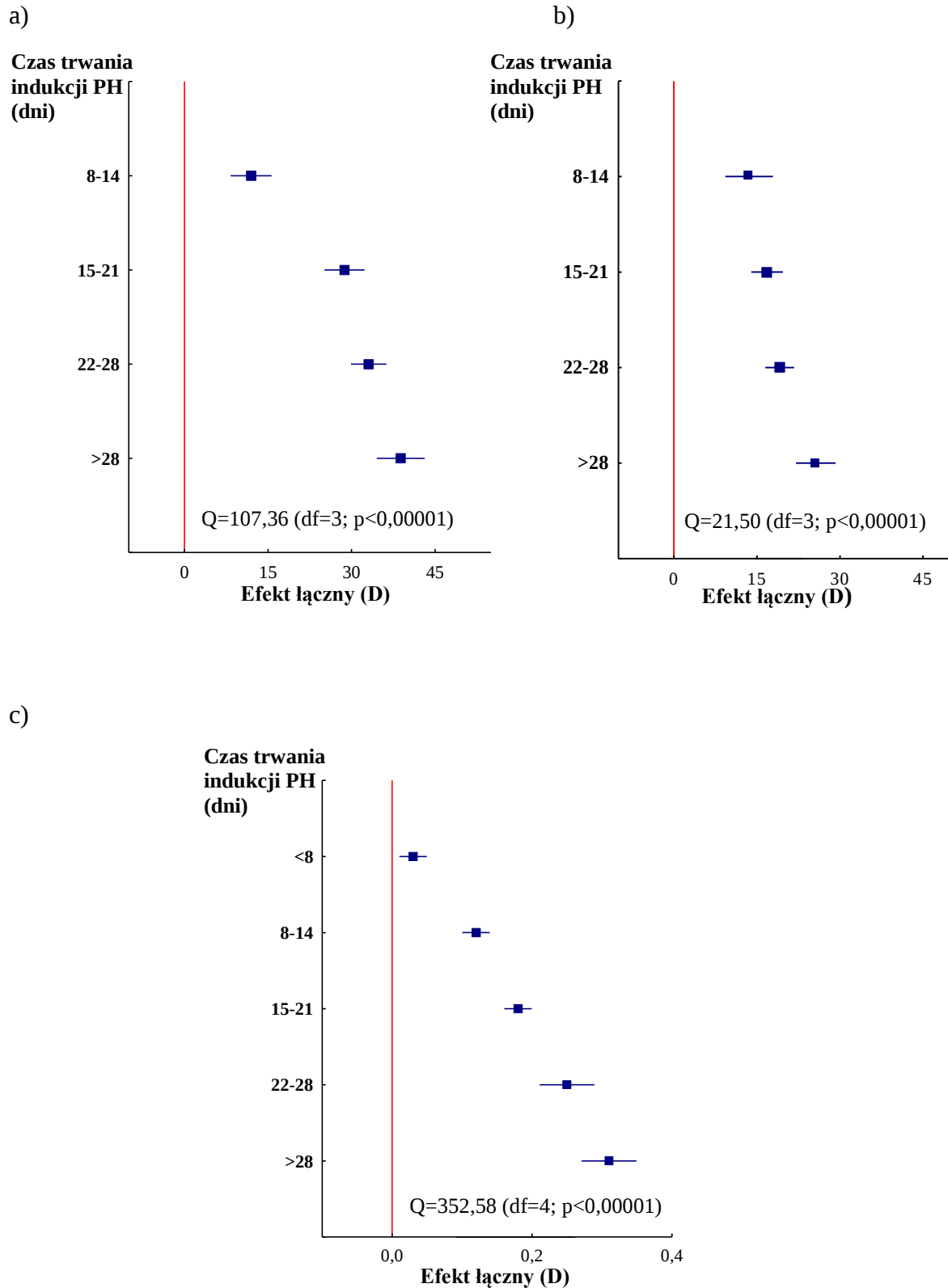
MCT: $D = 11,32 + 0,40 \times x$ ($p < 0,05$)

MCT+CH: $D = 5,56 + 0,40 \times x$ ($p < 0,05$)

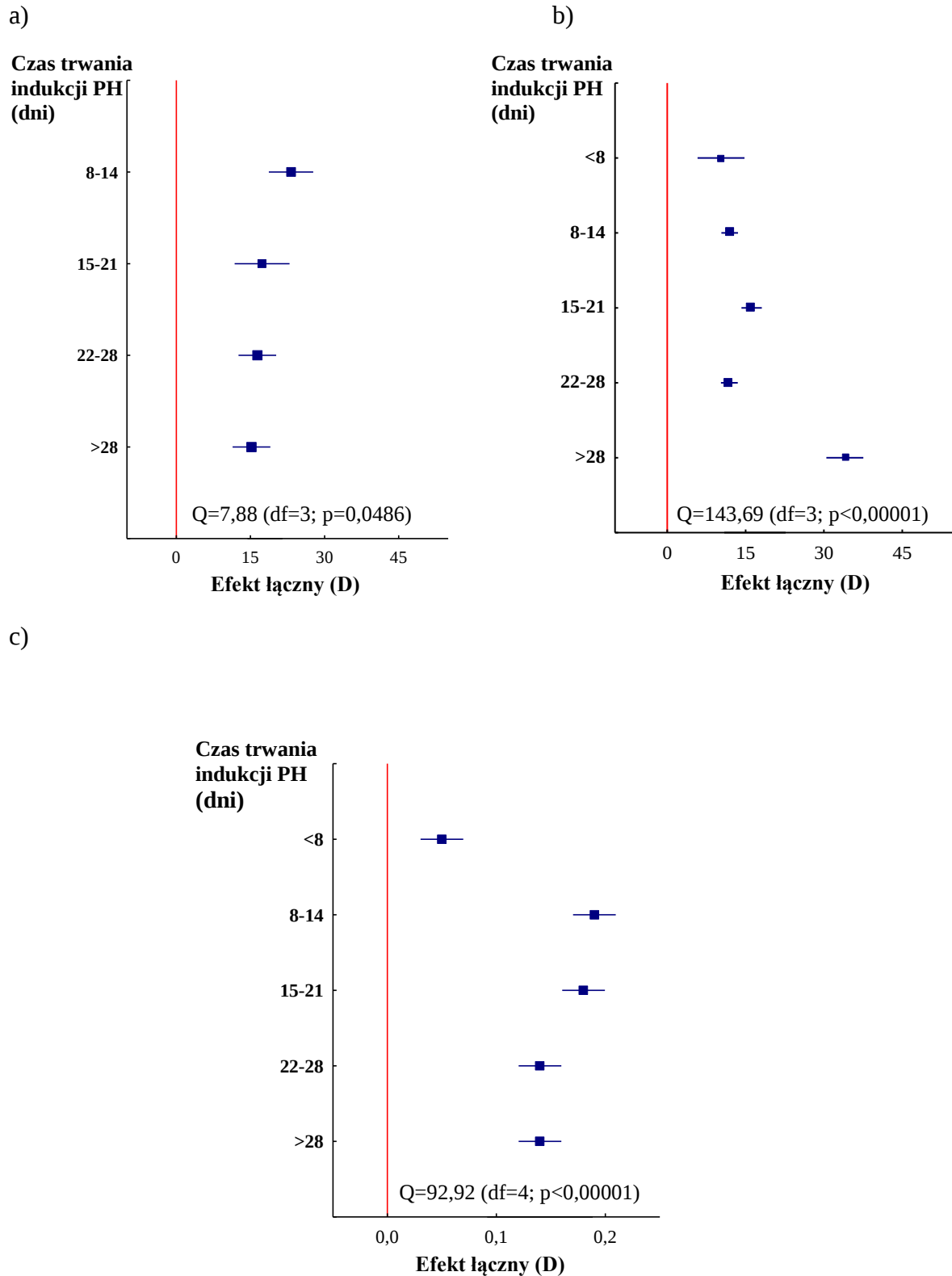
CH: $D = 2,76 + 0,40 \times x$ ($p < 0,05$)

Rycina 13. Meta-regresja zależności pomiędzy czasem trwania indukcji PH a efektem łącznym (D), z uwzględnieniem rodzaju metody indukcji PH dla parametrów: a) RVP, b) RVSP, c) mPAP, d) RVH, e) WT. Mierzony efekt łączny wyrażony jako D (różnica średnich). Kolorem czerwonym oznaczono metody alternatywne, zielonym – metody klasyczne

Wyniki analizy meta-regresji wskazały, że wydłużenie czasu indukcji nadciśnienia płucnego w mniejszym stopniu wpłynęło na pogorszenie ocenianych zmian w odniesieniu do klasycznych metod indukcji. Dlatego przeprowadzono analizy, których celem było porównanie wpływu wybranych składowych modeli zwierzęcych PH na najczęściej raportowane parametry spośród analizowanych, tj. RVSP, mPAP i RVH, z uwzględnieniem jedynie klasycznych metod (MCT, CH). W przypadku zwierząt doświadczalnych poddanych ekspozycji na przewlekłą hipoksję, wpływ czasu trwania indukcji PH na pogorszenie RVSP, mPAP, RVH był mniejszy w porównaniu do metody indukcji opartej na monokrotalinie. Przeprowadzona analiza niejednorodności potwierdziła heterogenność uzyskanych wyników ($p < 0,00001$) (**Rycina 14 i 15**).



Rycina 14. Wpływ czasu trwania indukcji nadciśnienia płucnego na pogorszenie parametrów: a) RVSP, b) mPAP, c) RVH dla modelu MCT. Efekt łączny wyrażony jako różnica średnich (D) (model z efektem zmiennym). Poziome słupki błędów odpowiadają 95% przedziałowi ufności. Q – współczynnik Cochran, df – liczba stopni swobody



Rycina 15. Wpływ czasu trwania indukcji nadciśnienia płucnego na pogorszenie parametrów: a) RVSP, b) mPAP, c) RVH dla modelu CH. Efekt łączny wyrażony jako różnica średnich (D) (model z efektem zmiennym). Poziome słupki błędów odpowiadają 95% przedziałowi ufności. Q – współczynnik Cochrańa, df – liczba stopni swobody

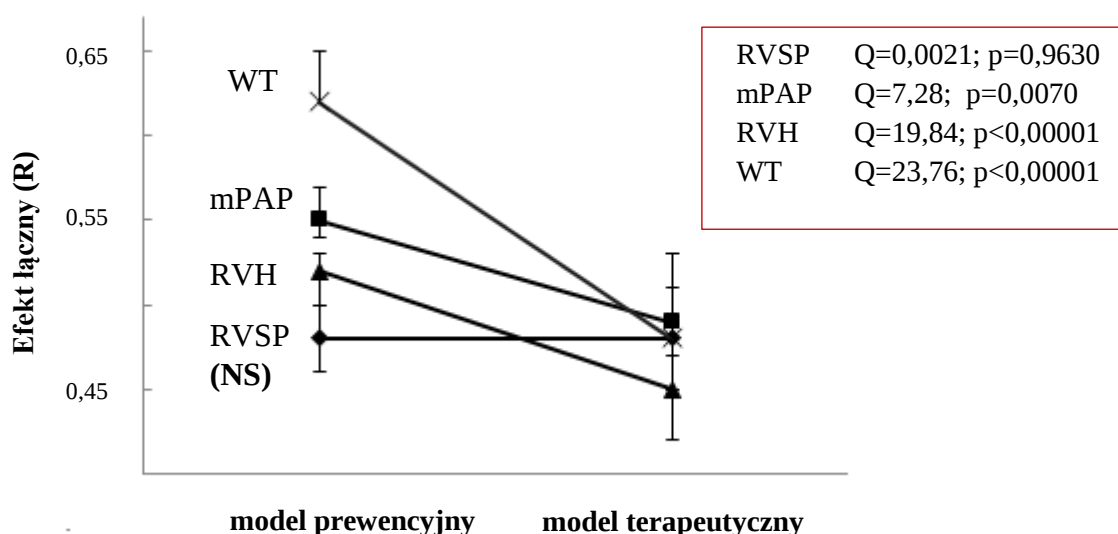
3.2.5. Ocena efektywności nowych, potencjalnych leków w terapii nadciśnienia płucnego

W zakwalifikowanych do analizy badaniach eksperymentalnych poszczególne związki spowodowały zmniejszenie różnicy średnich (D) wartości parametrów hemodynamicznych lub zmian przerostowych w grupach zwierząt otrzymujących poszczególne interwencje w porównaniu do kontroli pozytywnej. Odnotowano zmniejszenie wartości RVSP średnio o 14,08 mmHg (13,08 – 15,09; $p < 0,00001$; 250 interwencji; 4232 zwierząt), mPAP o 9,55 mmHg (8,82 – 10,28; $p < 0,00001$; 226 interwencji; 3925 zwierząt), RVH (indeks Fultona) o 0,12 (0,11 – 0,12; $p < 0,00001$; 384 interwencji; 6566 zwierząt) oraz WT o 12,31% (11,57 – 13,05; $p < 0,00001$; 173 interwencji; 3057 zwierząt). Przeprowadzona analiza niejednorodności wykazała zmienność uzyskanych wyników w odniesieniu do wszystkich ocenianych parametrów: RVSP – $Q=3553,12$; $I^2=92,99\%$; $df=249$; $p < 0,00001$; mPAP – $Q=3536,13$; $I^2=93,64\%$; $df=225$; $p < 0,00001$; RVH – $Q=6304,24$; $I^2=93,92\%$; $df=383$; $p < 0,00001$; WT – $Q=5676,58$; $I^2=96,97\%$; $df=172$; $p < 0,00001$.

W odniesieniu do ilorazu różnicy średnich (R), analizowane substancje spowodowały poprawę parametrów: RVSP ($R=0,48$; 0,46 – 0,50; $p < 0,00001$), mPAP ($R=0,54$; 0,52 – 0,56; $p < 0,00001$), RVH ($R=0,49$; 0,48 – 0,51; $p < 0,00001$) oraz WT ($R=0,58$; 0,56 – 0,61; $p < 0,00001$). Wartość $R=0,5$ ilorazu oznacza, że testowany związek zmniejszył o połowę średnią wartość analizowanego parametru, podwyższoną w wyniku indukcji nadciśnienia płucnego. Wartość $R=1,0$ wskazuje na całkowite odwrócenie zmian powstałych w wyniku indukcji PH u zwierząt otrzymujących oceniany związek. Analiza niejednorodności wykazała zmienność uzyskanych wyników w odniesieniu do ocenianych parametrów: RVSP – $Q=562,966,65$; $I^2=99,96\%$; $df=249$; $p < 0,00001$; mPAP – $Q=184,962,67$; $I^2=99,88\%$; $df=225$; $p < 0,00001$; RVH – $Q=754,740,99$; $I^2=99,95\%$; $df=383$; $p < 0,00001$; WT – $Q=408,226,56$; $I^2=99,96\%$; $df=172$; $p < 0,00001$.

a) Wpływ testowanych substancji na poprawę analizowanych parametrów w zależności od zastosowanego schematu badawczego

W tych badaniach, gdzie testowane związki podawano w celu prewencji zmian wywołanych indukcją nadciśnienia płucnego, odnotowano większe korzyści z zastosowanej terapii. Wartości współczynnika R opisujące analizowane parametry w modelu prewencyjnym były wyższe w porównaniu do wartości tego parametru, jakie obliczono w oparciu o wyniki odnotowane w modelu terapeutycznym (**Rycina 16**). Wyniki analizy niejednorodności wskazują na istotne różnice pomiędzy badaniami, które przeprowadzono w celu prewencji lub odwrócenia zmian wywołanych indukcją PH (mPAP, RVH oraz WT; $p < 0,05$).

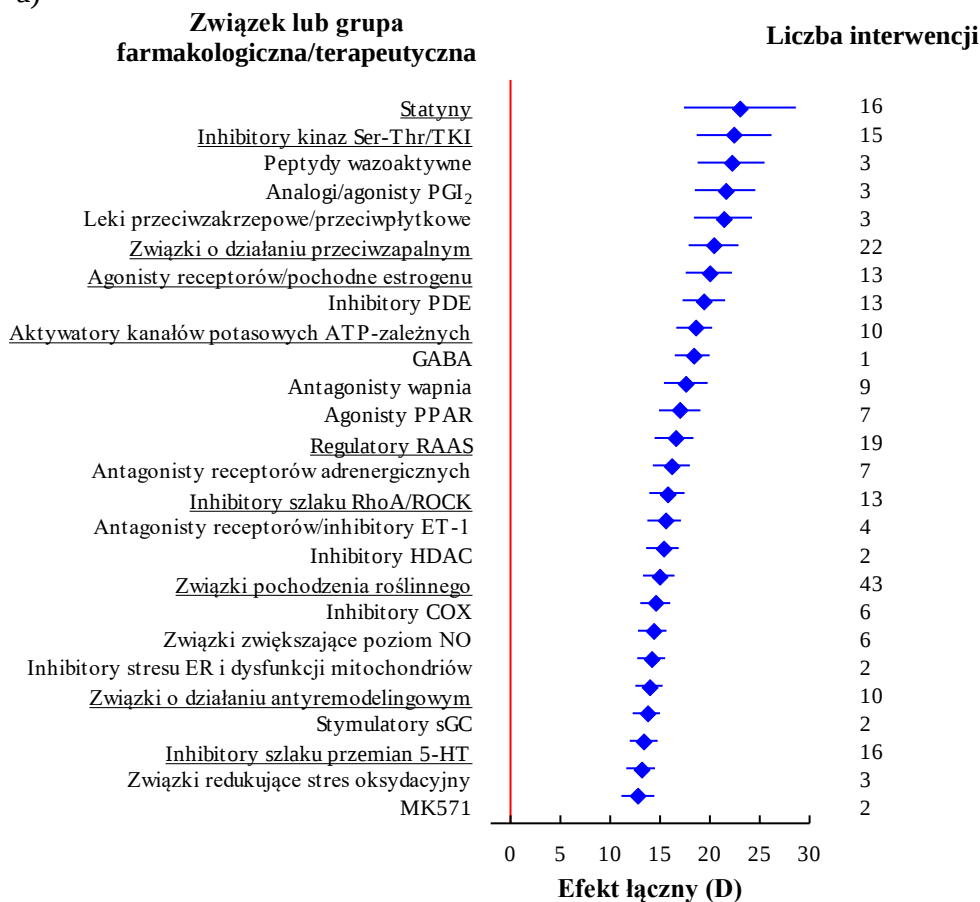


Rycina 16. Wpływ zastosowanego schematu badawczego (prewencyjnego, terapeutycznego) na pogorszenie ocenianych parametrów hemodynamicznych i zmian przerostowych. Mierzony efekt łączny wyrażony jako R (iloraz różnicy średnich). Pionowe słupki błędów odpowiadają 95% przedziałowi ufności. Q – współczynnik niejednorodności pomiędzy analizowanymi grupami; NS – nieistotne statystycznie

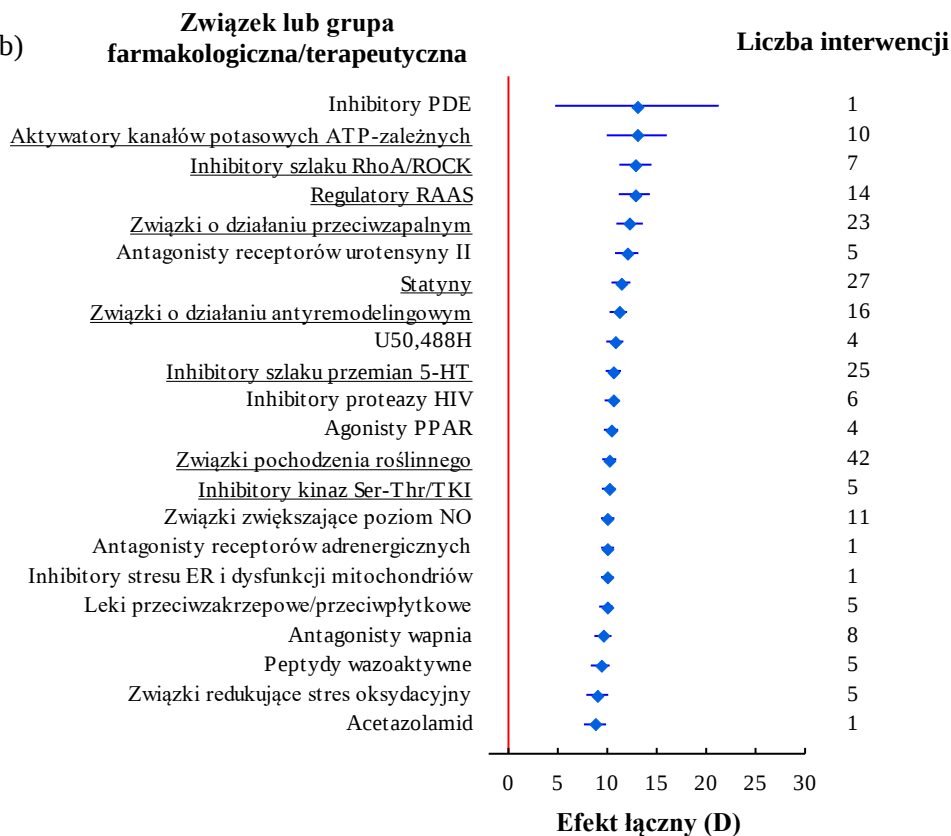
b) Wpływ testowanych leków/substancji na poprawę analizowanych parametrów w zależności od wyboru związku i grupy terapeutycznej/farmakologicznej (wg przyjętej w pracy klasyfikacji [168])

W odniesieniu do różnicy średnich (D) największą poprawę parametrów opisujących funkcję i zmiany przerostowe prawej komory serca odnotowano w przypadku statyn (rozuwastatyna, atorwastatyna, simwastatyna). Przewlekłe podawanie leków z tej grupy spowodowało zmniejszenie RVSP o 23,02 mmHg (17,41 – 28,63; $p<0,00001$), a RVH o 0,17 (0,14 – 0,20; $p<0,00001$). Istotną poprawę mPAP oraz WT odnotowano zwłaszcza w przypadku nowego inhibitora PDE, lodenafilu – zmniejszenie wartości mPAP o 13,00 mmHg (4,73 – 21,27 mmHg, $p=0,0021$), WT o 21,45% (10,30 – 32,60; $p=0,0002$). Było to jednak pojedyncze badanie przedkliniczne. Znaczący wynik uzyskały także związki z grupy aktywatorów kanałów potasowych ATP-zależnych (iptakalim, nikorandyl, pinacydyl). W tym przypadku przewlekła ekspozycja na wymienione leki spowodowała zmniejszenie mPAP o 12,99 mmHg (9,73 – 16,25 mmHg, $p<0,00001$). Szczegółowe wyniki skuteczności leków/substancji przedstawiono na **Rycinie 17** i w **Tabeli 3 (Załącznik 2)**.

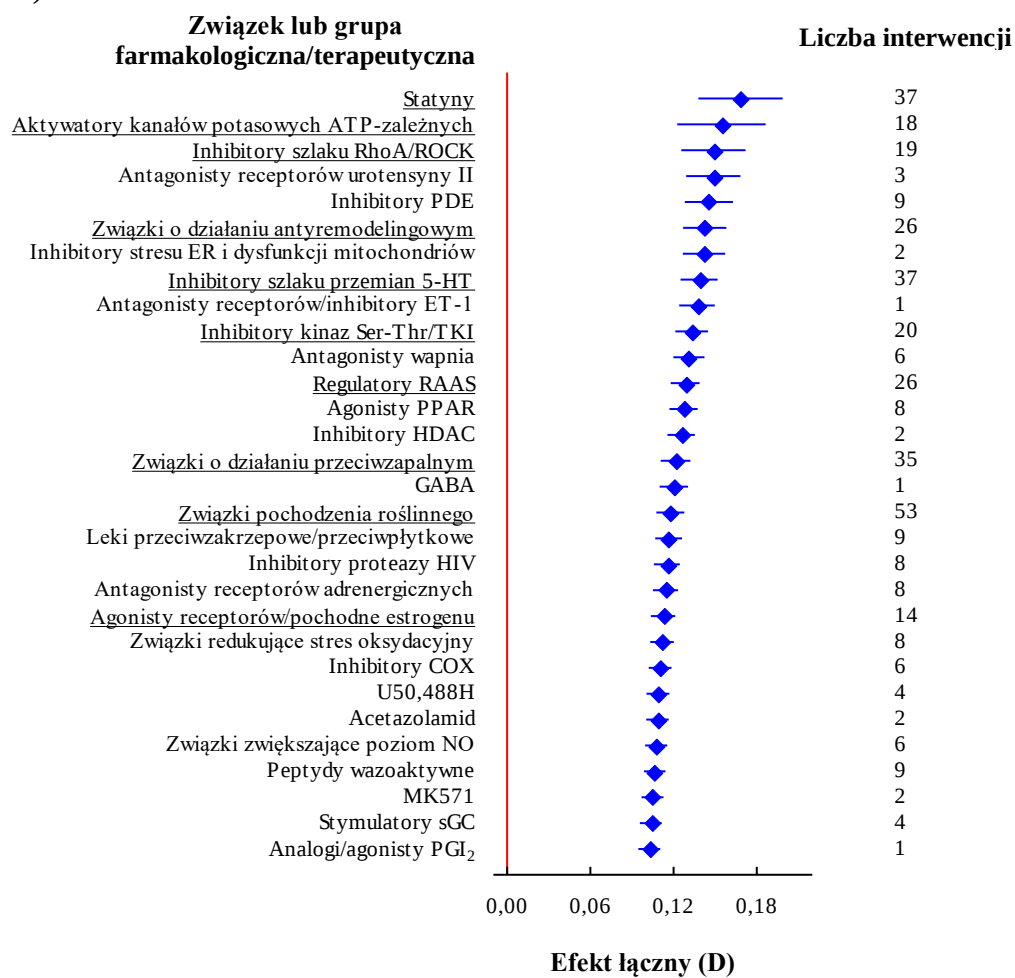
a)



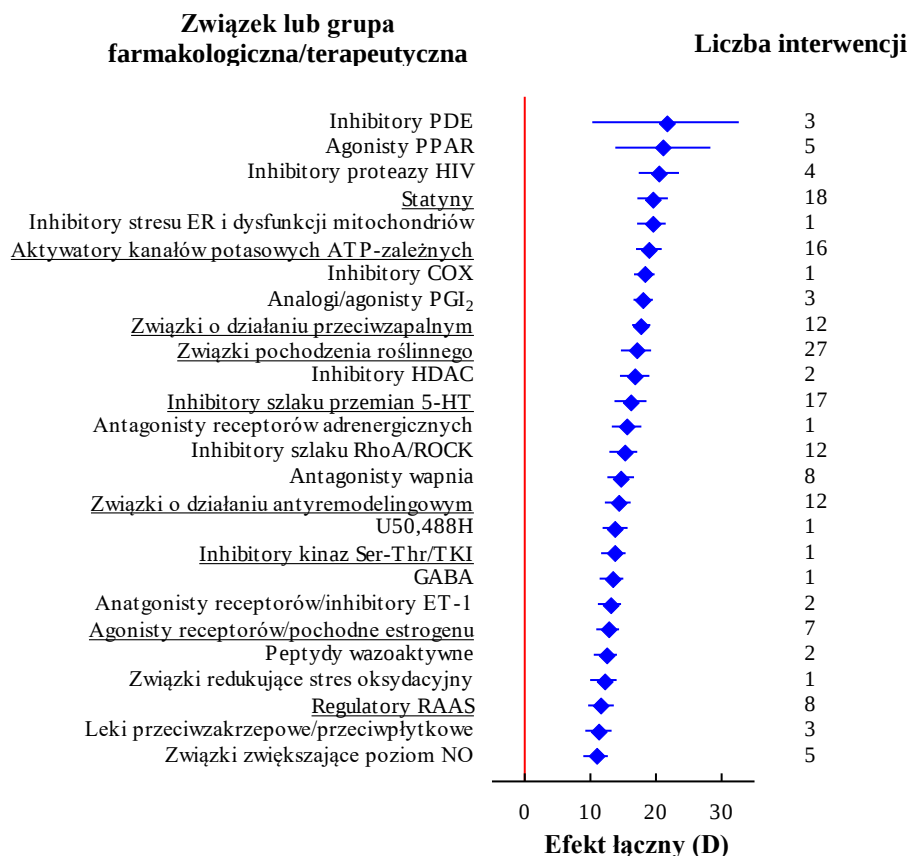
b)



c)



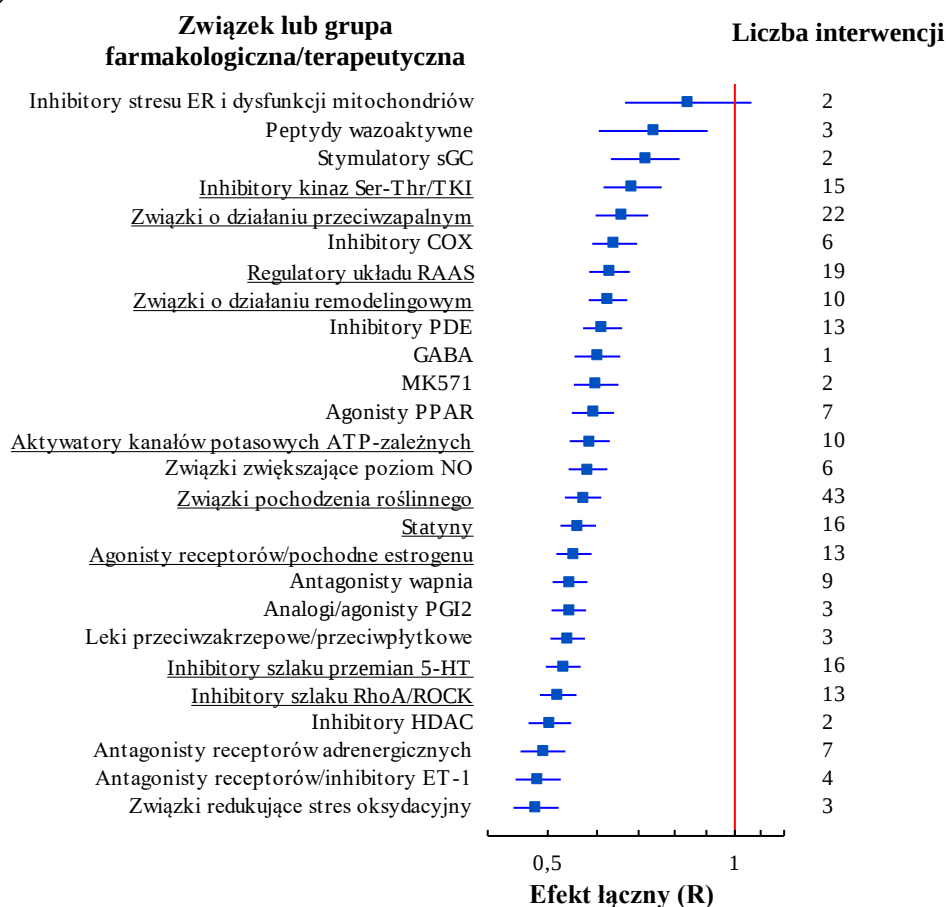
d)



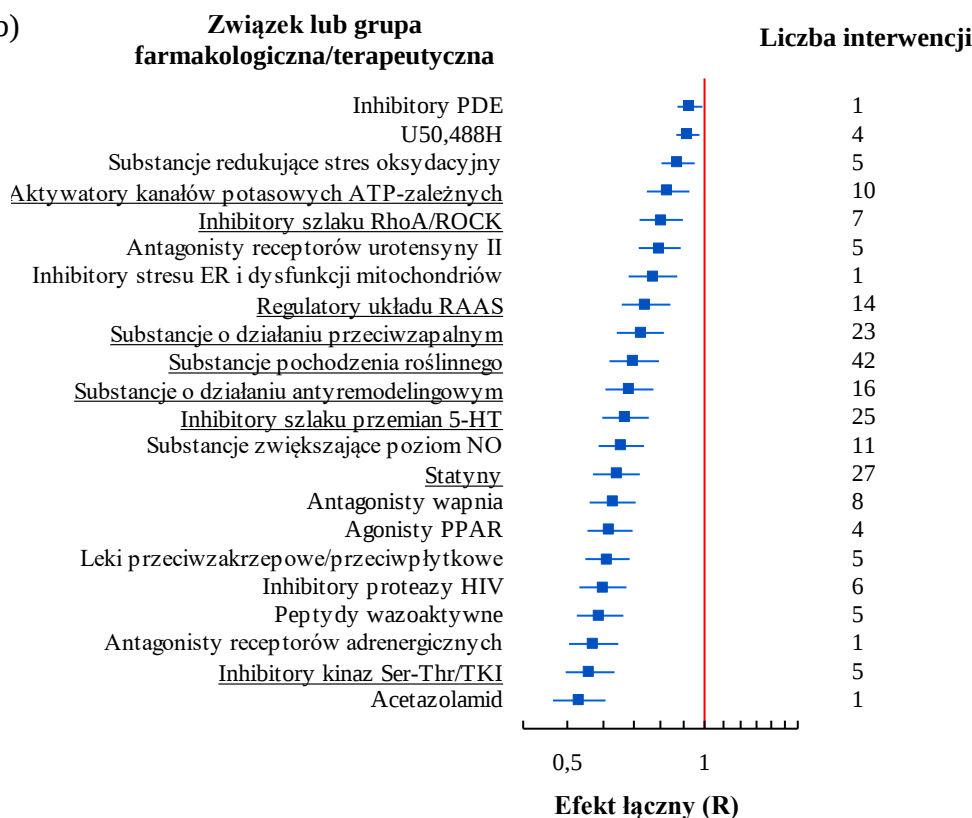
Rycina 17. Efektywność ocenianych związków i grup terapeutycznych/farmakologicznych (wg przyjętej w pracy klasyfikacji [168]) dla parametrów: a) RVSP, b) mPAP, c) RVH, d) WT. Mierzony efekt łączny wyrażony jako różnica średnich (D). Podkreślono nazwy grup, które najczęściej badano w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych

Analiza efektywności związków w oparciu o efekt łączny wyrażony różnicą średnich (R) wykazała znaczącą poprawę zwłaszcza w przypadku niezarejestrowanych aktywatorów sGC (ataciguat, YC-1) oraz peptydów wazoaktywnych (adrenomedulina, wazoaktywny peptyd jelitowy). Odnotowano poprawę parametru RVSP – odpowiednio $R=0,72$ (95% PU; 0,63 – 0,81; $p<0,00001$) i $R=0,74$ (0,60 – 0,90; $p=0,0033$). W wyniku przewlekłej ekspozycji zwierząt doświadczalnych na białko oporności wielolekowej 4 (MRP-4) – MK571 odnotowano ograniczenie przerostu prawej komory serca ($R=0,77$; 0,65 – 0,90; $p=0,0012$). Zastosowanie nowych inhibitorów PDE (lodenafil) spowodowało zmniejszenie średniego ciśnienia w tętnicy płucnej ($R=0,93$; 0,87 – 0,99; $p=0,0207$), a inhibitorów COX (celekoksyb) grubości ściany przyśrodkowej tętnic płucnych ($R=0,94$; 0,94 – 0,94; $p<0,00001$). Rankingi efektywności ocenianych związków i grup terapeutycznych/farmakologicznych sporządzono w oparciu o analizę skumulowaną (**Rycina 18**). Szczegółowe wyniki skuteczności leków/substancji przedstawiono w **Tabeli 4** (Załącznik 2).

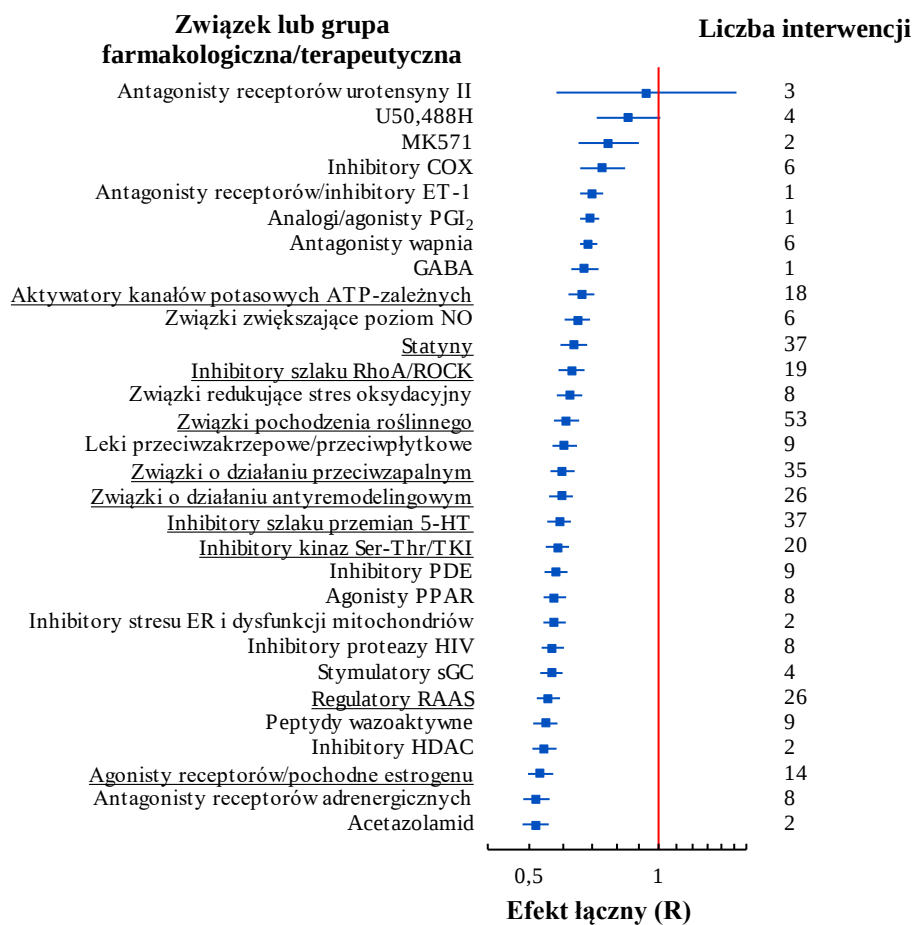
a)



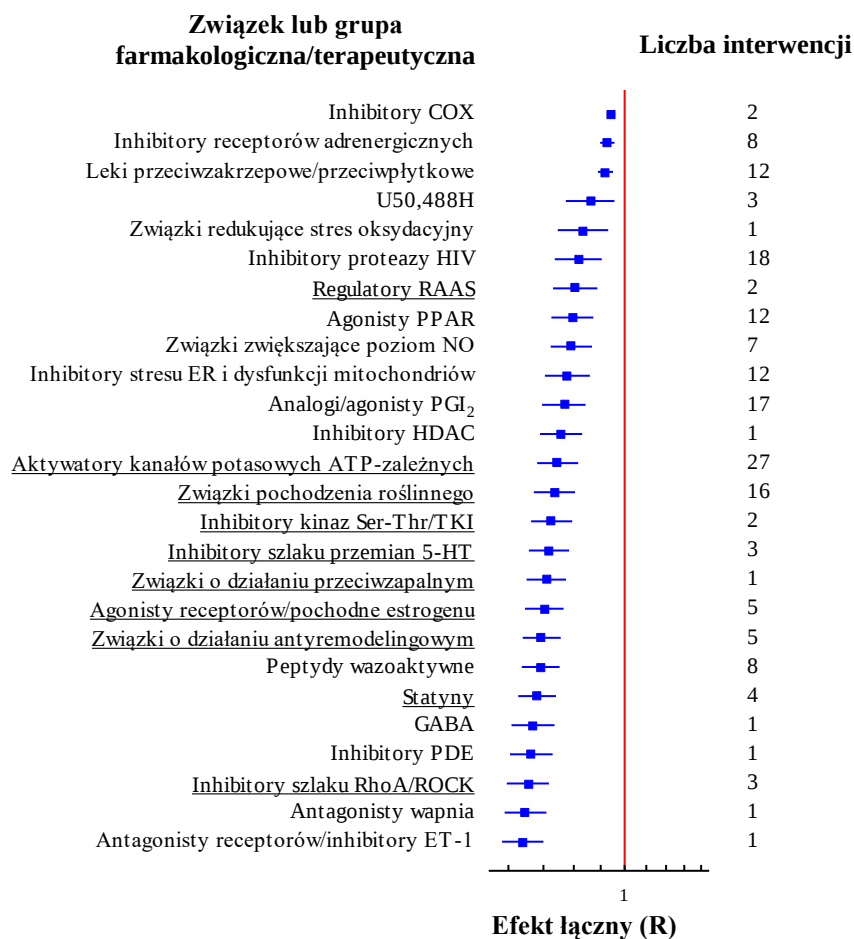
b)



c)

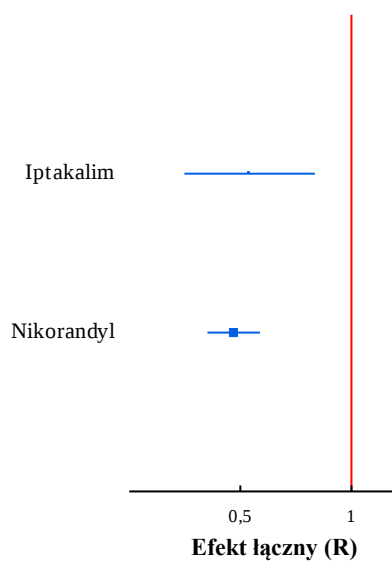


d)

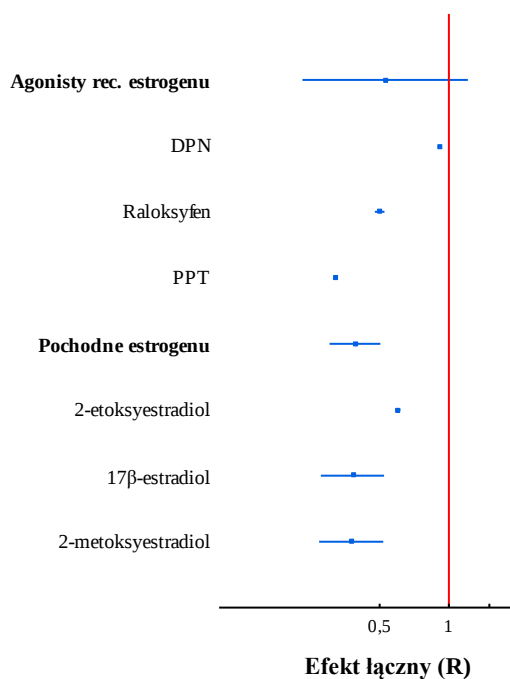


Rycina 18. Efektywność ocenianych związków i grup terapeutycznych/farmakologicznych (wg przyjętej w pracy klasyfikacji [168]) dla parametrów: a) RVSP, b) mPAP, c) RVH, d) WT. Mierzony efekt łączny wyrażony jako iloraz różnic średnich (R). Podkreślono nazwy grup, które najczęściej badano w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych

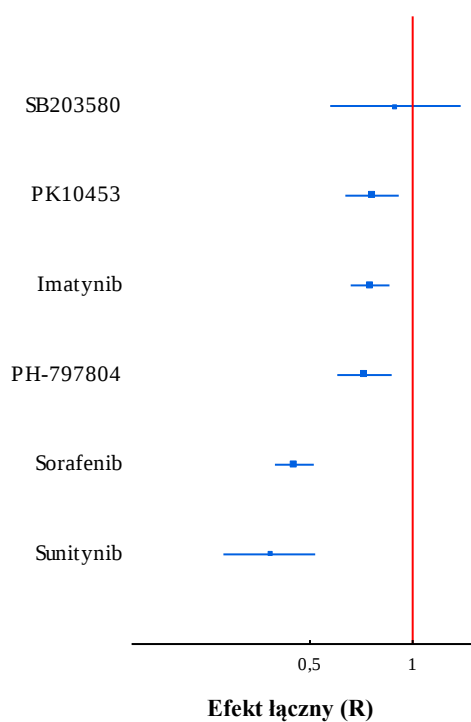
Efektywność związków zakwalifikowanych do dziesięciu najczęściej badanych grup terapeutycznych/farmakologicznych przedstawiono na **Rycinie 19**.

a.1) Aktywatory kanałów potasowych
ATP-zależnych

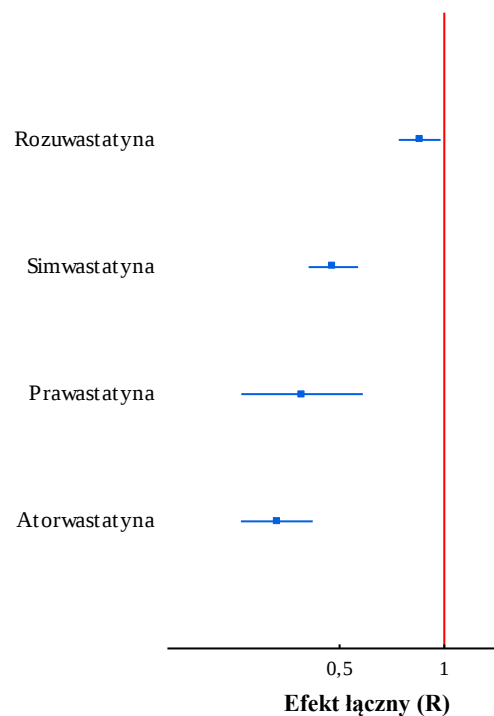
a.2) Agonisty receptorów/pochodne estrogeny



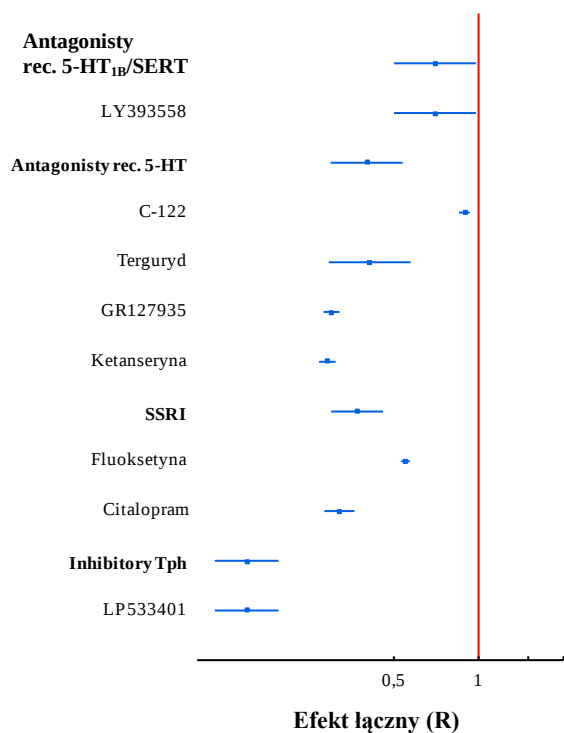
a.3) Inhibitory kinaz Ser-Thr/TKI



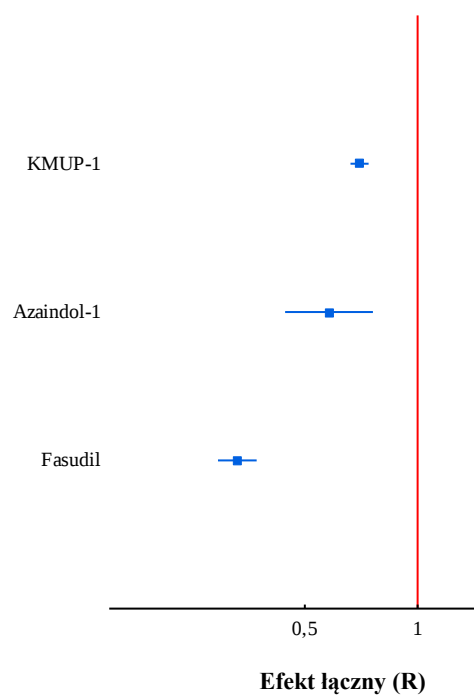
a.4) Inhibitory reduktazy HMG-CoA (statyny)



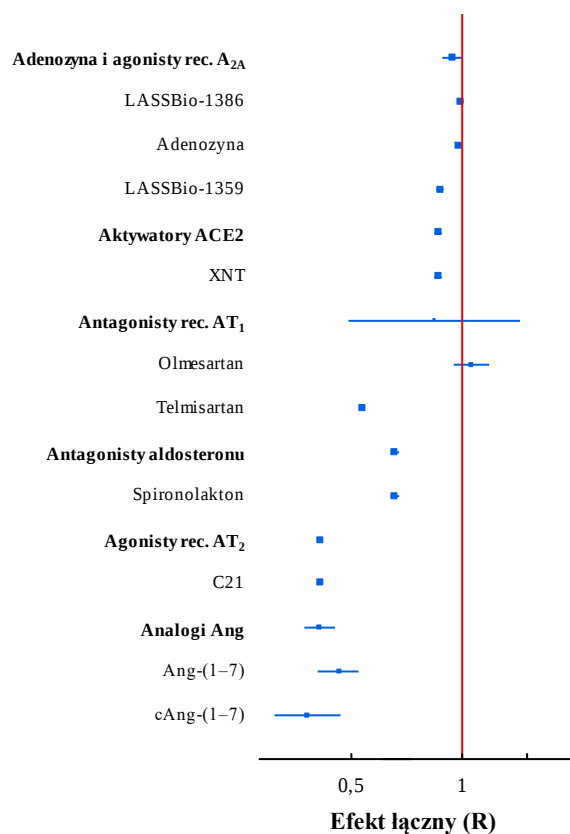
a.5) Inhibitory szlaku przemian 5-HT



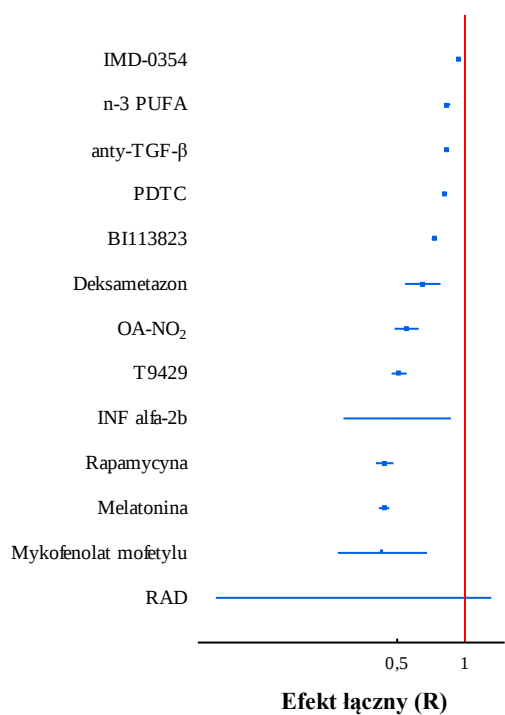
a.6) Inhibitory szlaku RhoA/ROCK



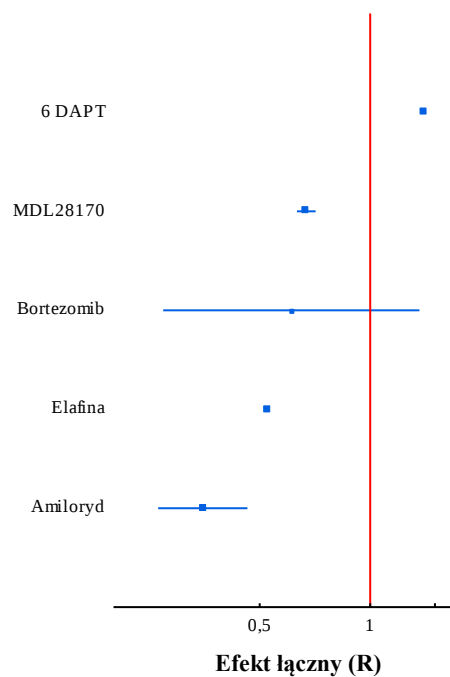
a.7) Regulatory RAAS



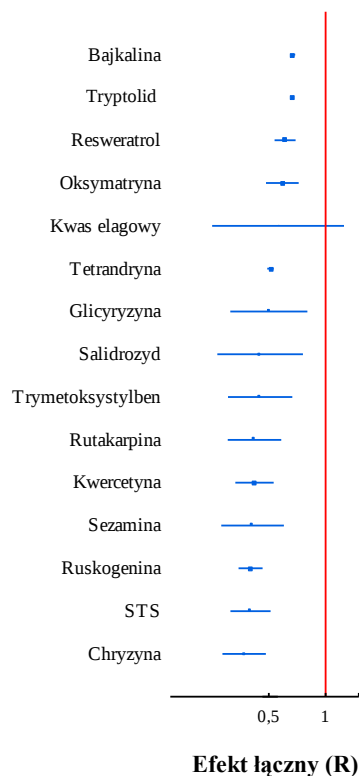
a.8) Związki o działaniu przeciwzapalnym

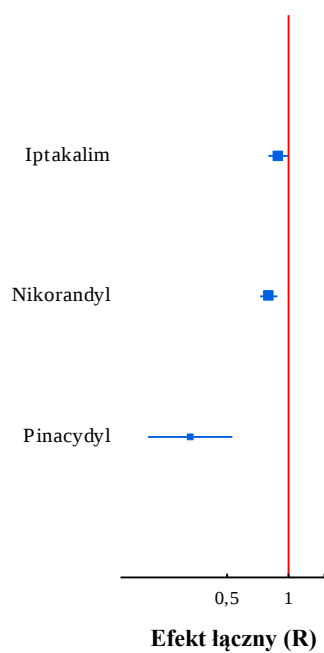


a.9) Związki o działaniu antyremodelingowym

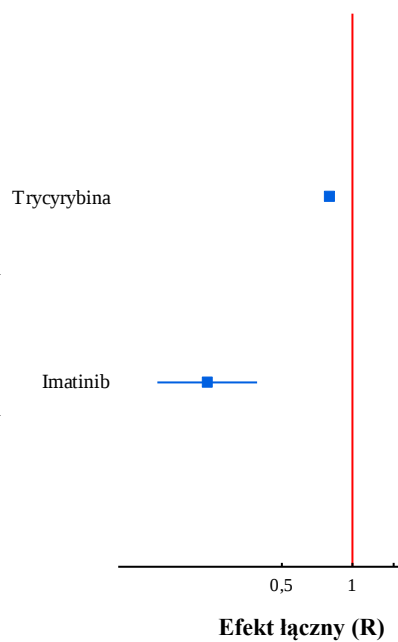


a.10) Związki pochodzenia roślinnego

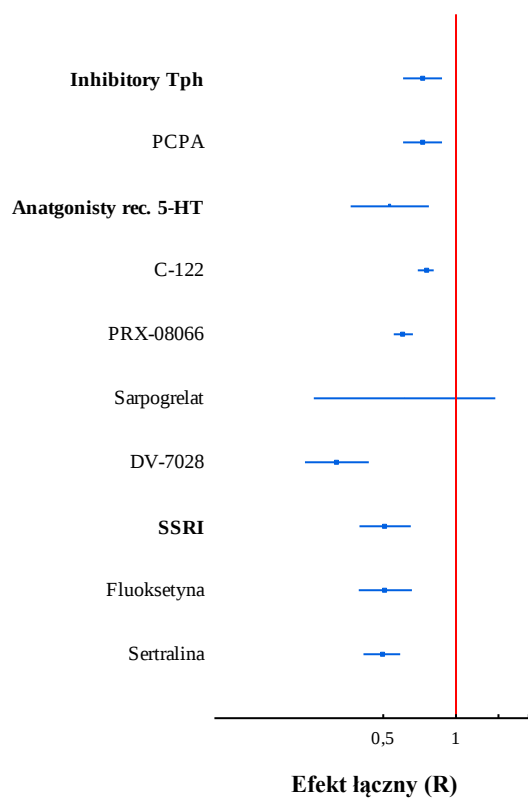


b.1) Aktywatory kanałów potasowych
ATP-zależnych

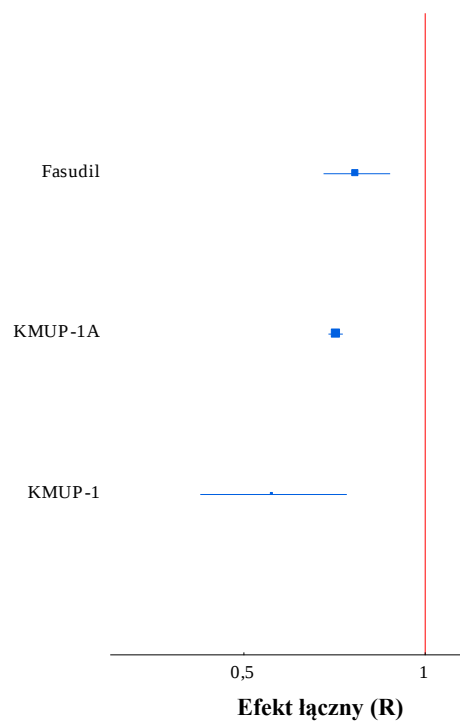
b.2) Inhibitory kinaz Ser-Thr /TKI



b.3) Inhibitory szlaku przemian 5-HT



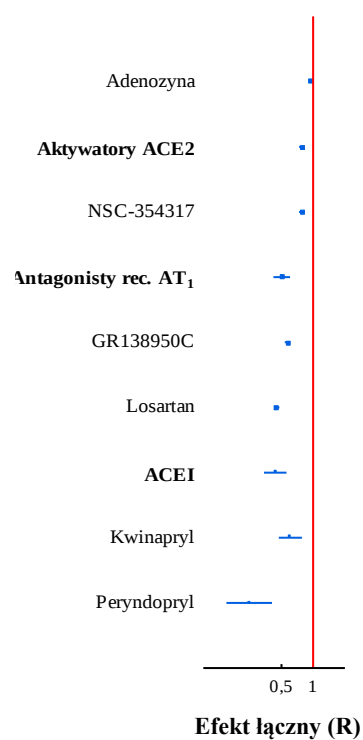
b.4) Inhibitory szlaku RhoA/ROCK



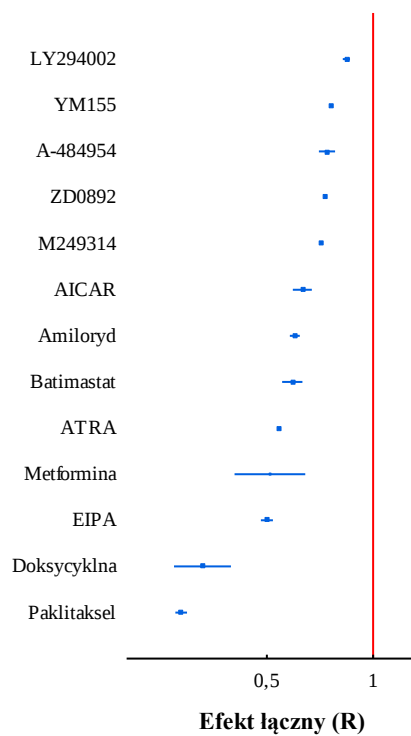
b.5) Inhibitory reduktazy HMG-CoA (statyny)



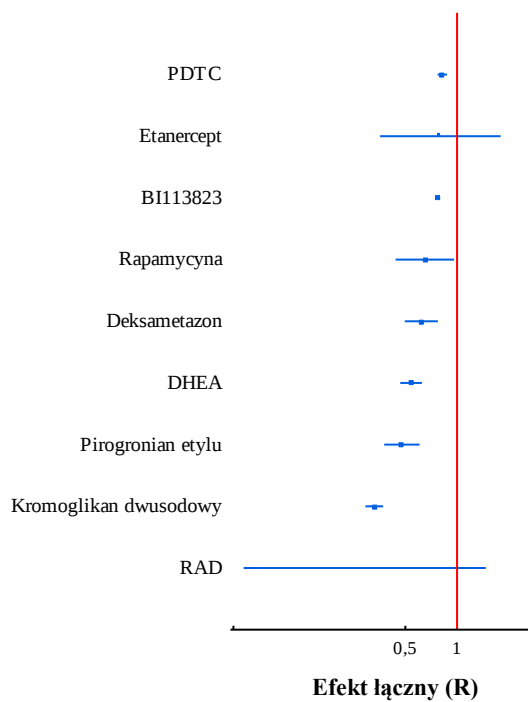
b.6) Regulatory RAAS



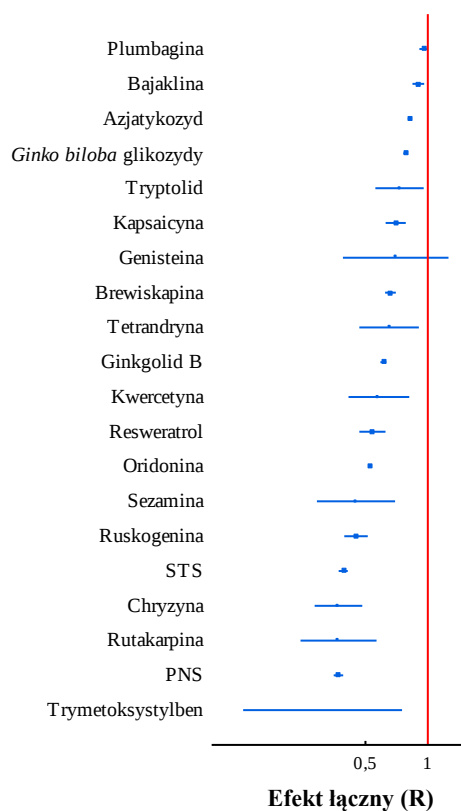
b.7) Związki o działaniu antyremodelingowym



b.8) Związki o działaniu przeciwzapalnym



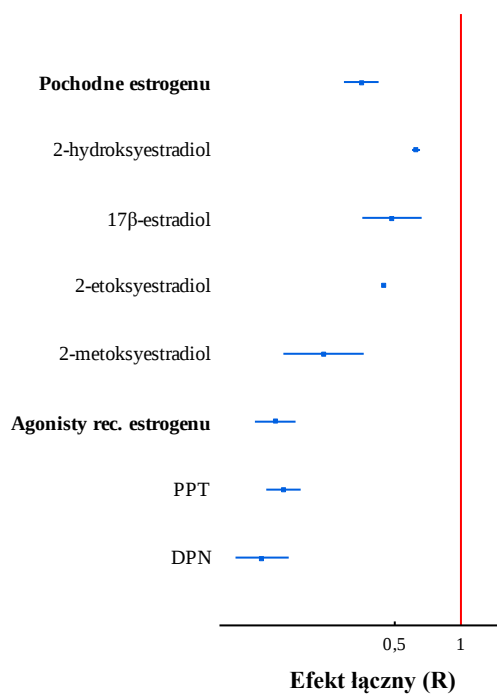
b.9) Związki pochodzenia roślinnego



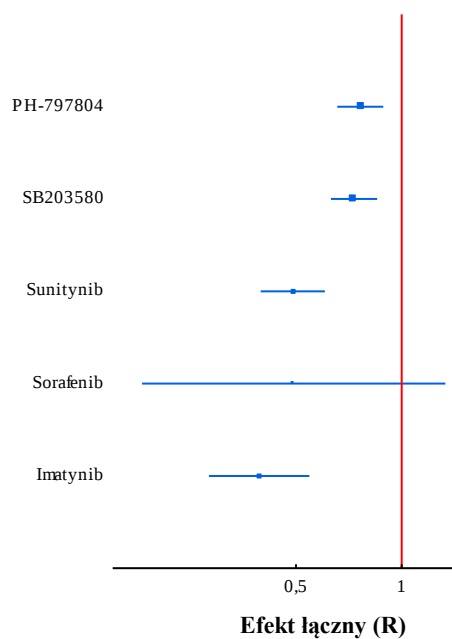
c.1) Aktywatory kanałów potasowych ATP-zależnych



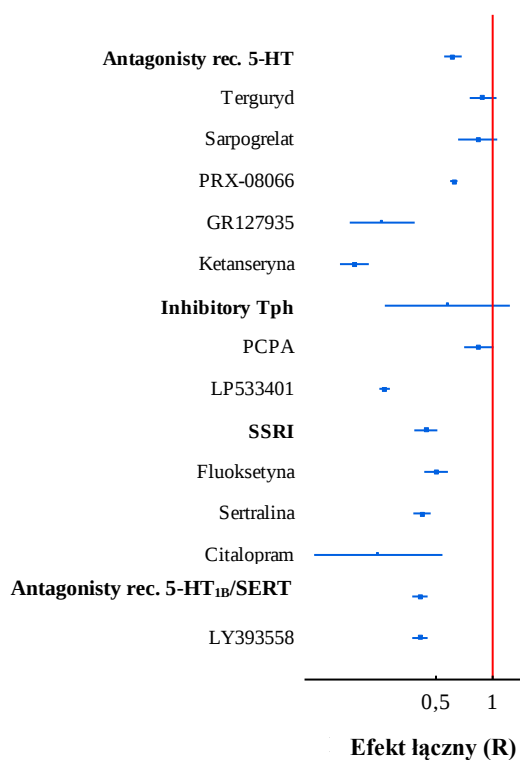
c.2) Agonisty receptorów/pochodne estrogenu



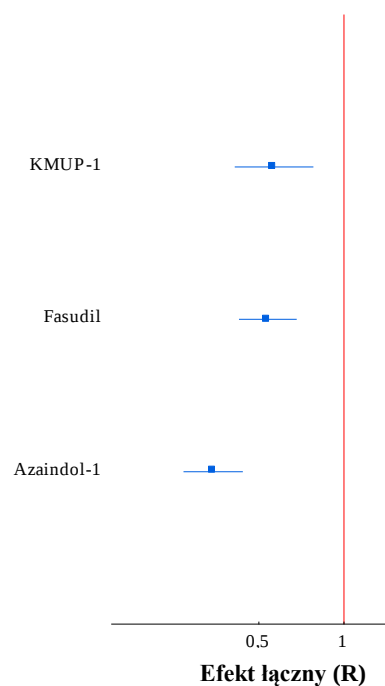
c.3) Inhibitory kinaz Ser-Thr/TKI



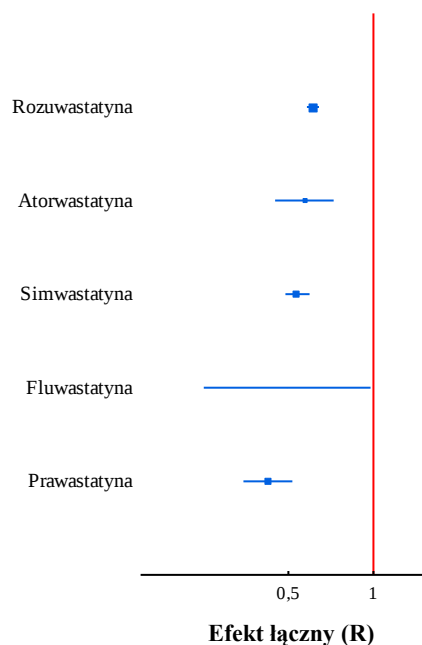
c.4) Inhibitory szlaku przemian 5-HT



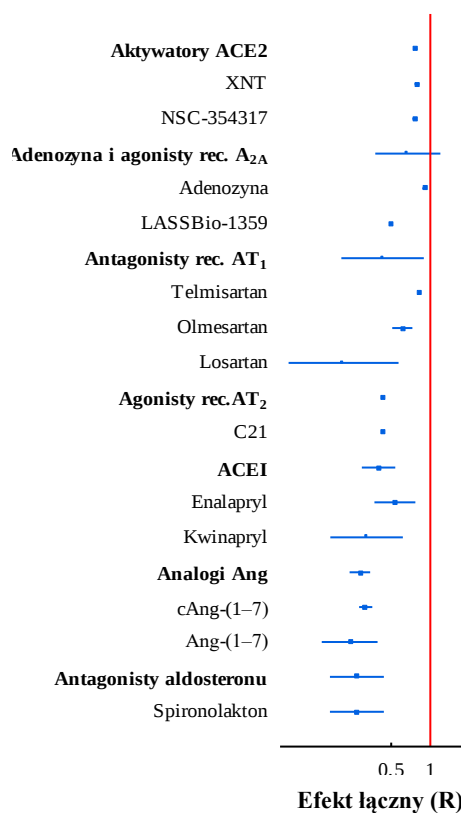
c.5) Inhibitory szlaku RhoA/ROCK



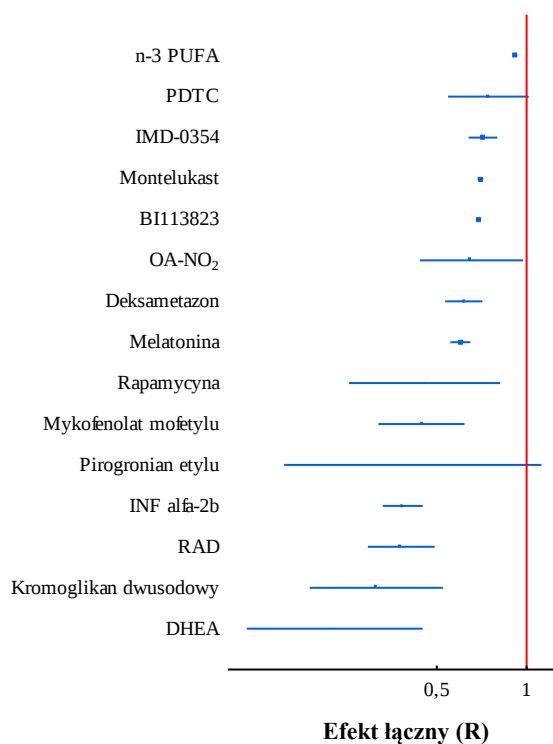
c.6) Inhibitory reduktazy HMG-CoA (statyny)



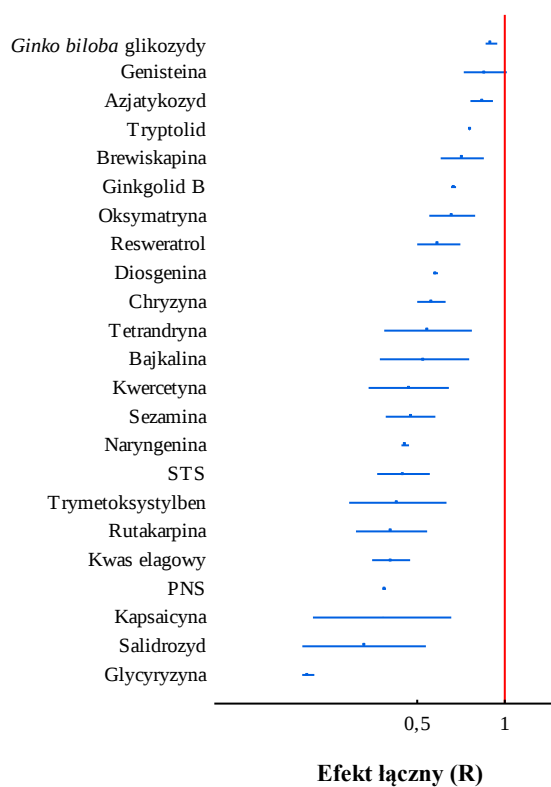
c.7) Regulatory RAAS

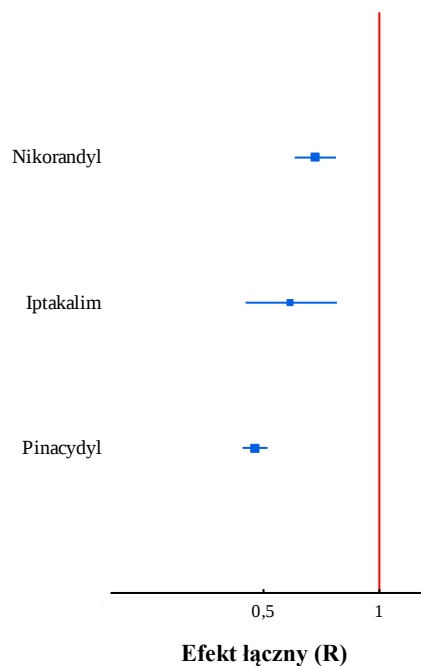


c.8) Związki o działaniu przeciwzapalnym

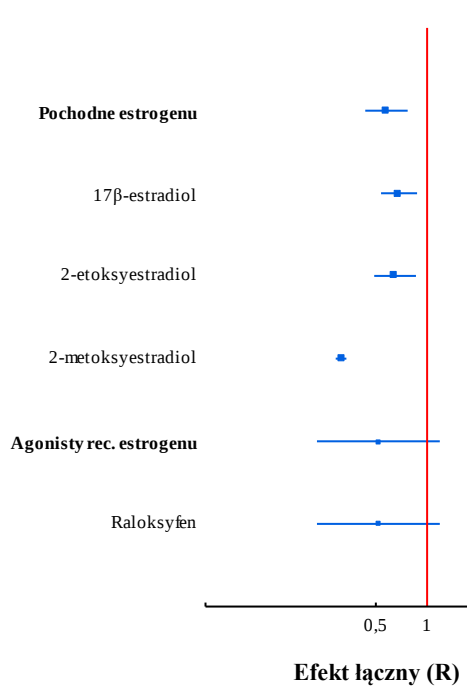


c.9) Związki pochodzenia roślinnego

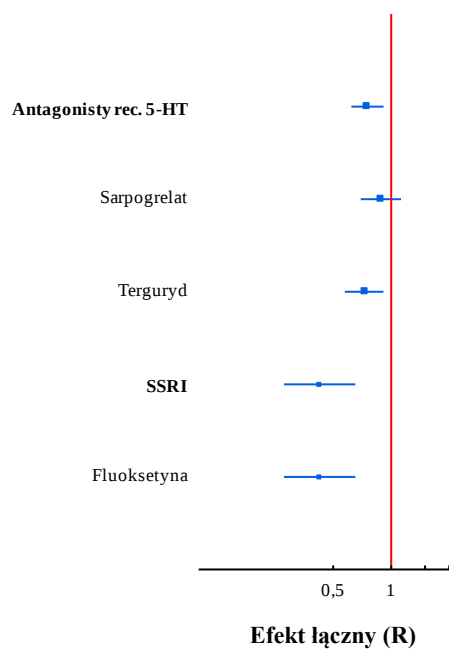


d.1.) Aktywatory kanałów potasowych
ATP-zależnych

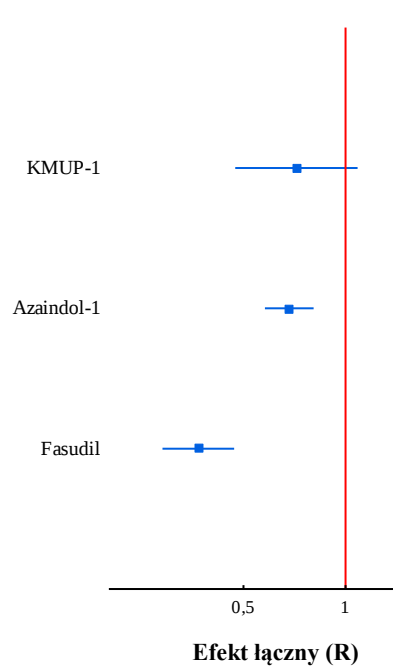
d.2.) Agonisty receptorów/pochodne estrogenu



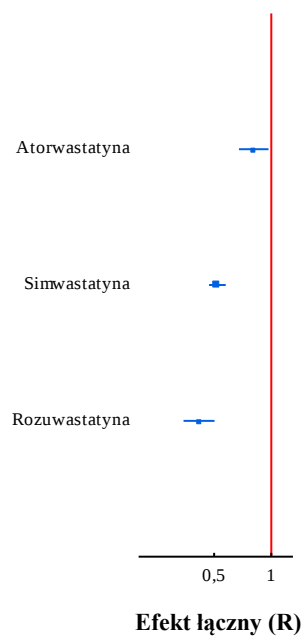
d.3.) Inhibitory szlaku przemian 5-HT



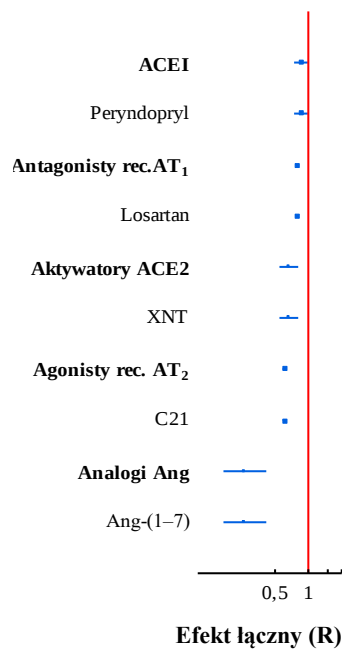
d.4.) Inhibitory szlaku RhoA/ROCK



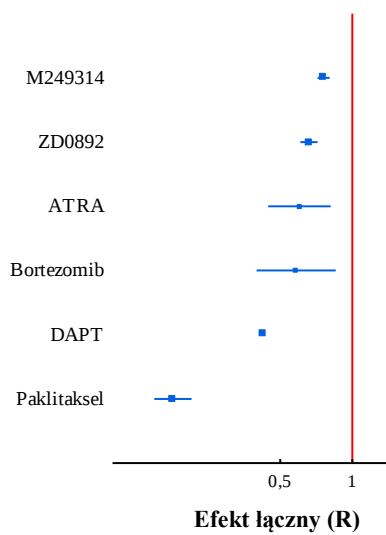
d.5.) Inhibitory reduktazy HMG-CoA (statyny)



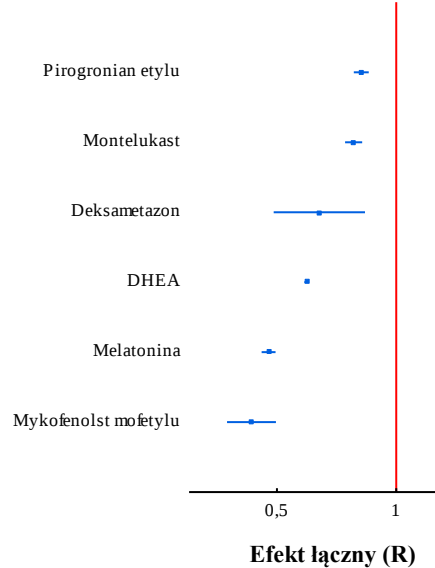
d.6.) Regulatory RAAS



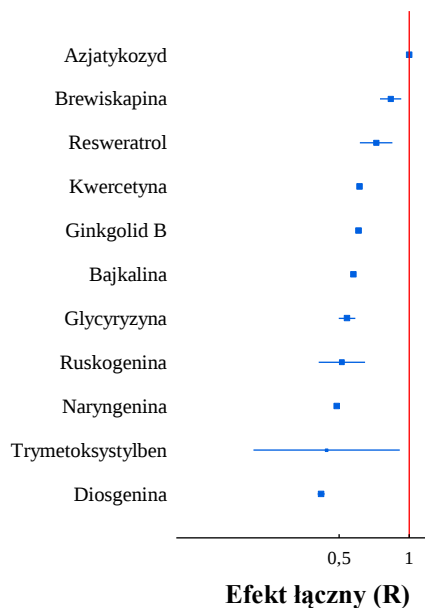
d.7.) Związki o działaniu antyremodelingowym



d.8.) Związki o działaniu przeciwzapalnym



d.9) Związki pochodzenia roślinnego

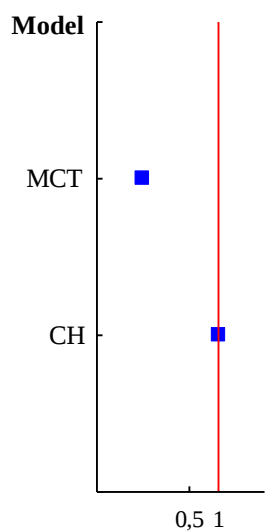


Rycina 19. Efektywność związków zakwalifikowanych do dziesięciu najczęściej badanych grup terapeutycznych/farmakologicznych. (wg przyjętej w pracy klasyfikacji [168]) dla parametrów: a) RVSP, b) mPAP, c) RVH, d) WT

Spośród dziesięciu najliczniej przebadanych grup, największą skutecznością zarówno w odniesieniu do parametrów hemodynamicznych jak i zmian przerostowych wykazały się: iptakalim z grupy aktywatory kanałów potasowych ATP-zależnych, wielonienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny omega-3 oraz IMD-0354 i PDTC z grupy związków o działaniu przeciwzapalnym, a także adenozyzna, agonisty receptora AT_2 , losartan i peryndopryl – z grupy regulatorów układu RAAS.

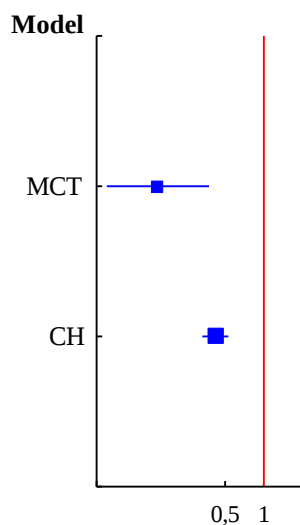
Jedynie w 9 zakwalifikowanych publikacjach oceniano korzyści z zastosowania tych samych związków z wykorzystaniem co najmniej dwóch różnych modeli nadciśnienia płucnego. Ilościowa synteza wyników uzyskanych przez badaczy wskazała na możliwy wpływ modelu PH na odnotowaną efektywność testowanych substancji wyrażoną przez iloraz różnic średnich (R). **Rycina 20** przedstawia zmianę wartości skurczowego ciśnienia w prawej komorze serca u zwierząt poddanych przewlekłej ekspozycji na bortezomib lub fasudil. Leki testowano na dwóch różnych modelach zwierzęcych PH, przy zachowaniu podobnych warunków eksperymentów. Przeprowadzona analiza wskazała na większe korzyści z zastosowania leków ocenionych w modelu ekspozycji na przewlekłą hipoksję (CH) w porównaniu do modelu monokrotaliny (MCT).

a) Bortezomib



Efekt łączny (R)

b) Fasudil



Efekt łączny (R)

Rycina 20. Efektywność wybranych związków z wykorzystaniem różnych modeli zwierzęcych PH w odniesieniu do parametru RVSP ($p < 0,05$)

3.2.5.1. Analiza wrażliwości

Przeanalizowano zmiany w obliczonym efekcie łącznym wyrażonym przez współczynnik R, spowodowane wyłączeniem z meta-analizy poszczególnych badań. Analiza wrażliwości wykazała, że żadna z zakwalifikowanych do meta-analizy interwencji nie wpłynęła istotnie na zmianę efektu łącznego (R) dla ocenianych parametrów ($p < 0,00001$). W **Tabeli 8** zestawiono efekt łączny (R) uzyskany po uwzględnieniu wszystkich interwencji oraz po wyłączeniu z analizy interwencji o najbardziej znaczącym wpływie na wynik.

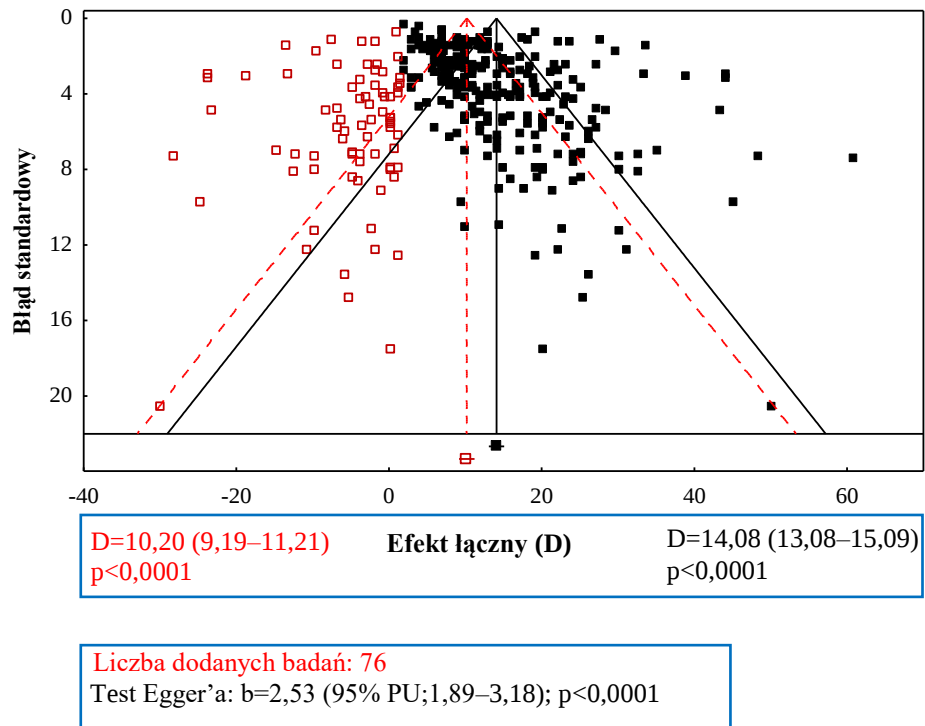
Tabela 8. Analiza wrażliwości przeprowadzona dla interwencji opisujących efektywność ocenianych związków w terapii nadciśnienia płucnego. Efekt łączny wyrażony jako iloraz różnic średnich (R) (model z efektem zmiennym)

Parametr		R	95% PU	p	Zmiana SD %
RVSP [mmHg]	Efekt łączny	0,48	0,46–0,50	<0,00001	0,00
	Efekt łączny po usunięciu interwencji*	0,48	0,46–0,50	<0,00001	3,51
		0,48	0,46–0,50	<0,00001	-1,62
mPAP [mmHg]	Efekt łączny	0,54	0,52–0,61	<0,00001	0,00
	Efekt łączny po usunięciu interwencji*	0,54	0,52–0,61	<0,00001	6,32
		0,54	0,52–0,61	<0,00001	-2,21
RVH	Efekt łączny	0,50	0,47–0,52	<0,00001	0,00
	Efekt łączny po usunięciu interwencji*	0,49	0,46–0,52	<0,00001	13,05
		0,49	0,47–0,52	<0,00001	-6,94
WT%	Efekt łączny	0,58	0,56–0,61	<0,00001	0,00
	Efekt łączny po usunięciu interwencji*	0,58	0,56–0,61	<0,00001	4,15
		0,58	0,56–0,61	<0,00001	-4,23

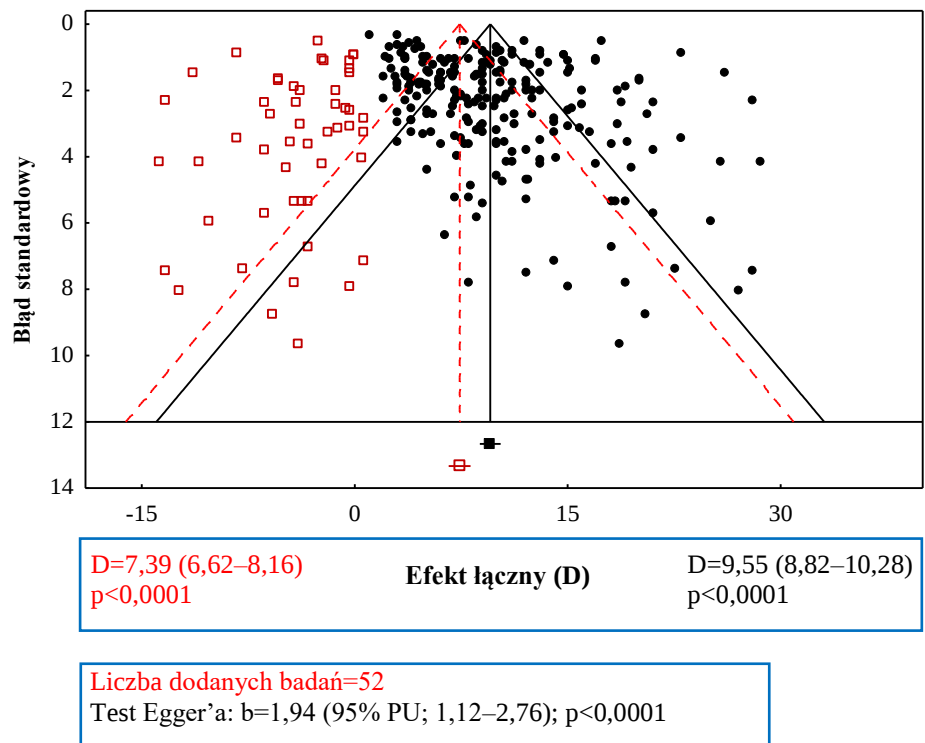
3.2.5.2. Błąd publikacji

Wykresy lejkowe dla parametrów RVSP, mPAP, RVH i WT pokazują niesymetryczny rozrzut wyników badań wokół efektu łącznego (D). Wskazuje to na obciążenie publikacyjne analizowanych prób. Potwierdzają to także uzyskane wyniki testów asymetrii Begg'a i Mazumdar oraz testu Egger'a, które wskazują na występowanie błędu systematycznego ($p < 0,05$). Poprzez zastosowanie metody *Trim and Fill* oszacowano wielkość efektu (D) po skorygowaniu o błąd publikacji (**Rycina 21**).

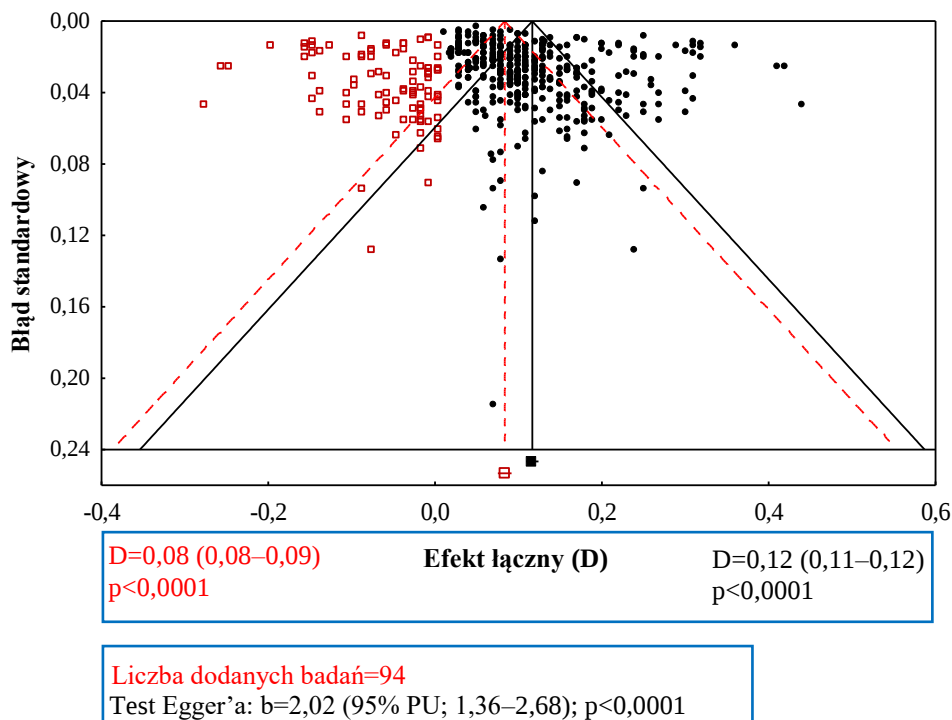
a)



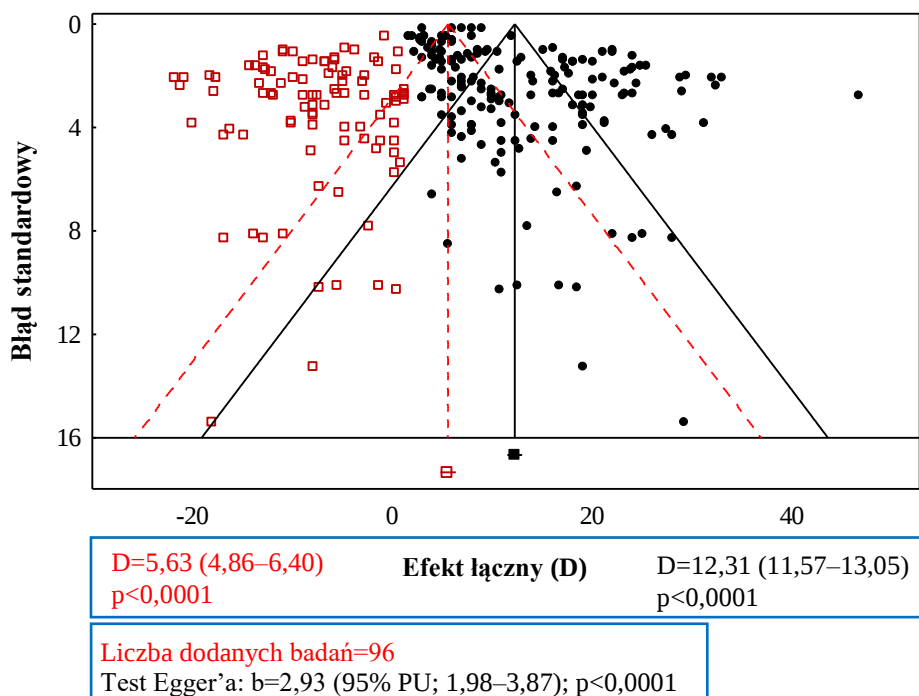
b)



c)



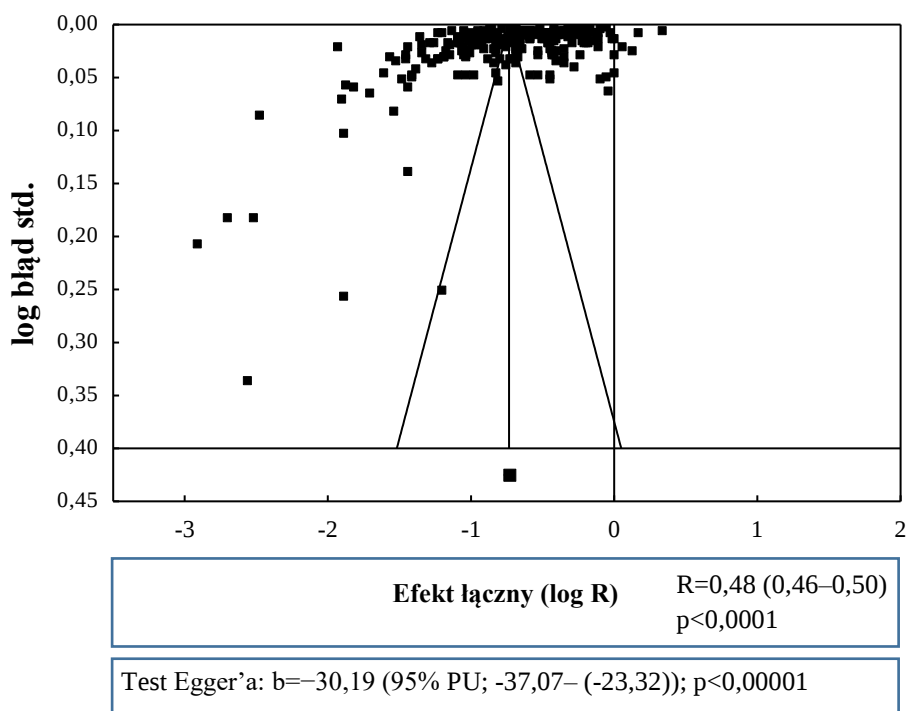
d)



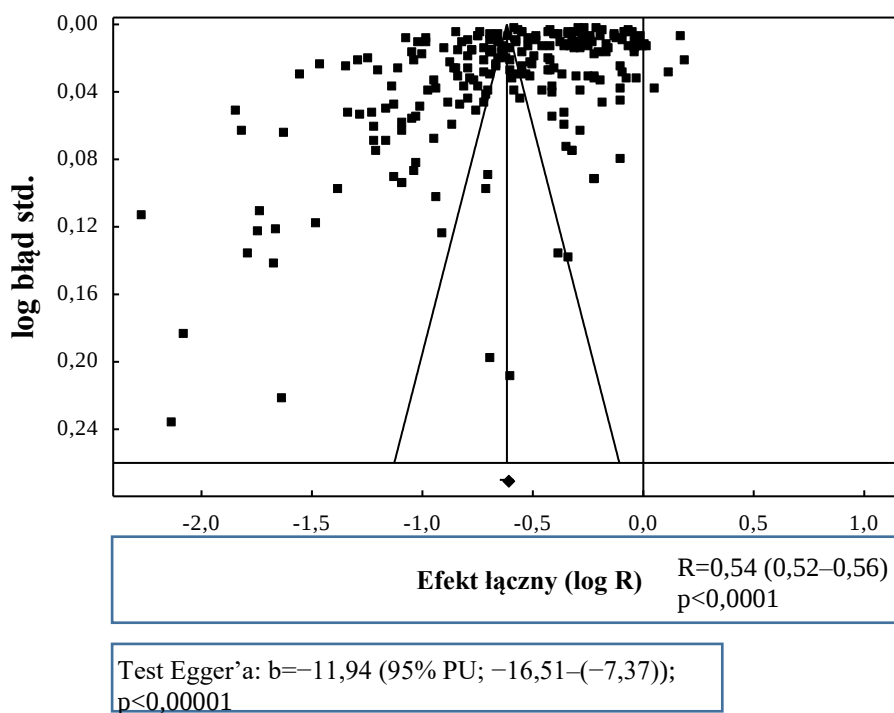
Rycina 21. Wykresy lejkowe (model z efektem zmiennym; 95% PU) z wynikami metody *Trim and Fill* dla parametrów: a) RVSP, b) mPAP, c) RVH, d) WT. Mierzony efekt łączny wyrażono jako D (różnica średnich). Wypełnione kwadraty oznaczają opublikowane badania zakwalifikowane do meta-analizy; niewypełnione, czerwone kwadraty – badania dodane, potencjalnie brakujące. Linie ciągłe odnoszą się do rzeczywistego efektu łącznego (D) i rozrzutu wyników w badaniach włączonych do meta-analizy, linie przerywane opisują efekt łączny (D) po skorygowaniu o błąd publikacji i rozrzut wyników w badaniach dodanych

Przeprowadzona ocena błędu publikacji dla efektu łącznego wyrażonego jako iloraz różnicy średnich (R), nie wykazała istotnej asymetrii rozrzutu wyników badań dla ocenianych parametrów na wykresach lejkowych. W wyniku zastosowania procedury *Trim and Fill* nie zostały dodane dodatkowe badania. Test Egger'a wskazuje na występowanie błędu systematycznego dla RVSP, mPAP i RVH ($p < 0,05$) (Rycina 22).

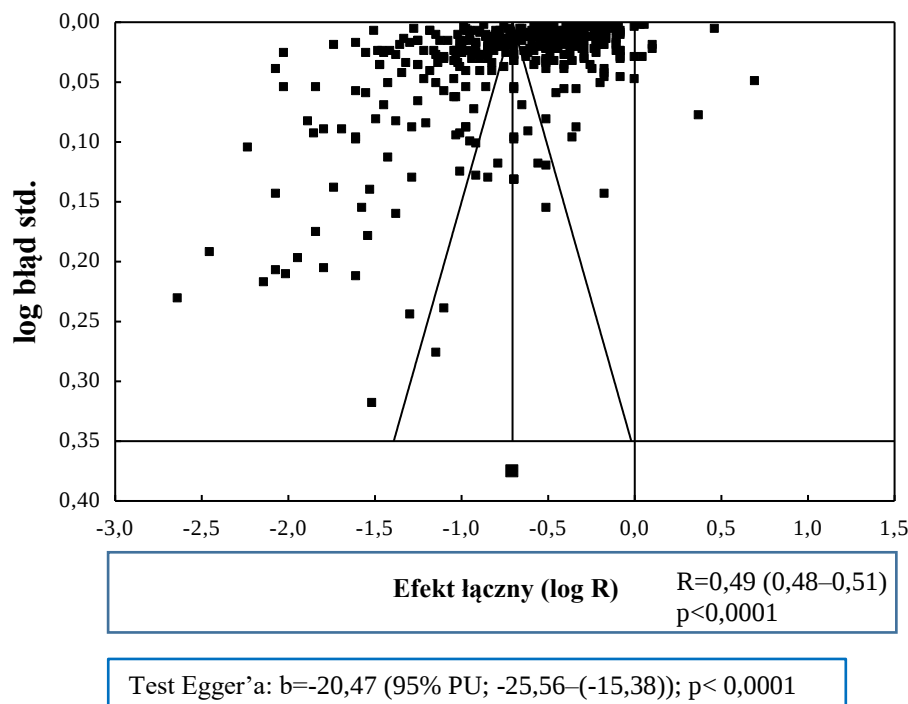
a)



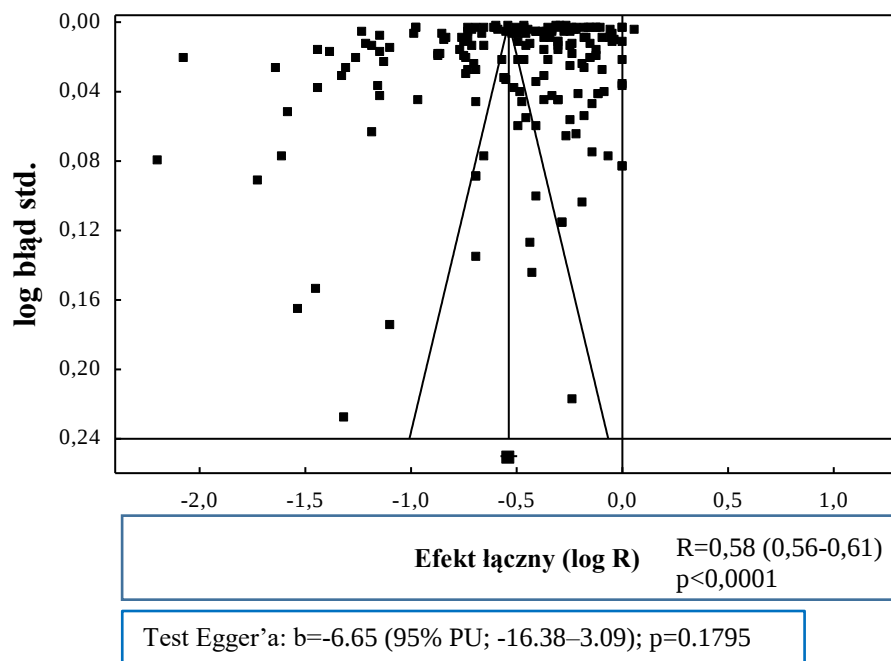
b)



c)



d)



Rycina 22. Wykresy lejkowe (model z efektem zmiennym; 95% PU) z wynikami metody *Trim and Fill* dla parametrów: a) RVSP, b) mPAP, c) RVH, d) WT. Mierzony efekt łączny wyrażono jako R (iloraz różnic średnich). Wypełnione kwadraty oznaczają opublikowane badania zakwalifikowane do meta-analizy. Linie ciągłe odnoszą się do rzeczywistego efektu łącznego (R) i rozrzutu wyników w badaniach włączonych do meta-analizy

4. Dyskusja

Nadciśnienie płucne (PH) jest chorobą o ciężkim przebiegu i wieloczynnikowej etiologii, która nie została dotychczas w pełni zbadana. Brak możliwości całkowitego wyleczenia oraz niekorzystne rokowanie skłaniają do poszukiwania nowych związków o potencjalnym działaniu terapeutycznym w PH. Modele zwierzęce nadciśnienia płucnego mogą stanowić użyteczne narzędzie w badaniach nad patomechanizmem choroby oraz nowymi lekami.

Pierwszym głównym celem niniejszej pracy była jakościowa i ilościowa ocena wpływu składowych wybranych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego na rozwój schorzenia. Analizie poddano najczęściej wykorzystywane i najlepiej poznane modele zwierzęce. Wpływ poszczególnych składowych wyrażono przez pogorszenie (przyrost) zarówno parametrów hemodynamicznych, jak i przerostowych. Były to: średnie i/lub skurczowe ciśnienie w prawej komorze serca (RVP, RVSP), średnie ciśnienie w tętnicy płucnej (mPAP), przerost mięśnia prawej komory serca (RVH) oraz przyrost grubości ściany tętnic płucnych (WT). Wybór powyższych parametrów był podyktowany częstotnością ich raportowania w próbach eksperymentalnych z zakresu nadciśnienia płucnego. Rejestracji wartości parametrów hemodynamicznych dokonywano technikami inwazyjnymi cewnikując prawą komorę serca lub naczynie płucne w warunkach pełnego znieczulenia. Po zakończonym pomiarze zwierzęta poddawano eutanazji. Pogorszenie analizowanych parametrów wyrażono jako różnicę średnich wartości w grupie kontroli pozytywnej – zwierzęta doświadczalne otrzymujące placebo, u których wywołano PH i grupie kontroli negatywnej – zwierzęta zdrowe, otrzymujące placebo, u których nie wywołano PH (podrozdział 3.1.1.1). Realizację celów pracy przeprowadzono w oparciu o przegląd systematyczny publikacji wg przyjętych kryteriów włączenia i wyłączenia (podrozdział 3.1.1.1; 3.1.1.2). Dokonano przeglądu dwóch elektronicznych baz danych – Medline i ISI Web of Science, bez ograniczeń językowych, z uwzględnieniem artykułów opublikowanych od 1 stycznia 1995 roku do 31 grudnia 2015 roku. Przeanalizowano łącznie 13 172 tytułów i streszczeń oraz 566 artykułów pełnotekstowych. W oparciu o dane pozyskane z 290 publikacji, które spełniły przyjęte kryteria włączenia, przeprowadzono szereg analiz jednoczynnikowych i wieloczynnikowych, w tym meta-analizę z uwzględnieniem analizy skumulowanej, analizy w podgrupach, analizy niejednorodności i wrażliwości, a także meta-regresję oraz ocenę błędu publikacji.

Meta-analiza jest narzędziem analityczno-badawczym, które umożliwia porównanie niezależnych badań oraz ilościową syntezę wyników pochodzących z dużej liczby prób. W przedstawionej dysertacji analizie poddano łącznie 611 interwencji, zdefiniowanych jako pojedyncze porównania różniące się rodzajem/dawką zastosowanego czynnika indukującego PH, czasem wywołania schorzenia, testowanym związkiem, dawką/drogą podania leku, czasem ekspozycji na testowane leki/substancje czy schematem badawczym (prewencyjny/terapeutyczny). Meta-analizy badań klinicznych z randomizacją zajmują pierwsze miejsce wśród badań klinicznych, z uwagi na

dokładność obliczeń, które uwzględniają m.in. przedział ufności dla efektu łącznego oraz zmniejszenie błędów systematycznych i błędów losowych. To pozwala na uzyskanie bardziej wiarygodnych wyników. Wśród wad takiej ilościowej syntezy wymienia się łączenie badań o dużej niejednorodności w ramach tej samej analizy oraz uwzględnienie jedynie opublikowanych badań, które mogą przedstawiać wyższe – pozytywne wartości mierzonych efektów [120, 125]. W niniejszej pracy, w celu uniknięcia pierwszego z przytoczonych ograniczeń, przeprowadzono analizy w podgrupach wyznaczonych przez wybrane zmienne jakościowe i ilościowe. Ocena błędu publikacji umożliwiła określenie obciążenia wyników błędem systematycznym oraz wielkości efektu łącznego po uwzględnieniu potencjalnie nieopublikowanych badań. Meta-analizy badań przedklinicznych nie są tak powszechne jak ilościowe syntezy wyników prób klinicznych. **Niniejsza praca przedstawia pierwszą jakościową i ilościową syntezę wyników uzyskanych w 290 niezależnych badaniach przeprowadzonych na modelach zwierzęcych PH, na łącznej grupie zwierząt doświadczalnych – 11 535 osobników.** Dla porównania, w kolejnych latach (2017–2020) opublikowano meta-analizy, które zrealizowano w oparciu o wyniki z odpowiednio 10, 23, 25, 26 oraz 44 badań przedklinicznych z zakresu nadciśnienia płucnego [8, 59, 109, 143, 180]. Wymienione prace dotyczyły efektywności terapii komórkami macierzystymi w kontekście poprawy parametrów hemodynamicznych (RVSP, mPAP), zmian patomorfologicznych (RVH, WT) oraz ograniczenia stanu zapalnego w obrębie płuc i naczyń płucnych.

Na potrzeby realizacji pierwszego celu pracy postawiono dwie hipotezy badawcze.

Hipoteza 1. Modele zwierzęce nadciśnienia płucnego są zróżnicowane

Przyjęto, że model zwierzęcy nadciśnienia płucnego jest opisany przez określenie takich cech składowych jak: metoda wywołania nadciśnienia płucnego (rodzaj, dawka, sposób podania czynnika indukującego), czas trwania indukcji schorzenia, gatunek zwierząt doświadczalnych. W dalszej części pracy wykazano, że wymienione składowe mogą różnicować oceniane w pracy modele i determinować rozwój nadciśnienia płucnego. Badania w zakwalifikowanych artykułach przeprowadzono z wykorzystaniem różnych metod indukcji nadciśnienia płucnego. **W większości publikacji (blisko 95% interwencji) schorzenie wywoływano stosując metody klasyczne oparte na ekspozycji na przewlekłą hipoksję (niedotlenienie) (CH) lub na podaniu monokrotaliny (MCT).** Modyfikacje metod klasycznych, tzw. metody alternatywne, których zastosowanie pozwoliło na indukcję cięższej postaci PH, wykorzystano w ponad 5% interwencji. Spośród wszystkich ocenionych prób eksperymentalnych większość przeprowadzono na modelu MCT (ponad 60% interwencji).

Modyfikacjom metod klasycznych przypisuje się duże znaczenie ze względu na wywołanie cięższej i przetrwałej postaci nadciśnienia płucnego oraz lepsze odzwierciedlenie zmian patomorfologicznych zachodzących u ludzi. Przykładowo, w metodzie opartej na Sugenie 5416

obserwuje się przebudowę naczyń płucnych ze zmianami spłotowatymi oraz z koncentrycznym zwłóknieniem warstwy *neointima*, które nie rozwijają się w PH wywołanym metodami klasycznymi. Wskazuje się także na mniejszą toksyczność Sugenu 5416 w porównaniu do monokrotaliny [161]. Pomimo opisanych korzyści MCT pozostaje najczęściej stosowanym czynnikiem do indukcji nadciśnienia płucnego w modelach zwierzęcych PH. Przykładowo, w 2020 roku opublikowano ponad 100 badań, w których nadciśnienie płucne wywołano przez podanie monokrotaliny i około 20 prac, w których zastosowano Sugen 5416 w połączeniu z ekspozycją na przewlekłe niedotlenienie. Modelem MCT posłużono się w próbach przedklinicznych dla wykazania skuteczności terapeutycznej związków zarejestrowanych później w terapii swoistej tętniczego nadciśnienia płucnego: antagonistów receptora endoteliny, inhibitorów fosfodiesterazy-5, analogów prostacykliny, seleksypagu oraz w badaniach nad ralinepagiem, który znajduje się obecnie w III fazie prób klinicznych [78, 189].

Dalszy przegląd piśmiennictwa pokazał szeroki zakres dawek, w jakich stosowano monokrotalinę, tj. od 40 do 80 mg/kg m.c. **W ponad połowie analizowanych interwencji nadciśnienie płucne indukowano przez dootrzewnowe lub podskórne podanie monokrotaliny w dawce 60 mg/kg m.c. (50%).** W dalszej części pracy przeprowadzono szczegółowe analizy w podgrupach, wyznaczonych przez dawki monokrotaliny, w kontekście stopnia wywołania schorzenia. Podobnie, wykonane analizy wskazały na zróżnicowanie czasu trwania indukcji nadciśnienia płucnego we włączonych badaniach. Z tego względu w dalszych analizach przyjęto pięć kategorii czasu wywołania schorzenia: poniżej 8 dni, 8–14 dni, 15–21 dni, 22–28 dni oraz powyżej 28 dni.

W zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych badania prowadzono najczęściej z udziałem szczurów (około 90% wszystkich interwencji), na szczepie Sprague-Dawley (ponad 50% wszystkich interwencji). W pozostałych badaniach były to szczury Wistar (ponad 30%) oraz Wistar-Kyoto (około 8%). Wśród myszy dominował szczep C57BL (około 6%), uważany w obrębie gatunku za najbardziej podatny na wywołanie PH w modelu opartym na ekspozycji na przewlekłe niedotlenienie [172]. Wyniki uzyskane przez innych badaczy pokazały znaczenie różnic międzygatunkowych w odpowiedzi na czynnik wywołujący nadciśnienie płucne w metodzie ekspozycji na przewlekłą hipoksję [15, 178]. Dlatego w dalszej części pracy przeprowadzono analizy w podgrupach dla określenia wpływu gatunku na rozwój PH.

W kolejnym etapie badań podjęto próbę ilościowej oceny wpływu składowych różnicujących modele zwierzęce nadciśnienia płucnego na rozwój schorzenia. W tym celu sformułowano drugą hipotezę badawczą:

Hipoteza 2. Stopień rozwoju i ciężkość wywołanych zmian hemodynamicznych i przerostowych zależy od wyboru modelu zwierzęcego nadciśnienia płucnego

a) Rozwój i ciężkość wywołanych zmian hemodynamicznych i przerostowych w zależności od wyboru rodzaju metody indukcji nadciśnienia płucnego

Wykonane w pracy analizy ilościowe wskazały na większy potencjał wywołania schorzenia w próbach przedklinicznych, które przeprowadzono na modelach alternatywnych. Stanowią one modyfikacje metod klasycznych. Ich wprowadzenie do farmakologii eksperymentalnej miało odpowiadać na potrzebę opracowania takich metod indukcji schorzenia, które lepiej obrazują zmiany hemodynamiczne i histopatologiczne, jakie obserwuje się u pacjentów z PH. Jak wcześniej wspomniano, metody alternatywne pozwalają na wywołanie przetrwałej i nieodwracalnej postaci schorzenia oraz odtworzenie obrazu patomorfologicznego tętnic płucnych [15, 178]. Przykładowo, w modelach opartych na iniekcji monokrotaliny w połączeniu z usunięciem lewego płuca lub z ekspozycją na przewlekłe niedotlenienie, rozwija się koncentryczne zwłóknienie warstwy *neointima*. Dochodzi też do okluzji naczyń płucnych ze skrzeplinami fibryny. Powyższych zmian nie obserwuje się w klasycznym modelu MCT [62, 149]. Niniejsza analiza pokazała, że taka modyfikacja modelu monokrotaliny pozwala na uzyskanie znaczącego podwyższenia skurczowego ciśnienia w prawej komorze serca, średniego ciśnienia w tętnicy płucnej czy przerostu mięśnia prawej komory serca i grubości ściany tętnic płucnych. Istotne zmiany w wartościach parametrów hemodynamicznych i przerostowych obserwowano również w przypadku pozostałych modyfikacji metod klasycznych, kiedy model oparty na ekspresji na przewlekłą hipoksję (CH) połączono z iniekcją Sugenu 5416 bądź narażeniem na przewlekłą hiperkapnię (CH+HC). Uzyskane wyniki dla dwóch najczęściej raportowanych parametrów w zakwalifikowanych badaniach – RVSP oraz RVH pokazały, że **analizowane metody indukcji ze względu na stopień rozwoju PH można uszeregować wg kolejności: CH < MCT < LP+MCT < Sugen**. Przedstawiona zależność stanowi sugestię i wymaga potwierdzenia w dalszych obserwacjach z uwagi na niewielką liczbę badań wykorzystujących wymienione metody alternatywne.

Jak wynika z przeglądu dostępnego piśmiennictwa, pomimo przytoczonych korzyści metody alternatywne nie są obecnie powszechnie stosowane. Potwierdza to również przegląd systematyczny przeprowadzony na potrzeby niniejszej pracy. Jak wcześniej wspomniano opublikowano jedynie około 5% wszystkich interwencji. Potencjalne ograniczenia modyfikacji metod klasycznych mogą obejmować wyższe koszty eksperymentów czy większą śmiertelność zwierząt doświadczalnych w związku z zastosowaniem techniki indukcji PH opartej na ingerencji chirurgicznej [145, 167]. Autorzy innych prac wskazują również na możliwe różnice w obrazie histopatologicznym naczyń płucnych, zwłaszcza dotyczące występowania zmian splotowatych u zwierząt doświadczalnych i ludzi [45].

Echokardiografia jest jedną z podstawowych metod diagnostycznych w nadciśnieniu płucnym. Autorzy licznych prac wskazują również na korzyści wynikające z jej zastosowania w badaniach prowadzonych na modelach zwierzęcych PH. Zastosowanie metod inwazyjnych w badaniach na zwierzętach często wiąże się z ich przedwczesną śmiercią i tym samym może wymagać udziału większej liczby osobników w eksperymentach. Wykorzystanie echokardiografii pozwala w sposób nieinwazyjny monitorować stopień wywołania nadciśnienia płucnego oraz odpowiedź na wdrożone leczenie poprzez ocenę hemodynamiki, morfologii i funkcji prawej komory serca u zwierząt. Opisywana metoda pozwala na określenie takich parametrów jak ciśnienie skurczowe w prawej komorze serca, amplituda ruchu skurczowego pierścienia zastawki trójdzielnej czy też frakcja wyrzutowa prawej komory serca. Wskazuje się, że dokładność właściwie zwalidowanych pomiarów echokardiograficznych jest porównywalna z wynikami otrzymanymi metodą cewnikowania prawej komory serca [177]. Pomimo przytoczonych korzyści omawiana metoda nie jest często wykorzystywana w próbach eksperymentalnych na zwierzętach. W zakwalifikowanych pracach niewielu autorów zastosowało echokardiografię do rejestracji wartości ocenianych parametrów.

b) Rozwój i ciężkość wywołanych zmian hemodynamicznych i przerostowych w zależności od wielkości dawki monokrotaliny

Z uwagi na dominujący udział modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego opartych na monokrotalinie, przeprowadzono dalsze analizy w podgrupach. Uwzględniały one wielkość dawki induktora. Jak wcześniej wspomniano, w zakwalifikowanych badaniach monokrotalinę stosowano w zakresie dawek od 40 mg/kg m.c. do 80 mg/kg m.c. Z tego względu podjęto próbę oceny wpływu dawki MCT na pogorszenie ocenianych parametrów hemodynamicznych i przerostowych. **Uzyskane wyniki pokazały, że zwiększenie dawki monokrotaliny powyżej 60 mg/kg m.c. ma nieznaczny wpływ na pogorszenie analizowanych parametrów – w przeciwieństwie do samej metody indukcji nadciśnienia płucnego.** Nie odnotowano istotnego przyrostu parametrów hemodynamicznych: RVSP i mPAP. Zastosowanie MCT w dawkach powyżej 60 mg/kg m.c. spowodowało pogorszenie zmian przerostowych w obrębie mięśnia prawej komory serca (RVH) oraz ściany tętnic płucnych (WT), bez znaczącego wpływu na parametry hemodynamiczne.

W dostępnym piśmiennictwie wielu autorów wskazuje na możliwą zależność pomiędzy wielkością dawki monokrotaliny a rozwojem schorzenia. Brakuje jednak wyników prób eksperymentalnych przeprowadzonych na modelach zwierzęcych PH, które pokazałyby zróżnicowany wpływ wielkości dawek MCT na przyrost parametrów hemodynamicznych i przerostowych. Potwierdza to także mała liczba zakwalifikowanych w pracy badań, w których użyto MCT w dawkach powyżej 60 mg/kg m.c. Wyniki dotychczasowych prób eksperymentalnych pokazują, że MCT stosowana w zakresie dawek 50–60 mg/kg m.c. wywołuje zmiany hemodynamiczne i patomorfologiczne głównie w obrębie

krążenia płucnego. Wyższe dawki induktora mogą spowodować dalsze pogorszenie ocenianych parametrów. Dotyczy to zwłaszcza dawek MCT powyżej 60 mg/kg m.c. i dłuższego czasu trwania indukcji schorzenia. Wiąże się to jednak z większą toksycznością i śmiertelnością zwierząt doświadczalnych [116, 178], co może tłumaczyć dość powszechne stosowanie monokrotaliny w dawce 60 mg/kg m.c. Znaczące zmiany, takie jak wzrost ciśnienia w tętnicy płucnej, przerost mięśnia prawej komory serca i przebudowa tętnic płucnych, rozwijają się po upływie około 3 tygodni od podania monokrotaliny. Jest to spowodowane działaniem aktywnego metabolitu MCT – dehydromonokrotaliny, która po aktywacji w wątrobie jest magazynowana w erytrocytach [74, 146]. Zwraca to uwagę na znaczenie kolejnej składowej modeli zwierzęcych PH, jakim jest czas trwania indukcji nadciśnienia płucnego.

c) Rozwój i ciężkość wywołanych zmian hemodynamicznych i przerostowych w zależności od czasu trwania indukcji nadciśnienia płucnego

Wyniki przeprowadzonej w pracy meta-analizy oraz meta-regresji pokazały, że czas trwania indukcji nadciśnienia płucnego może w istotny sposób determinować rozwój schorzenia wywołanego w różnych modelach zwierzęcych. Zmiany charakterystyczne dla PH pojawiały się już po kilku dniach od rozpoczęcia indukcji, niezależnie od zastosowanej metody. Dłuższy czas rozwoju nadciśnienia płucnego sprzyjał dalszemu pogorszeniu (przyrostowi) raportowanych parametrów hemodynamicznych oraz zmian przerostowych. Potwierdziły to przeprowadzone analizy ilościowe w podgrupach. Przykładowo, 28-dniowy czas wywołania schorzenia sprzyjał znacznemu pogorszeniu średniego ciśnienia w tętnicy płucnej w porównaniu z krótszym, 8-dniowym okresem indukcji. Zwierzęta doświadczalne eksponowane na czynnik wywołujący nadciśnienie płucne przez 22–28 dni cechował większy przerost mięśnia prawej komory serca niż osobniki, u których schorzenie indukowano przez 8–14 dni. Kolejne analizy miały na celu wykazanie ewentualnego związku między czasem indukcji a rodzajem metody, jakiej użyto do wywołania PH. I tak, metody alternatywne, tj. metoda oparta na podaniu monokrotaliny w połączeniu z ekspozycją na przewlekłe niedotlenienie lub z usunięciem lewego płuca lub z hiperkapnią oraz model oparty na Sugenie 5416, cechował dłuższy czas indukcji w porównaniu do metod klasycznych. Wynikało to z techniki wywołania nadciśnienia płucnego, która uwzględniała dodatkową ingerencję chirurgiczną – usunięcie lewego płuca siedem dni przed iniekcją MCT [133]. Dotyczyło to też konieczności utrzymania zwierząt przez kilka tygodni w warunkach normoksji po zakończonej ekspozycji na przewlekłe niedotlenienie – metoda oparta na Sugenie 5416 [144]. Jak wcześniej wspomniano, większość prób eksperymentalnych przeprowadzono z wykorzystaniem metod klasycznych opartych na monokrotalinie lub przewlekłej hipoksji. Dlatego dalsze analizy w podgrupach przeprowadzono w odniesieniu do tych dwóch modeli. Także w tym przypadku dłuższy czas indukcji nadciśnienia płucnego wiązał się z uzyskaniem dalszego pogorszenia parametrów hemodynamicznych

i przerostowych. Jedynie w przypadku zwierząt poddanych przewlekłej hipoksji (model CH) czas indukcji powyżej 28 dni nie spowodował istotnego pogorszenia ocenianych zmian.

Wyniki meta-regresji potwierdziły istotny wpływ czasu wywołania PH na zmianę ocenianych parametrów w odniesieniu do wszystkich zastosowanych metod indukcji schorzenia.

d) Rozwój i ciężkość wywołanych zmian hemodynamicznych i przerostowych w zależności od gatunku zwierząt doświadczalnych

Wpływ różnic międzygatunkowych na pogorszenie badanych parametrów okazał się mniej znaczący niż pozostałe analizowane składowe modele zwierzęcych nadciśnienia płucnego.

Zależność wywołanych zmian hemodynamicznych i przerostowych od gatunku zwierząt doświadczalnych oceniono w odniesieniu do metody CH. Było to spowodowane faktem, że tylko w próbach eksperymentalnych opartych na przewlekłej hipoksji badacze wybierali myszy lub szczury. Inne modele zwierzęce obejmowały jeden gatunek zwierząt doświadczalnych – szczura. Jak wcześniej opisano, uzyskane wyniki pokazały słabszy rozwój nadciśnienia płucnego u myszy. U szczurów ekspozycja na przewlekłe niedotlenienie wywołała bardziej znaczące podwyższenie skurczowego ciśnienia w prawej komorze serca, przerost mięśnia prawej komory serca i ściany tętnic płucnych. Z tego powodu, dla uniknięcia wpływu różnic międzygatunkowych, przeprowadzono analizy, w których uwzględniono jedynie wyniki badań przeprowadzonych na szczurach. Potwierdziły one wcześniejsze spostrzeżenia; ekspozycja zwierząt na przewlekłe niedotlenienie wywołała najmniejsze przyrosty wartości parametrów hemodynamicznych i przerostowych spośród ocenianych w pracy metod indukcji PH.

Dotychczasowe badania nad patofizjologią PH potwierdzają wyniki opisanych wyżej analiz ilościowych. Odpowiedź na przewlekłe niedotlenienie jest uwarunkowana wiekiem i płcią zwierząt, a także zależy od gatunku i szczepu [126]. Ekspozycja szczurów na przewlekłą hipoksję wywołuje, w przeciwieństwie do myszy, znaczną przebudowę naczyń płucnych. W obrazie zmian patomorfologicznych obserwuje się przerost i hiperplazję komórek mięśni gładkich naczyń. Opisane zmiany są następstwem nadmiernej proliferacji komórek mięśni gładkich w ścianach tętnic płucnych i nasilenia procesu apoptozy w warstwie śródbłonkowej. Jest ona wynikiem zwiększonej ekspresji genów odpowiedzialnych za proliferację komórek śródbłonka naczyń krwionośnych i oporności komórek na apoptozę. Inne badania wskazują także na różnice w odpowiedzi na przewlekłe niedotlenienie wśród poszczególnych szczepów myszy i szczurów [184]. Za najbardziej podatny na warunki hipoksji uważa się szczep myszy C57BL, który wybierano najczęściej w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych. W dostępnym piśmiennictwie wymienia się też model przewlekłej hipoksji wywołanej u zwierząt Fawn-hooded. Poddanie tego szczepu warunkom niedotlenienia pozwala na spontaniczny rozwój ciężkiej postaci tętniczego nadciśnienia płucnego. W przeciwieństwie do innych szczepów, u szczurów Fawn-hooded obserwuje się hiperplazję

warstwy wewnętrznej tętnic płucnych, jej zwłóknienie i rozwój zmian splotowatych [20, 172]. Model oparty na indukcji PH u szczurów Fawn-hooded nie został oceniony w niniejszej pracy, z uwagi na brak wyników. Autorzy innych prac wskazują także na różnice w odpowiedzi na działanie monokrotaliny oraz Sugenu 5416. Wśród najbardziej podatnych na działanie wymienionych induktorów wymienia się szczury Sprague-Dawley [98, 151].

Wywołanie nadciśnienia płucnego u myszy przez podanie monokrotaliny nie jest możliwe. Wynika to z faktu, że myszy nie metabolizują MCT do postaci aktywnej – dehydromonokrotaliny (MCTP), odpowiedzialnej za indukcję schorzenia. W tym przypadku rozwój PH można uzyskać przez bezpośrednie podanie zwierzętom MCTP [74]. W żadnej z analizowanych w pracy prób eksperymentalnych nie zastosowano opisanej procedury celem wywołania PH.

Dalej przeanalizowano ewentualny wpływ środka znieczulającego zastosowanego podczas badań hemodynamicznych na wartości mierzonych parametrów. **Uwagę zwraca różnorodność substancji znieczulających wybieranych przez autorów zakwalifikowanych publikacji do procedury znieczulenia.** Łącznie zastosowano dziewiętnaście różnych związków, które podawano pojedynczo lub w kombinacjach dwu – lub trójskładnikowych, w różnych dawkach. W dalszych analizach, dla większej porównywalności badań, uwzględniono pięć najczęściej wykorzystywanych przez badaczy substancji: pentobarbital sodu, izofluran, uretan, wodzian chloralu oraz połączenie ksylazyny i ketaminy. Uzyskane wyniki pokazały, że środek znieczulający może różnicować rejestrowane wartości skurczowego ciśnienia w prawej komorze serca i średniego ciśnienia w tętnicy płucnej. Największy przyrost ocenianych parametrów u zwierząt z kontroli pozytywnej w odniesieniu do kontroli negatywnej odnotowano dla izofluranu, najmniejszy – dla wodzianu chloralu. Prace innych autorów wskazują również na istnienie zależności pomiędzy rodzajem zastosowanego środka znieczulającego a wartością mierzonego parametru hemodynamicznego. Przykładowo, Janssen i wsp. (2004) poddali takiej ocenie izofluran, pentobarbital sodu, uretan i połączenie ksylazyny z ketaminą. Uzyskane wyniki potwierdziły różnice w wartościach mierzonych parametrów – pojemności minutowej serca, częstości akcji serca, średniego ciśnienia tętniczego krwi oraz całkowitego oporu obwodowego w zależności od zastosowanej substancji znieczulającej [94]. Inne badania pokazały niejednoznaczny wpływ różnych substancji znieczulających na zmniejszenie bądź zwiększenie wartości poszczególnych parametrów hemodynamicznych. Albrecht i wsp. (2014) wykazali, że izofluran może wywoływać niedociśnienie, podczas gdy medetomidyna w połączeniu z midazolamem i fentanylem – nadciśnienie tętnicze [4]. Przeprowadzona w niniejszej pracy analiza jest jednak pierwszą, która odnosi się do modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego. Potrzeba dalszych badań, aby precyzyjniej określić wpływ środków znieczulających na wartości mierzonych parametrów hemodynamicznych w przebiegu PH u zwierząt.

W analizowanych badaniach przedklinicznych większość autorów nie przedstawiła danych dotyczących śmiertelności zwierząt. Były one dostępne w około 15% publikacji. Może to stanowić

pewne ograniczenie w określeniu przydatności ocenianych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego. Brak takich danych uniemożliwił przeprowadzenie dalszych analiz, które pozwoliłyby skorelować składowe modeli zwierzęcych PH, takie jak rodzaj metody indukcji, wielkość dawki induktora czy czas wywołania schorzenia, z przeżywalnością zwierząt doświadczalnych.

Kolejnym głównym celem niniejszej pracy była jakościowa i ilościowa ocena efektywności nowych związków testowanych na modelach zwierzęcych nadciśnienia płucnego w zakwalifikowanych artykułach. Ocenie poddano również wpływ zastosowanego schematu badawczego – prewencyjnego i/lub terapeutycznego na działanie ocenianych leków/substancji. Sformułowano kolejną hipotezę badawczą:

Hipoteza 3. Rodzaj zastosowanego w badaniach przedklinicznych modelu zwierzęcego nadciśnienia płucnego może wpływać na efektywność ocenianych związków

W oparciu o przeprowadzone analizy można stwierdzić, że metoda indukcji nadciśnienia płucnego determinuje rozwój choroby wyrażony pogorszeniem (przyrostem) analizowanych parametrów hemodynamicznych i przerostowych. Oceniane modele cechuje słabsza lub silniejsza odpowiedź na działanie czynników wywołujących PH. Można wnioskować, że rodzaj modelu badawczego wpływa także na ocenę wynikowej efektywności potencjalnych leków testowanych w próbach eksperymentalnych na zwierzętach. Wskazują na to także wstępne wyniki przeprowadzonych analiz porównawczych obejmujących fasudil i bortezomib, które testowano na różnych modelach klasycznych PH, zachowując podobne warunki eksperymentów. W odniesieniu do przytoczonych analiz, wpływ fasudilu i bortezomibu na poprawę parametrów: RVSP i RVH okazał się bardziej znaczący w przypadku ekspozycji zwierząt na przewlekłą hipoksję, w porównaniu do modelu monokrotaliny. Były to pojedyncze obserwacje, odnoszące się do metod klasycznych. Dla ich potwierdzenia potrzeba dalszych badań eksperymentalnych w tym zakresie, prowadzonych na różnych modelach zwierzęcych PH. Oczekuje się, aby stosowane leki normalizowały zmiany wywołane indukcją nadciśnienia płucnego. W takim wypadku różnica średnich wartości poszczególnych parametrów pomiędzy grupą kontroli pozytywnej i interwencji lekowej powinna być zbliżona do różnicy średnich wartości parametrów pomiędzy grupą kontroli pozytywnej i negatywnej. **Dlatego w niniejszej pracy jako miarę efektu – skuteczności badanych związków zaproponowano, obok różnicy średnich – D, iloraz różnic średnich – R** (podrozdział 3.1.3.2.2). Wartość $R=0,5$ oznaczała, że testowany związek zmniejszył o połowę średnią wartość analizowanego parametru, zwiększoną w wyniku indukcji nadciśnienia płucnego. Wartość $R=1,0$ wskazywała na całkowite odwrócenie zmian wywołanych indukcją PH w wyniku działania testowanego związku.

W pracy oceniono i porównano skuteczność 206 związków, które przyporządkowano do dwudziestu sześciu grup terapeutycznych/farmakologicznych w oparciu o ich wskazania terapeutyczne i/lub mechanizmy działania opisane dotychczas dla nadciśnienia płucnego [168]. Czterech zakwalifikowanych związków (acetazolamid, GABA, MK571, U50,488H) nie przydzielono do żadnej z grup, ze względu na różne od pozostałych mechanizmy działania. **Uwagę zwraca liczba i różnorodność związków badanych w próbach przedklinicznych.**

Sporządzone rankingi efektywności opierały się na dwóch miarach efektu: D i R. Uzyskane wyniki wskazują na różnice w wynikowej efektywności związków, w zależności od tego, jaką miarę efektu wykorzystano do obliczeń. Przykładowo, gdy porównano wpływ testowanych związków na poprawę skurczowego ciśnienia w prawej komorze serca, wyrażoną jako różnica średnich (D), największą skuteczność można było przypisać inhibitorom reduktazy HMG-CoA. Zastosowanie jako miary efektu ilorazu różnic średnich (R) pozwoliło na wskazanie jako najbardziej efektywnych, w odniesieniu do normalizacji parametru RVSP, związków z grupy peptydów wazoaktywnych ($p < 0,05$). Statyny znalazły się na szesnastym miejscu w rankingu. Największe ograniczenie przyrostu grubości ściany tętnic płucnych przypisano ekspozycji zwierząt doświadczalnych na nowe inhibitory PDE, gdy w obliczeniach użyto różnicy średnich (D). Z kolei zastosowanie ilorazu różnic średnich (R) nie potwierdziło tych wyników. Zakwalifikowane związki i grupy terapeutyczne/farmakologiczne wywierały różny wpływ na normalizację wartości poszczególnych parametrów hemodynamicznych i przerostowych. **W rankingach sporządzonych w oparciu o miarę efektu (D) uwagę zwraca znaczny rozrzut wyników. Dalsza ocena błędów publikacji wskazała na obciążenie publikacyjne, zwłaszcza w przypadku różnicy średnich (D). Wykorzystanie (R) jako miary efektu pozwoliło na uzyskanie mniejszego obciążenia i poprawiło jednorodność badań. Dlatego iloraz różnic średnich (R) zastosowano do dalszych obliczeń w podgrupach.**

W zakwalifikowanych pracach związki testowano w schemacie prewencyjnym, tzn. w celu prewencji zmian powstałych w wyniku wywołania PH lub terapeutycznym – dla cofnięcia zaindukowanych zmian. W schemacie prewencyjnym podawano je zwierzętom doświadczalnym przed wywołaniem schorzenia lub w krótkim czasie po ekspozycji na czynnik wywołujący nadciśnienie płucne, w terapeutycznym – po ekspozycji na czynnik indukujący schorzenie, w trakcie rozwoju PH (podrozdział 3.1.2). Większość związków w analizowanych próbach eksperymentalnych podawano w celu prewencji zmian powstałych związanych z indukcją PH (ponad 70% interwencji). Wartości ilorazu różnic średnich (R) uzyskane dla ocenianych parametrów były większe w przypadku tego schematu, co mogłoby wskazywać na znaczniejszy potencjał testowanych związków w schemacie prewencyjnym, w odniesieniu do poprawy parametrów hemodynamicznych i przerostowych. **Może to oznaczać różnice w ocenie efektywności związków – kandydatów do leczenia PH w analizach porównawczych, odnoszących się do wyników eksperymentów prowadzonych w schemacie prewencyjnym lub terapeutycznym.**

Do dalszych szczegółowych analiz zakwalifikowano dziesięć najczęściej badanych grup terapeutycznych/farmakologicznych wg przyjętej w pracy klasyfikacji [168] (podrozdział 3.2.2.3). Były to: aktywatory kanałów potasowych ATP-zależnych, inhibitory szlaku RhoA/ROCK, inhibitory kinaz serynowo-treoninowych (Ser-Thr)/ kinaz tyrozynowych (TKI), statyny, inhibitory szlaku przemian serotoniny, agonisty receptorów i pochodne estrogeny, regulatory układu RAAS, związki o działaniu antyremodelingowym, związki o działaniu przeciwzapalnym oraz związki pochodzenia roślinnego. Wyłączenie z analiz pozostałych substancji miało na celu zwiększenie porównywalności badań.

Przeprowadzone obliczenia pozwoliły stwierdzić, że oceniane związki spowodowały zmniejszenie średniej wartości ilorazu różnic średnich (R) dla każdego z analizowanych parametrów prawie o połowę. Wśród związków, które spowodowały prawie całkowite odwrócenie zmian powstałych w nadciśnieniu płucnym znalazły się adenozyne i aktywatory ACE2 z grupy regulatorów układu RAAS, iptakalim należący do aktywatorów kanałów potasowych ATP-zależnych, nienasycone kwasy tłuszczowe n-3 – kwas dokozaheksaenowy i kwas dokozapentaenowy oraz inhibitory NF- κ B zakwalifikowane do związków o działaniu przeciwzapalnym: IMD-0354 i pirolidynoditiokarbaminian (PDTC).

Spośród dziesięciu najczęściej badanych grup największym wpływem na poprawę ocenianych parametrów wykazały się aktywatory kanałów potasowych ATP-zależnych, inhibitory szlaku RhoA/ROCK i regulatory układu RAAS.

Ocenie poddano skuteczność trzech **aktywatorów kanałów potasowych ATP-zależnych**: iptakalimu, nikorandylu oraz pinacydylu. Wymienione związki były testowane na modelach klasycznych – modelu ekspozycji na przewlekłą hipoksję i modelu monokrotaliny. Wśród nich największą efektywność wykazywał iptakalim, który testowano jedynie w schemacie prewencyjnym.

Obecność kanałów potasowych ATP-zależnych stwierdzono w komórkach śródbłonna i mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Są to heteromultimery podjednostek kanałów potasowych ($K_{IR6.x}$) i receptorów sulfonilomocznikowych (SUR). Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia ATP powoduje ich zamykanie, a spadek – otwarcie. Kanały potasowe ATP-zależne pośredniczą w regulowaniu napięcia naczyń krwionośnych, w tym tętnic płucnych [10]. U osób z nadciśnieniem płucnym może dochodzić do zmniejszenia aktywności omawianych kanałów, m. in. za sprawą mutacji genu KCNK3 odpowiedzialnego za ich prawidłową budowę. Zmniejszenie aktywności kanałów potasowych prowadzi do zwiększonego napływu jonów wapnia do przestrzeni wewnątrzkomórkowej i depolaryzacji błony komórkowej. W konsekwencji dochodzi do skurczu tętnic płucnych, nasilenia procesu proliferacji i wzrostu oporności komórek naczyń krwionośnych na apoptozę, co sprzyja przebudowie ścian naczyń. Dotychczasowe próby eksperymentalne pokazują również, że związki aktywujące kanały potasowe ATP-zależne hamują uwalnianie endoteliny-1 i zwiększają uwalnianie NO, regulując w ten sposób zaburzoną równowagę pomiędzy

kluczowymi szlakami sygnałowymi w patogenezie tętniczego nadciśnienia płucnego. Ograniczeniem zastosowania leków aktywujących kanały potasowe ATP-zależne może być nadmierne obniżenie ciśnienia systemowego. Iptakalim, który działa selektywnie i długotrwale na tętniczki płucne, nie powoduje rozwoju tolerancji oraz wykazuje nieliczne działania niepożądane u zwierząt. Omawiana grupa związków może stanowić propozycję do dalszych prób klinicznych w zakresie tętniczego nadciśnienia płucnego i odpowiedź na potrzebę wprowadzenia do terapii związków o działaniu antyremodelingowym [21, 131].

W badaniach adresowanych **inhibitorom szlaku RhoA/ROCK** oceniono efektywność terapeutyczną fasudilu, azaindolu-1 oraz KMUP-1. Związki te wpływały na poprawę analizowanych parametrów hemodynamicznych i ograniczenie przerostu mięśnia prawej komory serca. Inhibitory szlaku RhoA/ROCK oceniano zarówno w modelu prewencyjnym jak i terapeutycznym, z wykorzystaniem klasycznych metod indukcji nadciśnienia płucnego.

Białka Rho kontrolują wiele istotnych procesów komórkowych, takich jak różnicowanie, proliferacja, migracja czy apoptoza komórek. Wyniki dotychczasowych badań przedklinicznych wskazują na korzyści wynikające z hamowania aktywności szlaku RhoA/ROCK. W badaniach na zwierzętach, w których testowano inhibitory omawianego szlaku, obserwowano obniżenie ciśnienia w tętnicy płucnej i w prawej komorze serca, ograniczenie przebudowy naczyń płucnych i przerostu mięśnia prawej komory oraz poprawę przeżywalności. W ciągu ostatniej dekady przeprowadzono kilka prób klinicznych z fasudilem. W większości z nich oceniano krótkotrwały wpływ leku na parametry hemodynamiczne. Korzyści wynikające z długoterminowego stosowania fasudilu nie zostały potwierdzone. W 2013 roku zakończono trwające trzy miesiące randomizowane badanie kliniczne na grupie 20 pacjentów z tętniczym nadciśnieniem płucnym. Odnotowano jedynie zwiększenie wskaźnika sercowego bez istotnego wpływu fasudilu na pozostałe parametry hemodynamiczne i wydolność wysiłkową [65, 106].

Kolejny punkt uchwytu dla potencjalnych leków w PH może stanowić **układ renina-angiotensyna-aldosteron**. W niniejszej pracy największą efektywność w odniesieniu do poprawy parametrów hemodynamicznych – skurczowego ciśnienia w prawej komorze serca, średniego ciśnienia w tętnicy płucnej, a także przebudowy ściany naczyń odnotowano w przypadku aktywatorów ACE2 – XNT (1-[(2-dimetylamino)etylamino]-4-(hydroxymetyl)-7-[(4-metylfenyl) sulfonyl oxy]-9H xanthene-9-one) i NSC-354317 oraz adenozyiny. Spośród wymienionych związków tylko adenozyinę oceniono w modelu terapeutycznym. W najnowszych, nieobjętych analizą próbach eksperymentalnych, raportowano istotny wpływ niezarejestrowanych aktywatorów ACE2 na ograniczenie remodelingu naczyń płucnych. Postulowany mechanizm obejmował nasilenie apoptozy komórek wskutek pobudzenia szlaku Hippo, który bierze udział w kontroli procesów proliferacji i apoptozy m.in. poprzez zahamowanie funkcji jego jądrowego efektora – białka YAP [162, 204].

Początkowo korzystne działanie adenozyiny w nadciśnieniu płucnym kojarzono z hamowaniem aktywności reniny i angiotensyny 2. Zastosowanie adenozyiny jako leku jest ograniczone ze względu na krótki okres półtrwania i możliwe efekty uboczne wynikające z nieselektywnego wpływu na receptory A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3 . Obecnie badacze wskazują na potencjalne korzyści z zastosowania agonistów receptorów adenozynowych, a w szczególności receptorów A_{2A} . Ich aktywacja nasila syntezę NO i pobudza rozkurcz tętniczek płucnych. Agonisty receptorów A_{2A} wykazują również działanie antyproliferacyjne, co stwarza możliwość ich zastosowania w terapii antyremodelingowej nadciśnienia płucnego [5].

W ciągu dwóch ostatnich dekad często badano **związki o działaniu przeciwzapalnym** w kierunku potencjalnego zastosowania w nadciśnieniu płucnym. Wśród nich największą efektywnością odznaczały się nienasycone kwasy tłuszczowe n-3 – kwas dokozaheksaenowy i kwas dokozapentaenowy oraz inhibitory NF- κ B – IMD-0354 i pirolidynoditiokarbaminian (PDTC). Wyniki badań przedklinicznych wskazują, że związki te mogą ograniczać przebudowę naczyń w PH. Uważa się, że proces zapalny, który rozwija się w obrębie naczyń płucnych, przyczynia się do uszkodzenia i przebudowy ściany tętnic. Próby przedkliniczne przeprowadzone w ostatnim czasie pokazują korzyści wynikające z zastosowania leków o działaniu przeciwzapalnym i immunosupresyjnym takich jak glikokortykosteroidy (deksametazon, prednizolon), mykofenolan mofetylu, cyklosporyna, rapamycyna czy białko fuzyjne – etanercept [91]. W I fazie testów klinicznych znajduje się *nab*-rapamycyna. Jest to preparat nano-cząstek albuminowych zawierających rapamycynę. Technologia *nab* polega na zmieszaniu hydrofobowego leku zawieszonego w fazie olejowej z wodnym roztworem albuminy i homogenizacji powstałej mieszaniny. W ten sposób powstają nanocząstki o średnicy 130-150 nm z zamkniętą wewnątrz substancją. Technologia *nab* umożliwia rozpuszczenie leku w roztworach wodnych bez dodatkowych rozpuszczalników i pozwala również na zwiększenie trwałości substancji. Brak konieczności użycia innych związków poprawiających rozpuszczalność leku w wodzie może ograniczyć działania niepożądane rozpuszczalników. Podanie związków w postaci nanocząstek umożliwia wykorzystanie mechanizmu pobierania molekuł przez komórki, dzięki czemu działanie leku ogranicza się do wybranych komórek [108]. W badaniach klinicznych znajdują się również przeciwciała monoklonalne, np. rytuksymab i tocilizumab [48, 84], mające obecnie zastosowanie w terapii m.in. reumatoidalnego zapalenia stawów oraz przewlekłej białaczki limfocytowej.

Badania prowadzone na modelach zwierzęcych odgrywają dużą rolę w poszukiwaniu nowych możliwości terapeutycznych i wyjaśnieniu patogenezы chorób. Potwierdzenie wyników prób przedklinicznych w badaniach klinicznych stanowi istotny problem badawczy. Testowane związki mogą wykazywać w badaniach na ludziach działania niepożądane lub nie przynosić oczekiwanej skuteczności, pomimo braku takich obserwacji u zwierząt doświadczalnych. Niejednokrotnie badania kliniczne są przerywane ze względu na niezadawalający profil bezpieczeństwa testowanych związków (do 25% przypadków) lub brak skuteczności terapeutycznej

(do 50% przypadków) [125]. Przyczyn upatruje się m. in. w różnicach międzygatunkowych. Najczęściej badania przedkliniczne prowadzi się na gryzoniach (myszy, szczury, króliki, świnki morskie). Dawka ocenianej substancji może być zwielokrotniana w celu wywołania podobnego efektu u gryzonia jak w organizmie ludzkim. Stwarza to dodatkowe trudności związane z określeniem dawki badanego związku, która w badaniach kinicznych, pomimo przeliczeń allometrycznych, może okazać się nieskuteczna lub powodować niebezpieczne skutki uboczne. Nie bez znaczenia pozostają także różnice w metabolizmie poszczególnych związków u zwierząt i ludzi. Działania niepożądane mogą być trudne do określenia (np. bóle i zawroty głowy) i nie zawsze są oceniane u zwierząt [45].

Otrzymane w niniejszej pracy wyniki zwracają uwagę na istotny aspekt: różnorodność modeli zwierzęcych stosowanych w badaniach nad potencjalnymi lekami w tej samej jednostce chorobowej. Przekłada się to m. in. na niezadawalającą powtarzalność wyników uzyskanych przez różnych badaczy. Wśród innych przyczyn wymienia się tendencję do publikowania tylko pozytywnych wyników oraz tzw. złudzenie publikacyjne (ang. *publication bias*) mogące wynikać z wybiórczego publikowania danych [125]. Potwierdzają to także wyniki otrzymane w pracy. **Na 611 zakwalifikowanych interwencji, tylko 7% okazało się nieefektywnych, tzn. testowane związki nie spowodowały poprawy lub pogorszyły oceniane parametry.** Interwencje te nie zostały uwzględnione w dalszej analizie jakościowej i ilościowej.

W ciągu ostatnich dwudziestu lat opisywano potencjalne korzyści terapeutyczne dla wielu substancji testowanych w nadciśnieniu płucnym. Nie znalazły one dalszego potwierdzenia w próbach klinicznych. Raportowano też poważne działania niepożądane. Dotyczy to także związków, których skuteczność oceniano w niniejszej pracy. Przykładowo, otrzymane wyniki ilościowej syntezy wskazały na korzystny wpływ **inhibitorów reduktazy HMG-CoA (statyn)** na poprawę parametrów hemodynamicznych i przerostowych, kiedy za miarę efektu przyjęto różnicę średnich (D). Wyniki uzyskane dla drugiej miary efektu – ilorazu różnic średnich (R) nie były tak znaczące. Może to oznaczać dużą heterogenność badań w odniesieniu do modelu badawczego zastosowanego przez poszczególnych eksperymentatorów. Jak wcześniej wspomniano, przyjęcie za miarę efektu ilorazu R pozwala w pewnym stopniu na ograniczenie wpływu zastosowanego modelu na wynikową efektywność testowanych związków. Autorzy prób przedklinicznych prowadzonych na przestrzeni lat raportowali, że statyny (atorwastatyna i simwastatyna) zmniejszają wartości parametrów hemodynamicznych (ciśnienie w tętnicy płucnej i prawej komorze serca) oraz ograniczają przerost mięśnia prawej komory serca czy przebudowę naczyń płucnych. Efekty te nie zostały potwierdzone w badaniach z udziałem pacjentów z PH. Odnotowane korzyści u ludzi obejmowały jedynie redukcję przerostu mięśnia prawej komory serca i obniżenie poziomu markerów związanych z tętniczym nadciśnieniem płucnym (NT-proBNP, P-selektyna). Zmiany te miały charakter przemijający [102, 202, 208]. W licznych próbach przedklinicznych oceniano potencjalne korzyści ze stosowania **inhibitorów kinaz tyrozynowych (TKI)** w PAH. Do dalszych prób

klinicznych wybrano najlepiej „rokujący” – imatynib. Potwierdziły one poprawę wydolności wysiłkowej i parametrów hemodynamicznych u pacjentów z tętniczym nadciśnieniem płucnym. Z powodu poważnych działań niepożądanych, jakie raportowano u 5% pacjentów – zaburzeń hemolitycznych i krwawienia podtwardówkowego, badanie kliniczne III fazy (IMPRES) zostało przedwcześnie zakończone [71]. Podobnie pozostałe leki należące do TKI – sorafenib i sunitynib nie uzyskały akceptacji do stosowania w terapii nadciśnienia płucnego ze względu na działania niepożądane, w tym niekorzystny wpływ na zmniejszenie pojemności minutowej serca [73]. W niniejszej pracy przeprowadzono ilościową syntezę wyników badań nad zastosowaniem sorafenibu, sunitynibu, trycetyrybiny oraz imatynibu, które testowano zarówno w modelu prewencyjnym jak i terapeutycznym. Zastosowanie w obliczeniach ilorazu różnic średnich (R) jako miary efektu, pozwoliło wykazać poprawę skurczowego ciśnienia w prawej komorze serca, bez znaczących zmian w wartościach pozostałych parametrów hemodynamicznych i przerostowych. Spośród analizowanych inhibitorów kinaz tyrozynowych, imatynib w nieznacznym stopniu przyczynił się do normalizacji ciśnienia w tętnicy płucnej oraz przerostu mięśnia prawej komory serca. Ze względu na brak raportowania przez badaczy przeżywalności zwierząt, w przeprowadzonej analizie nie oceniono korzyści stosowania omawianych związków w odniesieniu do ryzyka większej śmiertelności.

Z uwagi na obszerność podjętego tematu, niniejsza analiza nie objęła wszystkich stosowanych w badaniach eksperymentalnych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego. W pracy nie uwzględniono modeli genetycznych czy też modeli PH związanego z wrodzonymi chorobami serca. Ponadto brak danych w zakwalifikowanych protokołach badawczych, uniemożliwił porównanie wpływu składowych modeli zwierzęcych PH (rodzaj modelu, dawka MCT, czas trwania indukcji schorzenia oraz gatunek zwierząt doświadczalnych) na pogorszenie wszystkich analizowanych zmian hemodynamicznych i przerostowych, w tzw. analizach *head to head*. Wybór ocenianych w pracy związków wynikał z przyjętych kryteriów włączenia, w których określono rodzaje modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego. Stąd analizie poddano tylko te związki, które były testowane z użyciem wybranych metod klasycznych i alternatywnych. W ocenie efektywności zakwalifikowanych substancji nie zbadano wpływu na poprawę raportowanych parametrów, takich czynników jak droga podania i dawka testowanych związków oraz czas ekspozycji. Stanowi to cel przyszłych badań, podobnie jak ocena efektywności terapii skojarzonych. Z uwagi na brak danych w zakwalifikowanych publikacjach, nie określono wpływu każdego z 206 związków na poprawę wszystkich ocenianych parametrów hemodynamicznych i zmian przerostowych.

Podsumowanie:

Modele zwierzęce nadciśnienia płucnego są zróżnicowane. Cechuje je różna odpowiedź na czynniki indukujące schorzenie, co determinuje rozwój PH o różnym stopniu ciężkości. Znajomość wpływu poszczególnych składowych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego na rozwój schorzenia może być pomocna w doborze właściwej metodyki badawczej. To z kolei może zwiększyć szanse na potwierdzenie wyników prób przedklinicznych w badaniach na ludziach. Istotny wpływ na rozwój schorzenia odnotowano dla rodzaju metody indukcji PH oraz czasu trwania wywołania schorzenia. Dawka czynnika indukującego – monokrotaliny i gatunek zwierząt doświadczalnych w mniejszym stopniu determinowały rozwój zmian hemodynamicznych i przerostowych, co nie umniejsza znaczenia ww. czynników w wyborze odpowiedniej metodyki badawczej oraz w prawidłowym zaplanowaniu eksperymentów. Spośród dziesięciu najczęściej badanych grup w analizowanych protokołach badawczych, największą efektywnością w odniesieniu do poprawy ocenianych parametrów hemodynamicznych i przerostowych wykazały się aktywatory kanałów potasowych ATP-zależnych, inhibitory szlaku RhoA/ROCK i regulatory układu RAAS. Związki z tych grup mogą stanowić propozycje kandydatów do dalszych prób klinicznych. Skuteczność ocenianych związków może zależeć od doboru właściwego modelu zwierzęcego PH, schematu badawczego – modelu prewencyjnego lub terapeutycznego, a w przypadku ilościowej syntezy wyników – miary efektu. W tym ostatnim przypadku sugeruje się, że zastosowanie w obliczeniach ilorazu różnic średnich (R) pozwala zmniejszyć obciążenie publikacyjne i heterogenność badań, a także ograniczyć wpływ samego modelu na wynikową ocenę efektywności potencjalnych leków w nadciśnieniu płucnym.

5. Wnioski

Hipoteza badawcza numer 1:

1. Modele zwierzęce nadciśnienia płucnego (PH) są zróżnicowane pod względem cech składowych: metody wywołania schorzenia – rodzaju, dawki i sposobu podania czynnika indukującego, czasu wywołania PH, gatunku zwierząt doświadczalnych.

Hipoteza badawcza numer 2:

2. Rozwój nadciśnienia płucnego determinują składowe modeli zwierzęcych PH: rodzaj i dawka czynnika indukującego schorzenie, czas trwania indukcji, gatunek zwierząt doświadczalnych,
3. Metody klasyczne w porównaniu do ich modyfikacji – metod alternatywnych, wywołują słabszą odpowiedź, wyrażoną pogorszeniem zmian hemodynamicznych (RVP, RVSP, mPAP) i przerostowych (RVH, WT), na działanie czynnika indukującego nadciśnienia płucne,
4. Wielkość dawki monokrotaliny w mniejszym stopniu determinuje rozwój schorzenia,
5. Wydłużenie czasu trwania indukcji nadciśnienia płucnego wpływa na pogorszenie ocenianych parametrów hemodynamicznych i przerostowych, z wyjątkiem metody opartej na ekspozycji na przewlekłe niedotlenienie, dla której wpływ ten może być mniej znaczący,
6. Gatunek zwierząt doświadczalnych w mniejszym stopniu determinuje rozwój nadciśnienia płucnego. Ekspozycja na przewlekłe niedotlenienie wywołuje słabszą odpowiedź u myszy niż u szczurów,
7. Rodzaj zastosowanego środka znieczulającego podczas badań hemodynamicznych może wpływać na wartości mierzonych parametrów.

Hipoteza badawcza numer 3:

8. Ocena efektywności leków/substancji zależy od miary efektu: różnicy średnich wartości (D) bądź ilorazu różnic średnich wartości (R) zastosowanej do ilościowej syntezy wyników,
9. Przyjęcie ilorazu różnic średnich wartości (R) za miarę efektu – skuteczności testowanych związków pozwala na zmniejszenie błędu publikacji i niejednorodności badań włączonych do dalszych analiz ilościowych,
10. Efektywność testowanych związków może zależeć od zastosowanego schematu badawczego (prewencyjny lub terapeutyczny),

11. Spośród związków należących do dziesięciu najliczniej przebadanych grup terapeutycznych/farmakologicznych największą efektywnością odznaczały się: iptakalim – z grupy aktywatorów kanałów potasowych ATP-zależnych; fasudil – inhibitor szlaku RhoA/ROCK, XNT i NSC-354317 – nowe aktywatory ACE2; oraz związki o działaniu przeciwzapalnym – nienasycone kwasy tłuszczowe n-3 i inhibitory NF- κ B. Związki te stanowią propozycję kandydatów do dalszych prób klinicznych

Brak „idealnego” modelu zwierzęcego nadciśnienia płucnego skłania do poszukiwań innych modeli badawczych, które zapewniłyby lepsze odwzorowanie przebiegu schorzenia u ludzi. Dotyczy to także udoskonalania metod i technik warsztatowych, które pozwalałyby na przeżyciową rejestrację parametrów u zwierząt, monitorowanie rozwoju PH, czy odpowiedzi na farmakoterapię. Z uwagi na zróżnicowanie modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego istnieje potrzeba standaryzacji oraz wdrożenia wytycznych, które byłyby pomocne we właściwym zaplanowaniu eksperymentów (np. wybór metod(y) indukcji, optymalnego czasu wywołania schorzenia z uwzględnieniem wpływu na przeżywalność, gatunku zwierząt doświadczalnych, czy klasyfikacji klinicznej PH stanowiącej przyszłe wskazanie do stosowania badanych związków). Może to przyczynić się do zwiększenia powtarzalności wyników otrzymywanych przez różnych badaczy. Inne korzyści dotyczyłyby poprawy trafności identyfikacji w badaniach przedklinicznych *in vivo* substancji o potencjalnym zastosowaniu w PH, do dalszej oceny w próbach klinicznych.

6. Streszczenie

Nadciśnienie płucne (PH) jest chorobą rzadką o ciężkim przebiegu i wieloczynnikowej etiologii, która nie została dotychczas w pełni zbadana. Pomimo znaczącego postępu w diagnostyce i terapii, PH jest obarczone wysoką śmiertelnością. Stosowana obecnie farmakoterapia swoista poprawia jakość życia chorych i wydłuża czas przeżycia, ale nie powoduje całkowitej normalizacji powstałych zmian hemodynamicznych i przerostowych w obrębie krążenia płucnego. Dlatego też poszukuje się nowych możliwości terapeutycznych. W tym celu wykorzystuje się m.in. badania przedkliniczne prowadzone na modelach zwierzęcych. Obecnie nie jest znany „idealny” model nadciśnienia płucnego, który całkowicie odzwierciedla przebieg schorzenia u ludzi. Sugeruje się, że znajomość czynników wpływających na rozwój i ciężkość PH oraz właściwy dobór modelu badawczego może determinować prawidłową ocenę skuteczności nowych związków – potencjalnych leków, i tym samym zwiększyć szanse na potwierdzenie wyników prób przedklinicznych w badaniach klinicznych.

Pierwszym celem niniejszej dysertacji była jakościowa i ilościowa analiza wpływu składowych wybranych modeli zwierzęcych PH na stopień rozwoju i ciężkość schorzenia. Ocenie poddano następujące cechy: metodę indukcji schorzenia (rodzaj, dawkę, sposób podania czynnika indukującego), czas trwania wywołania PH i gatunek zwierząt doświadczalnych. Przeanalizowano najczęściej stosowane i najlepiej poznane metody indukcji PH: model ekspozycji na przewlekłe niedotlenienie (hipoksję) (CH), model monokrotaliny (MCT) oraz ich modyfikacje oparte na Sugenie 5416, podaniu monokrotaliny w połączeniu z ekspozycją na przewlekłe niedotlenienie (MCT+CH) lub z usunięciem lewego płuca (LP+MCT), ekspozycję na przewlekłe niedotlenienie w połączeniu z hiperkapnią (CH+HC). Kolejnym celem niniejszej pracy była jakościowa i ilościowa analiza efektywności związków o potencjalnym działaniu terapeutycznym w PH, testowanych na zakwalifikowanych modelach. Sformułowano trzy hipotezy badawcze odnoszące się do zróżnicowania ocenianych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego, stopnia rozwoju i ciężkości wywołanych zmian hemodynamicznych i przerostowych oraz o możliwym wpływie zastosowanego modelu badawczego na wynikową efektywność ocenianych związków. Wpływ cech składowych na stopień rozwoju i ciężkość schorzenia oraz działanie nowych związków oceniono w odniesieniu do zmian (pogorszenie lub poprawa) parametrów hemodynamicznych i przerostowych, które najczęściej raportowano w badaniach eksperymentalnych z zakresu nadciśnienia płucnego. Były to: średnie i/lub skurczowe ciśnienie w prawej komorze serca (RVP, RVSP), średnie ciśnienie w tętnicy płucnej (mPAP), przerost mięśnia prawej komory serca (RVH) oraz przyrost ściany tętnic płucnych (WT).

Realizację celów badawczych przeprowadzono w oparciu o przegląd systematyczny artykułów opublikowanych od 1 stycznia 1995 roku do 31 grudnia 2015, w elektronicznych bazach danych – Medline i ISI Web of Science, wg przyjętych kryteriów włączenia i wyłączenia.

Ostatecznie zakwalifikowano 290 publikacji (611 interwencji). Na podstawie danych pozyskanych z włączonych badań, przeprowadzono analizy jednoczynnikowe i wieloczynnikowe, ze szczególnym uwzględnieniem meta-analizy, analizy skumulowanej, analizy w podgrupach, analizy niejednorodności i analizy wrażliwości oraz ocenę błędu publikacji.

Analizy przeprowadzone na potrzeby realizacji pierwszego celu pracy wykazały, że ocenione cechy składowe różnicują poszczególne modele oraz mogą determinować rozwój i ciężkość schorzenia. Jako miarę efektu zastosowano w obliczeniach różnicę średnich wartości parametrów (D) w grupie kontroli pozytywnej (zwierzęta otrzymujące placebo, u których wywołano PH) i grupie kontroli negatywnej (zwierzęta otrzymujące placebo, u których nie wywołano PH). Spośród analizowanych cech składowych największy wpływ na pogorszenie parametrów hemodynamicznych i zmian przerostowych odnotowano dla rodzaju metody indukcji oraz czasu wywołania PH. Większość zakwalifikowanych badań przeprowadzono stosując klasyczne metody indukcji – ekspozycję na przewlekłe niedotlenienie (CH) i model monokrotaliny (MCT). Uzyskane wyniki wskazały na mniejszy potencjał wywołania schorzenia w próbach eksperymentalnych, które przeprowadzono z zastosowaniem metod klasycznych w porównaniu do ich modyfikacji, tzw. metod alternatywnych. Wydłużenie czasu trwania indukcji nadciśnienia płucnego wywoływało bardziej znaczący rozwój PH. Pozostałe składowe modeli zwierzęcych, tj. wielkość dawki induktora – monokrotaliny i gatunek zwierząt doświadczalnych, w mniejszym stopniu wpłynęły na pogorszenie ocenianych parametrów. Wpływ różnic międzygatunkowych oceniono jedynie dla metody ekspozycji na przewlekłe niedotlenienie; tylko w odniesieniu do tego modelu badacze prowadzili eksperymenty z zastosowaniem dwóch gatunków zwierząt: szczurów i myszy. Uzyskane wyniki pokazały, że u szczurów ekspozycja na przewlekłą hipoksję wywołała mniejszy przyrost skurczowego ciśnienia w prawej komorze serca (RVSP) i grubości ściany tętnic płucnych (WT) oraz mniej znaczący przerost mięśnia prawej komory serca (RVH). Przeanalizowano również ewentualny wpływ środków znieczulających stosowanych podczas badań hemodynamicznych na wartości parametrów: skurczowego ciśnienia w prawej komorze serca i średniego ciśnienia w tętnicy płucnej. Ocenie poddano pięć substancji najczęściej wykorzystywanych w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych. Były to: pentobarbital sodu, izofluran, uretan, wodzian chlorału oraz połączenie ksylazyny i ketaminy. Analiza przyrostów wartości parametrów hemodynamicznych rejestrowanych u zwierząt z kontroli pozytywnej w porównaniu do zdrowych osobników pokazała znaczący wpływ na pogorszenie wymienionych parametrów, zwłaszcza w przypadku izofluranu.

W dalszej części pracy oceniono i porównano skuteczność 206 związków, które przyporządkowano do 26 grup terapeutycznych/farmakologicznych, wg przyjętej w pracy klasyfikacji [168]. Jako miarę efektu – skuteczności badanych leków/substancji, oprócz różnicy średnich wartości (D), zastosowano iloraz różnic średnich (R). Powyższa miara efektu opierała się nie tylko na obserwowanej różnicy średnich wartości danego parametru w grupie kontroli pozytywnej i interwencji lekowej, ale uwzględniała także stopień wywoływania nadciśnienia

płucnego. Taka modyfikacja miary efektu była wynikiem znacznych rozbieżności w wartościach raportowanych parametrów hemodynamicznych i przerostowych, w zależności od zastosowanej metody indukcji PH. Jej zastosowanie pozwoliło na zmniejszenie błędu publikacji i niejednorodności badań. W rankingach sporządzonych w oparciu o miarę efektu (R) odnotowano również mniejszy rozrzut uzyskanych wyników w porównaniu do różnicy średnich wartości (D). Dlatego też iloraz różnic średnich (R) wykorzystano do dalszych szczegółowych obliczeń.

Przeprowadzone analizy pokazały, że efektywność testowanych związków może również zależeć od wyboru schematu badawczego. W zakwalifikowanych badaniach oceniane substancje podawano w schemacie prewencyjnym – w celu zapobiegania zmianom związanych z indukcją nadciśnienia płucnego lub terapeutycznym – w celu redukcji wywołanych zmian. Przeprowadzone analizy wskazały na większy potencjał związków - kandydatów do dalszych prób klinicznych, jeżeli były one badane z wykorzystaniem schematu prewencyjnego.

Do dalszych szczegółowych analiz zakwalifikowano dziesięć najczęściej badanych grup terapeutycznych/farmakologicznych. Były to: aktywatory kanałów potasowych ATP-zależnych, inhibitory szlaku RhoA/ROCK, inhibitory kinaz serynowo-treoninowych (Ser-Thr)/kinaz tyrozynowych (TKI), statyny, inhibitory szlaku przemian serotoniny, pochodne estrogeny i agonisty receptorów estrogenowych, regulatory układu RAAS, związki o działaniu antyremodelingowym, związki o działaniu przeciwzapalnym oraz związki pochodzenia roślinnego. Spośród wymienionych grup największą efektywność w odniesieniu do poprawy ocenianych zmian hemodynamicznych i przerostowych wykazały: iptakalim – z grupy aktywatorów kanałów potasowych ATP-zależnych; fasudil – inhibitor szlaku RhoA/ROCK, XNT i NSC-354317 – nowe aktywatory ACE2; oraz związki o działaniu przeciwzapalnym – nienasycone kwasy tłuszczowe n-3 i inhibitory NF- κ B. Związki te mogą stanowić propozycje kandydatów do dalszych prób klinicznych.

Modele zwierzęce nadciśnienia płucnego są zróżnicowane pod względem cech składowych, które mogą determinować rozwój i ciężkość schorzenia. Znajomość wpływu poszczególnych składowych jest istotna w prawidłowym zaplanowaniu eksperymentu badawczego. Może to przyczynić się do właściwej oceny efektywności testowanych związków w próbach przedklinicznych i zwiększyć szanse na powtórzenie uzyskanych wyników w badaniach klinicznych. Różnorodność modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego skłania do wdrożenia wytycznych, które określą zasady i warunki prowadzenia prób eksperymentalnych w zakresie PH.

7. Abstract

Pulmonary hypertension (PH) is a multi-factorial, rare disorder with a severe course. Despite significant progress in diagnosis and therapy, PH remains a disease with high mortality rate. Current pharmacotherapy improves quality of life and prolongs longevity, but does not completely reverse pathological and haemodynamic changes. Preclinical trials are needed, including those on animal models; however, no ideal animal model fully reflects the human form of PH. In addition, the choice of animal model can influence the findings, and hence the drugs used as candidates for further evaluation in later clinical studies.

The aim of the study was to evaluate several variables which can determine the development and severity of PH in animal models, such as method of PH induction (type, dosage, route of administration of inductor), induction time and animal species. The most popular animal models of PH were included: chronic hypoxia (CH), monocrotaline (MCT) and their modifications: the Sugen 5416 model, combined monocrotaline and chronic hypoxia (MCT+CH), left pneumonectomy with monocrotaline (LP+MCT), and chronic hypoxia with hypercapnia (CH+HC). The most commonly-examined parameters in preclinical trials were studied: mean/systolic pressure in right ventricle (RVP/RVSP), mean arterial pressure (mPAP), right ventricle hypertrophy (RVH) and wall thickness of pulmonary arteries (WT). It also compares the efficacy of potential agents tested in animal PH models classified for publication.

A systemic review was performed of a number of experimental studies of PH. The search corpus comprised selected articles from Medline and ISI Web of Science, from 1 January 1991 to 31 December 2015. In total, 290 articles were included. In order to estimate the overall effect size, single-factor and multifactorial analyses were performed, such as meta-analysis with evaluation of heterogeneity, sensitivity, cumulative analysis, subgroup analysis, meta-regression and publication bias.

Animal models of PH vary with regard to PH development and severity. The type of induction method and time to develop PH appear to most significantly determine the worsening of disease. The effect size was expressed as difference in means (D) between vehicle and treated animal groups. Most preclinical experiments were based on classic models, i.e. chronic hypoxia and monocrotaline, which provoke a poorer response than newer modifications. Longer PH induction periods significantly worsen the studied parameters; however, monocrotaline dose and inter-species differences appear to have a less significant impact on elevation in hemodynamic and pathological parameters. Regarding inter-species differences, less pronounced right ventricle systolic pressure, right ventricle hypertrophy and pulmonary artery wall thickness were observed in rats than mice in a chronic hypoxia model.

Regarding the association between choice of anaesthetic agent and haemodynamic parameters, the most commonly-used agents were pentobarbital sodium, isoflurane, urethane, chloral hydrate and combined xylazine with ketamine. Further analysis found isoflurane to induce the greatest worsening in right ventricle systolic pressure and mean arterial pressure, while chloral hydrate demonstrated the mildest effect.

A total number of 206 substances, classified into 26 groups, were analysed [168]. The efficacy of particular agents was evaluated and expressed as difference in means (D) and response ratio (R). The results were dependent on the effect size of D or R. The response ratio decreased publication bias and studies heterogeneity. The agents were assessed as potentially effective drugs according to preventive or therapeutic efficacy. The substances used in preventive models were found to improve PH parameters more significantly than those in therapeutic regimens.

The following 10 most frequently examined groups were chosen for more detailed analysis: anti-inflammatories, anti-remodelling agents, ATP-sensitive potassium channel openers, estrogen derivatives/receptor agonists, HMG-CoA reductase inhibitors (statins), plant-derived compounds, RAAS regulators, Rho/ROCK inhibitors, Ser-Thr protein/tyrosine kinases inhibitors and serotonin pathway agents. The agents that demonstrated the greatest improvements on haemodynamic and pathologic parameters were iptakalim (an ATP-sensitive potassium channel opener), fasudil (a Rho/ROCK inhibitor), XNT and NSC-354317 (novel ACE2 activators, anti-inflammatories), *n*-3 polyunsaturated fatty acids and NF- κ B inhibitors. These may be considered as potential candidates for further clinical trials.

Animal models of PH differ greatly, and these differences can result in a weaker or stronger response, manifested as poorer haemodynamic or pathological parameters. The selection of an appropriate test model can determine the success of a preclinical experiment, and the proper evaluation of a new agent. It can also increase the chances that the obtained results will be repeated in clinical trials.

8. Wykaz rycin

Rycina 1. Leki swoiste stosowane w terapii tętniczego nadciśnienia płucnego przedstawione chronologicznie wg daty dopuszczenia na rynek farmaceutyczny przez FDA	22
Rycina 2. Schemat badania.....	48
Rycina 3. Schemat wyszukiwania, identyfikacji i selekcji artykułów	59
Rycina 4. Klasyczne i alternatywne modele zwierzące nadciśnienia płucnego stosowane w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych.....	62
Rycina 5. Kategorie czasu trwania indukcji nadciśnienia płucnego w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych.....	63
Rycina 6. Przykłady schematów badawczych zastosowanych w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych: a) i b) model prewencyjny, c) model terapeutyczny	68
Rycina 7. Rodzaje schematów badawczych zastosowanych w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych.....	69
Rycina 8. Oceniane parametry hemodynamiczne i zmiany przerostowe w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych.....	70
Rycina 9. Środki znieczulające zastosowane podczas badań hemodynamicznych w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych.....	71
Rycina 10. Wpływ metod indukcji nadciśnienia płucnego na pogorszenie parametrów: a) RVSP, b) mPAP, c) RVH, d) WT.....	74
Rycina 11. Wpływ czasu trwania indukcji nadciśnienia płucnego na pogorszenie parametrów: a) RVSP, b) mPAP, c) RVH, d) WT.....	76
Rycina 12. Wykresy lejkowe (model z efektem zmiennym; 95% PU) z wynikami metody <i>Trim and Fill</i> dla parametrów: a) RVP, b) RVSP, c) mPAP, d) RVH, e) WT. Mierzony efekt łączny wyrażono jako D (różnica średnich)	82
Rycina 13. Meta-regresja zależności pomiędzy czasem trwania indukcji PH a efektem łącznym (D), z uwzględnieniem rodzaju modelu indukcji PH dla parametrów: a) RVSP, b) RVP, c) mPAP, d) RVH.....	85
Rycina 14. Wpływ czasu trwania indukcji nadciśnienia płucnego na pogorszenie parametrów: a) RVSP, b) mPAP, c) RVH dla modelu MCT.....	86
Rycina 15. Wpływ czasu trwania indukcji nadciśnienia płucnego na pogorszenie parametrów: a) RVSP, b) mPAP, c) RVH dla modelu CH.....	87
Rycina 16. Wpływ zastosowanego schematu badawczego (prewencyjnego, terapeutycznego) na pogorszenie ocenianych parametrów hemodynamicznych i zmian przerostowych.....	89
Rycina 17. Efektywność ocenianych grup terapeutycznych/farmakologicznych (wg przyjętej w pracy klasyfikacji [168]) dla parametrów: a) RVSP, b) mPAP, c) RVH, d) WT. Mierzony efekt łączny wyrażony jako różnica średnich (D)	92

Rycina 18. Efektywność ocenianych związków i grup terapeutycznych/farmakologicznych (wg przyjętej w pracy klasyfikacji [168]) dla parametrów: a) RVSP, b) mPAP, c) RVH, d) WT. Mierzony efekt łączny wyrażony jako iloraz różnic średnich (R)	95
Rycina 19. Efektywność związków zakwalifikowanych do dziesięciu najczęściej badanych grup terapeutycznych/farmakologicznych. (wg przyjętej w pracy klasyfikacji [168]) dla parametrów: a) RVSP, b) mPAP, c) RVH, d) WT	106
Rycina 20. Efektywność wybranych związków z wykorzystaniem różnych modeli zwierzęcych PH w odniesieniu do parametru RVSP	107
Rycina 21. Wykresy lejkowe (model z efektem zmiennym; 95% PU) z wynikami metody <i>Trim and Fill</i> dla parametrów: a) RVSP, b) mPAP, c) RVH, d) WT. Mierzony efekt łączny wyrażono jako D (różnica średnich).....	110
Rycina 22. Wykresy lejkowe (model z efektem zmiennym; 95% PU) z wynikami metody <i>Trim and Fill</i> dla parametrów: a) RVSP, b) mPAP, c) RVH, d) WT. Mierzony efekt łączny wyrażono jako R (iloraz różnic średnich).....	112

9. Wykaz tabel

Tabela 1. Skrócona klasyfikacja kliniczna nadciśnienia płucnego.....	16
Tabela 2. Chorobowość tętniczego nadciśnienia płucnego w Polsce.....	17
Tabela 3. Klasyfikacja czynnościowa w nadciśnieniu płucnym, zmodyfikowana na podstawie klasyfikacji czynnościowej NYHA zgodnie z klasyfikacją WHO z 1998 roku	18
Tabela 4. Leki/substancje przydzielone do dziesięciu najczęściej badanych grup terapeutycznych/farmakologicznych (wg przyjętej w pracy klasyfikacji [168]) w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych.....	65
Tabela 5. Wpływ wybranych metod indukcji nadciśnienia płucnego na rozwój schorzenia	73
Tabela 6. Wpływ środka znieczulającego zastosowanego podczas badań hemodynamicznych na rozwój nadciśnienia płucnego w zależności od składowych modelu zwierzęcego PH: czasu trwania i metody indukcji PH	77
Tabela 7. Analiza wrażliwości przeprowadzona dla interwencji opisujących modele zwierzęce nadciśnienia płucnego, zastosowane w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych. Efekt łączny wyrażony jako różnica średnich (D) (model z efektem zmiennym)	79
Tabela 8. Analiza wrażliwości przeprowadzona dla interwencji opisujących efektywność ocenianych związków w terapii nadciśnienia płucnego. Efekt łączny wyrażony jako iloraz różnic średnich (R) (model z efektem zmiennym).....	108

10. Bibliografia

1. Abe K, Shinoda M, Tanaka M, Kuwabara Y, Yoshida K, Hirooka Y, McMurtry IF, Oka M, Sunagawa K. *Haemodynamic unloading reverses occlusive vascular lesions in severe pulmonary hypertension*. Cardiovasc Res, 2016; 111: 16–25
2. Abenhaim L, Moride Y, Brenot F, Rich S, Benichou J, Kurz X, Higenbottam T, Oakley C, Wouters E, Aubier M, Simonneau G, Begaud B. *Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension*. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group. N Engl J Med, 1996; 335: 609–616
3. Aggarwal S, Gross CM, Sharma S, Fineman JR, Black SM. *Reactive oxygen species in pulmonary vascular remodeling*. Compr Physiol, 2013; 3: 1011–1034
4. Albrecht M, Henke J, Tacke S, Markert M, Guth B. *Influence of repeated anaesthesia on physiological parameters in male Wistar rats: a telemetric study about isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl*. BMC Vet Res, 2014; 10: 310
5. Alencar AKN, Montes GC, Barreiro EJ, Sudo RT, Zapata-Sudo G. *Adenosine Receptors As Drug Targets for Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension*. Front Pharmacol, 2017; 8: 858
6. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. *Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine*. Genes Dev, 2008; 22: 1276–1312
7. Archer SL, Marsboom G, Kim GH, Zhang HJ, Toth PT, Svensson EC, Dyck JRB, Gombert-Maitland M, Thébaud B, Husain AN, Cipriani N, Rehman J. *Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target*. Circulation, 2010; 121: 2661–267
8. Augustine S, Avey MT, Harrison B, Locke T, Ghannad M, Moher D, Thébaud B. *Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Bronchopulmonary Dysplasia: Systematic Review and Meta-Analysis of Preclinical Studies*. Stem Cells Transl Med, 2017; 6: 2079–2093
9. Baker WL, White CM, Cappelleri JC, Kluger J, Coleman CI, Health Outcomes, Policy, and Economics (HOPE) Collaborative Group. *Understanding heterogeneity in meta-analysis: the role of meta-regression*. Int J Clin Pract, 2009; 63: 1426–1434
10. Baranowska M, Kozłowska H, Korbut A, Malinowska B. *Kanały potasowe w naczyniach krwionośnych ich znaczenie w fizjologii i patologii*. Postepy Hig Med Dosw, 2007; 61: 596–605
11. Barman SA, Zhu S, White RE. *RhoA/Rho-kinase signaling: a therapeutic target in pulmonary hypertension*. Vasc Health Risk Manag, 2009; 5: 663–671
12. Barnes H, Yeoh HL, Fothergill T, Burns A, Humbert M, Williams T. *Prostacyclin for pulmonary arterial hypertension*. Cochrane Database Syst Rev, 2019; 5: CD012785
13. Baron RM, Choi AJ, Owen CA, Choi AM. *Genetically manipulated mouse models of lung disease: potential and pitfalls*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012; 302: L485–L497
14. Batton KA, Austin CO, Bruno KA, Burger CD, Shapiro BP, Fairweather D. *Sex differences in pulmonary arterial hypertension: role of infection and autoimmunity in the pathogenesis of disease*. Biol Sex Differ, 2018; 9: 15
15. Bauer NR, Moore TM, McMurtry IF. *Rodent models of PAH: are we there yet?* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007; 293: L580–L582
16. Bedan M, Grimm D, Wehland M, Simonsen U, Infanger M, Krüger M. *A Focus on Macitentan in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2018; 123: 103–113
17. Begg CB, Mazumdar M. *Operating characteristics of a rank correlation test for publication bias*. Biometrics, 1994; 50: 1088–1101
18. Berger M, Gray JA, Roth BL. *The expanded biology of serotonin*. Annu Rev Med, 2009; 60: 355–366

19. Berkey CS, Hoaglin DC, Mosteller F, Colditz GA. *A random-effects regression model for meta-analysis*. Stat Med, 1995; 14: 395–411
20. Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thébaud B, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, Weir EK, Archer SL. *An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension*. Circulation, 2006; 113: 2630–2641
21. Boucherat O, Chabot S, Antigny F, Perros F, Provencher S, Bonnet S. *Potassium channels in pulmonary arterial hypertension*. Eur Respir J, 2015; 46: 1167–1177
22. Bradford CN, Ely DR, Raizada MK. *Targeting the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system: a novel strategic approach to pulmonary hypertensive therapy*. Curr Hypertens Rep, 2010; 12: 212–219
23. Buckley MS, Staib RL, Wicks LM, Feldman JP. *Phosphodiesterase-5 inhibitors in management of pulmonary hypertension: safety, tolerability, and efficacy*. Drug Healthc Patient Saf, 2010; 2: 151–161
24. Burks M, Stickel S, Galiè N. *Pulmonary Arterial Hypertension: Combination Therapy in Practice*. Am J Cardiovasc Drugs, 2018; 18: 249–257
25. Carman BL, Predescu DN, Machado R, Predescu SA. *Plexiform Arteriopathy in Rodent Models of Pulmonary Arterial Hypertension*. Am J Pathol, 2019; 189: 1133–1144
26. Casserly B, Klinger JR. *Brain natriuretic peptide in pulmonary arterial hypertension: biomarker and potential therapeutic agent*. Drug Des Dev Ther, 2009; 3: 269–287
27. Charakterystyka Produktu Leczniczego Adempas:
https://ec.europa.eu/health/documents/communityregister/2014/20140327128191/anx_128191_pl.pdf (dostęp: 05.05.2020)
28. Charakterystyka Produktu Leczniczego Opsumit:
https://ec.europa.eu/health/documents/communityregister/2017/20170717138517/anx_138517_pl.pdf (dostęp: 05.05.2020)
29. Charakterystyka Produktu Leczniczego Remodulin:
https://ec.europa.eu/health/documents/communityregister/2004/200407067796/anx_7796_pl.pdf (dostęp: 05.05.2020)
30. Charakterystyka Produktu Leczniczego Revatio:
https://ec.europa.eu/health/documents/communityregister/2011/2011012194116/anx_94116_pl.pdf
31. Charakterystyka Produktu Leczniczego Tracleer:
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tracleer-epar-product-information_pl.pdf (dostęp: 05.05.2020)
32. Charakterystyka Produktu Leczniczego Uptravi:
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/uptravi-epar-product-information_pl.pdf (dostęp: 05.05.2020)
33. Charakterystyka Produktu Leczniczego Veletri:
https://ec.europa.eu/health/documents/communityregister/2004/200407067796/anx_7796_pl.pdf (dostęp: 05.05.2020)
34. Charakterystyka Produktu Leczniczego Ventavis:
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ventavis-epar-product-information_pl.pdf (dostęp: 05.05.2020)
35. Charakterystyka Produktu Leczniczego Volibris:
https://ec.europa.eu/health/documents/communityregister/2016/20161027136321/anx_136321_pl.pdf (dostęp: 05.05.2020)
36. Chaszczewska-Markowska M, Sagan M, Bogunia-Kubik K. *Układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) – fizjologia i molekularne mechanizmy funkcjonowania*. Postepy Hig Med Dosw, 2016; 70: 917–927

37. Chelladurai P, Seeger W, Pullamsetti SS. *Epigenetic mechanisms in pulmonary arterial hypertension: the need for global perspectives*. Eur Respir Rev, 2016; 25: 135–140
38. Chen F, Li X, Aquadro E, Haigh S, Zhou J, Stepp DW, Weintraub NL, Barman SA, Fulton DJR. *Inhibition of histone deacetylase reduces transcription of NADPH oxidases and ROS production and ameliorates pulmonary arterial hypertension*. Free Radic Biol Med, 2016; 99: 167–178
39. Chester AH, Yacoub MH, Moncada S. *Nitric oxide and pulmonary arterial hypertension*. Glob Cardiol Sci Pract, 2017; 2017: 14
40. Chester AH, Yacoub MH. *The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension*. Glob Cardiol Sci Pract, 2014; 2014: 62–78
41. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves B, Loyd JE. *An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension*. N Engl J Med, 1992; 327: 70–75
42. Christou H, Hudalla H, Michael Z, Filatava EJ, Li J, Zhu M, Possomato-Vieira JS, Dias-Junior C, Kourembanas S, Khalil RA. *Impaired Pulmonary Arterial Vasoconstriction and Nitric Oxide-Mediated Relaxation Underlie Severe Pulmonary Hypertension in the Sugen-Hypoxia Rat Model*. J Pharmacol Exp Ther, 2018; 364: 258–274
43. Chung HH, Dai ZK, Wu BN, Yeh JL, Chai CY, Chu KS, Liu CP, Chen IJ. *The xanthine derivative KMUP-1 inhibits models of pulmonary artery hypertension via increased NO and cGMP-dependent inhibition of RhoA/Rho kinase*. Br J Pharmacol, 2010; 160: 971–986
44. Claessen G, La Gerche A, Wielandts JY, Bogaert J, Van Cleemput J, Wuyts W, Claus P, Delcroix M, Heidbuchel H. *Exercise pathophysiology and sildenafil effects in chronic thromboembolic pulmonary hypertension*. Heart, 2015; 101: 637–644
45. Colvin KL, Yeager ME. *Animal models of pulmonary hypertension: matching disease mechanisms to etiology of the human disease*. J Pulm Respir Med, 2014; 4: 198
46. Connolly MJ, Aaronson PI. *Key role of the RhoA/Rho kinase system in pulmonary hypertension*. Pulm Pharmacol Ther, 2011; 24: 1–14
47. Das M, Fessel J, Tang H, West J. *A process-based review of mouse models of pulmonary hypertension*. Pulm Circ, 2012; 2: 415–433
48. de Bourcy CFA, Dekker CL, Davis MM, Nicolls MR, Quake SR. *Dynamics of the human antibody repertoire after B cell depletion in systemic sclerosis*. Sci Immunol, 2017; 2: eaan8289
49. Del Pozo R, Hernandez Gonzalez I, Escribano-Subias P. *The prostacyclin pathway in pulmonary arterial hypertension: a clinical review*. Expert Rev Respir Med, 2017; 11: 491–503
50. Dernaika TA, Beavin M, Kinasewitz GT. *Iloprost improves gas exchange and exercise tolerance in patients with pulmonary hypertension and chronic obstructive pulmonary disease*. Respiration, 2010; 79: 377–382
51. DerSimonian R, Laird N. *Meta-analysis in clinical trials*. Control Clin Trials, 1986; 7: 177–188
52. Dhaun N, Webb DJ. *Endothelins in cardiovascular biology and therapeutics*. Nat Rev Cardiol, 2019; 16: 491–502
53. Duggan ST, Keam SJ, Burness CB. *Selexipag: A Review in Pulmonary Arterial Hypertension*. Am J Cardiovasc Drugs, 2017; 17: 73–80
54. Dumitrascu R, Kulcke C, Königshoff M, Kouri F, Yang X, Morrell N, Ghofrani HA, Weissmann N, Reiter R, Seeger W, Grimminger F, Eickelberg O, Schermuly RT, Pullamsetti SS. *Terguride ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. Eur Respir J, 2011; 37: 1104–1118
55. Duval S, Tweedie R. *Trim and fill: A simple funnel-plot-based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis*. Biometrics, 2000; 56: 455–463
56. Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur AM, Dewachter L, Fadel E, Darteville P, Humbert M, Simonneau G, Hanoun N, Saurini F, Hamon M, Adnot S. *Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia*. Circulation, 2006; 113: 1857–1864

57. Egermayer P, Town GI, Peacock AJ. *Role of serotonin in the pathogenesis of acute and chronic pulmonary hypertension*. Thorax, 1999; 54: 161–168
58. Egger M, Smith GD, Schneider M, Minder C. *Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test*. BMJ, 1997; 315: 629–634
59. Emukah C, Dittmar E, Naqvi R, Martinez J, Corral A, Moreira A. *Mesenchymal stromal cell conditioned media for lung disease: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies*. Respir Res, 2019; 20: 239
60. Evans CE, Zhao YY. *Molecular Basis of Nitritative Stress in the Pathogenesis of Pulmonary Hypertension*. Adv Exp Med Biol, 2017; 967: 33–45
61. Farber HW, Gin-Sing W. *Practical considerations for therapies targeting the prostacyclin pathway*. Eur Respir Rev, 2016; 25: 418–430
62. Faul JL, Nishimura T, Berry GJ, Benson GV, Pearl RG, Kao PN. *Triptolide attenuates pulmonary arterial hypertension and neointimal formation in rats*. Am J Respir Crit Care Med, 2000; 162: 2252–2258
63. Frazziano G, Al Ghouleh I, Baust J, Shiva S, Champion HC, Pagano PJ. *Nox-derived ROS are acutely activated in pressure overload pulmonary hypertension: indications for a seminal role for mitochondrial Nox 4*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014; 306: H197–H205
64. Frump AL, Goss KN, Vayl A, Albrecht M, Fisher A, Tursunova R, Fierst J, Whitson J, Cucci AR, Brown MB, Lahm T. *Estradiol improves right ventricular function in rats with severe angioproliferative pulmonary hypertension: effects of endogenous and exogenous sex hormones*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015; 308: L873–L890
65. Fukumoto Y, Yamada N, Matsubara H, Mizoguchi M, Uchino K, Yao A, Kihara Y, Kawano M, Watanabe H, Takeda Y, Adachi T, Osanai S, Tanabe N, Inoue T, Kubo A, Ota Y, Fukuda K, Nakano T, Shimokawa H. *Double-blind, placebo-controlled clinical trial with a rho-kinase inhibitor in pulmonary arterial hypertension*. Circ J, 2013; 77: 2619–2625
66. Fulton DJR, Li X, Bordan Z, Haigh S, Bentley A, Chen F, Barman SA. *Reactive Oxygen and Nitrogen Species in the Development of Pulmonary Hypertension*. Antioxidants, 2017; 6: 54
67. Galiè N, Corris PA, Frost A, Girgis RE, Granton J, Jing ZC, Klepetko W, McGoon MD, McLaughlin VV, Preston IR, Rubin LJ, Sandoval J, Seeger W, Keogh A. *Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2013; 62: D60–D72
68. Galiè N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock AL, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G. *Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension*. Eur Respir J, 2009; 34: 1219–1263
69. Galiè N, Humbert M, Vachiery J, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez M, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M. *2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension*. Kardiol Pol, 2015; 73: 1127–1206
70. Galiè N, Manes A, Negro L, Palazzini M, Bacchi-Reggiani ML, Branzi A. *A meta-analysis of randomized controlled trials in pulmonary arterial hypertension*. Eur Heart J, 2009; 30: 394–403
71. Ghofrani HA, Morrell NW, Hoeper MM, Olschewski H, Peacock AJ, Barst RJ, Shapiro S, Golpon H, Toshner M, Grimminger F, Pascoe S. *Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy*. Am J Respir Crit Care Med, 2010; 182: 1171–1177
72. Goerne H, Batra K, Rajiah P. *Imaging of pulmonary hypertension: an update*. Cardiovasc Diagn Ther, 2018; 8: 279–296
73. Gombert-Maitland M, Bull TM, Saggat R, Barst RJ, Elgazayerly A, Fleming TR, Grimminger F, Rainisio M, Stewart DJ, Stock-bridge N, Ventura C, Ghofrani AH, Rubin LJ. *New trial designs and potential therapies for pulmonary artery hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2013; 62: D82–D91

74. Gomez-Arroyo J, Saleem SJ, Mizuno S, Syed AA, Bogaard HJ, Abbate A, Taraseviciene-Stewart L, Sung Y, Kraskauskas D, Farkas D, Conrad DH, Nicolls MR, Voelkel NF. *A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012; 302: L977–L991
75. Gomez-Arroyo J, Sandoval J, Simon MA, Dominguez-Cano E, Voelkel NF, Bogaard HJ. *Treatment for pulmonary arterial hypertension-associated right ventricular dysfunction*. Ann Am Thorac Soc, 2014; 11: 1101–1115
76. Grieco P, Gomez-Monterrey I. *Natural and synthetic peptides in the cardiovascular diseases: An update on diagnostic and therapeutic potentials*. Arch Biochem Biophys, 2019; 662: 15–32
77. Groth A, Vrugt B, Brock M, Speich R, Ulrich S, Huber LC. *Inflammatory cytokines in pulmonary hypertension*. Respir Res, 2014; 15: 47
78. Grundy JS, King CD, Adams JW, Cabell CH. *Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the selective prostacyclin receptor agonist ralinepag in single and multiple dosing studies of an immediate-release oral formulation in healthy volunteers*. Pulm Circ, 2020; 10: 2045894020922814
79. Guignabert C, Dorfmüller P. *Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension*. Semin Respir Crit Care Med, 2013; 34: 551–559
80. Hahn SS, Makaryus M, Talwar A, Narasimhan M, Zaidi G. *A review of therapeutic agents for the management of pulmonary arterial hypertension*. Ther Adv Respir Dis, 2017; 11: 46–63
81. Happé CM, de Raaf MA, Rol N, Schalij I, Vonk-Noordegraaf A, Westerhof N, Voelkel NF, de Man FS, Bogaard HJ. *Pneumonectomy combined with SU5416 induces severe pulmonary hypertension in rats*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016; 310: L1088–L1097
82. Hardin EA, Chin KM. *Selexipag in the treatment of pulmonary arterial hypertension: design, development, and therapy*. Drug Des Devel Ther, 2016; 10: 3747–3754
83. Hartmann S, Ridley AJ, Lutz S. *The Function of Rho-Associated Kinases ROCK1 and ROCK2 in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease*. Front Pharmacol, 2015; 6: 276
84. Hernández-Sánchez J, Harlow L, Church C, Gaine S, Knightbridge E, Bunclark K, Gor D, Bedding A, Morrell N, Corris P, Toshner M. *Clinical trial protocol for TRANSFORM-UK: A therapeutic open-label study of tocilizumab in the treatment of pulmonary arterial hypertension*. Pulm Circ, 2018; 8: 2045893217735820
85. Hironaka E, Hongo M, Sakai A, Mawatari E, Terasawa F, Okumura N, Yamazaki A, Ushiyama Y, Yazaki Y, Kinoshita O. *Serotonin receptor antagonist inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension and prolongs survival in rats*. Cardiovasc Res, 2003; 60: 692–699
86. Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyrna M, Langleben D, Manes A, Satoh T, Torres F, Wilkins MR, Badesch DB. *Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2013; 62: D42–D50
87. Hoeper MM, Ghofrani HA, Klose EGH, Olschewski H, Rosenkranz S. *Pulmonary Hypertension*. Dtsch Arztebl Int, 2017; 114: 73–84
88. Hojka A, Rapak A. *Receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów (PPAR). Właściwości antyproliferacyjne*. Postepy Hig Med Dosw, 2011; 65: 404–413
89. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02279160?term=ralinepag&draw=2&rank=6> (dostęp: 01.09.2020)
90. <http://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/DocDetails.xsp?id=WDU20150000266>
91. Hu J, Xu Q, McTiernan C, Lai YC, Osei-Hwedieh D, Gladwin M. *Novel Targets of Drug Treatment for Pulmonary Hypertension*. Am J Cardiovasc Drugs, 2015; 15: 225–234
92. Humbert M, Montani D, Perros F, Dorfmüller P, Adnot S, Eddahibi S. *Endothelial cell dysfunction and cross talk between endothelium and smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension*. Vascu Pharmacol, 2008; 49: 113–118
93. Iglarz M, Steiner P, Wanner D, Rey M, Hess P, Clozel M. *Vascular Effects of Endothelin Receptor Antagonists Depends on Their Selectivity for ETA Versus ETB Receptors and on the Functionality of Endothelial ETB Receptors*. J Cardiovasc Pharmacol, 2015; 66: 332–337

94. Janssen BJ, De Celle T, Debets JJ, Brouns AE, Callahan MF, Smith TL. *Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004; 287: H1618–H1624
95. Jasińska-Stroschein M, Orszulak-Michalak D. *Nowe strategie w farmakoterapii tętniczego nadciśnienia płucnego*. Postepy Hig Med Dos, 2017; 71: 577–588
96. Jasińska-Stroschein M, Orszulak-Michalak D. *The current approach into signaling pathways in pulmonary arterial hypertension and their implication in novel therapeutic strategies*. Pharmacol Rep, 2014; 66: 552–564
97. Jasińska-Stroschein M, Sztuka K, Orszulak-Michalak D. *Current issues in etiology, diagnostics and management in pulmonary hypertension*. Wiad Lek, 2017; 70: 386–394
98. Jiang B, Deng Y, Suen C, Taha M, Chaudhary KR, Courtman DW, Stewart DJ. *Marked strain-specific differences in the SU5416 rat model of severe pulmonary arterial hypertension*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2016; 54: 461–468
99. Kanaan R, Strange C. *Use of multitarget tyrosine kinase inhibitors to attenuate platelet-derived growth factor signalling in lung disease*. Eur Respir Rev, 2017; 26: 170061
100. Kanda T, Hayashi K, Wakino S, Homma K, Yoshioka K, Hasegawa K, Sugano N, Tatematsu S, Takamatsu I, Mitsuhashi T, Saruta T. *Role of Rho-kinase and p27 in angiotensin II-induced vascular injury*. Hypertension, 2005; 45: 724–729
101. Katsiki N, Wierzbicki AS, Mikhailidis DP. *Pulmonary arterial hypertension and statins: an update*. Curr Opin Cardiol, 2011; 26: 322–326
102. Kawut SM, Bagiella E, Lederer DJ, Shimbo D, Horn EM, Roberts KE, Hill NS, Barr RG, Rosenzweig EB, Post W, Tracy RP, Palevsky HI, Hassoun PM, Girgis RE. *Randomized clinical trial of aspirin and simvastatin for pulmonary arterial hypertension: ASA-STAT*. Circulation, 2011; 123: 2985–2993
103. Kazimierczyk R, Kamiński KA. *Przewlekłe zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne – diagnostyka i nowe możliwości terapii farmakologicznej w świetle wytycznych ESC/ERS 2015*. Folia Cardiologica, 2016; 11: 394–400
104. Klinger JR, Kadowitz PJ. *The Nitric Oxide Pathway in Pulmonary Vascular Disease*. Am J Cardiol, 2017; 120: S71–S79
105. Kłozka M, Baranowska-Kuczek M, Pędzińska-Betiuk A, Jackowski K, Kozłowska H. *Teoria serotoninowa a tętnicze nadciśnienie płucne*. Postepy Hig Med Dosw, 2014; 68: 738–748
106. Kojonazarov B, Myrzaakhmatova A, Sooronbaev T, Ishizaki T, Aldashev A. *Effects of fasudil in patients with high-altitude pulmonary hypertension*. Eur Respir J, 2012; 39: 496–498
107. Konopka M, Braksator W. *Nadciśnienie płucne – postępy w diagnostyce i leczeniu*. Fam Med Primary Care Rev, 2013; 15: 561–566
108. Konopska B, Gołąb K, Juszczynska K, Gburek J. *Albuminowe nanosystemy w medycynie*. Postepy Hig Med Dosw, 2018; 72: 1004–1017
109. Koop AC, Bossers GPL, Ploegstra MJ, Hagdorn QAJ, Berger RMF, Silljé HHW, Bartelds B. *Metabolic Remodeling in the Pressure-Loaded Right Ventricle: Shifts in Glucose and Fatty Acid Metabolism-A Systematic Review and Meta-Analysis*. J Am Heart Assoc, 2019; 8: e012086
110. Kopeć G, Kurzyńska M, Mroczek E, Chrzanowski Ł, Mularek-Kubzdela T, Skoczylas I, Kuśmierczyk B, Pruszyński P, Błaszczak P, Lewicka E, Karasek D, Mizia-Stec K, Tomaszewski M, Jacheć W, Ptaszyńska-Kopczyńska K, Peregud-Pogorzelska M, Doboszyńska A, Pawlak A, Gąsior Z, Zabłocka W, Ryczek R, Widejko-Pietkiewicz K, Waligóra M, Darocha S, Furdal M, Ciurzyński M, Kasprzak JD, Grabka M, Kwiatkowska J, Kamiński K, Hoffman P, Podolec P, Torbicki A. *Characterization of Patients with Pulmonary Arterial Hypertension: Data from the Polish Registry of Pulmonary Hypertension (BNP-PL)*. J Clin Med, 2020; 9: 173
111. Kowalczyk A, Kołodziejczyk M, Gorąca A. *Antagoniści receptorów endotelinowych (ERA) – krótka charakterystyka nowej grupy leków*. Postepy Hig Med Dosw, 2014; 68: 1076–1080

112. Kugathasan L, Dutly AE, Zhao YD, Deng Y, Robb MJ, Keshavjee S, Stewart DJ. *Role of angiopoietin-1 in experimental and human pulmonary arterial hypertension*. Chest, 2005; 128: 633S–642S
113. Kurzyna M, Araszkiewicz A, Błaszczak P, Grabka M, Hawranek M, Kopec G, Mroczek E, Zembala M, Torbicki A, Ochoła A. *Standardy hemodynamicznej i angiograficznej oceny krążenia płucnego*. Kardiologia Polska, 2014; 72: S45–S64
114. Kurzyna M. *Epidemiologia i leczenie nadciśnienia płucnego w Polsce AD 2017*. https://www.ptkardio.pl/Epidemiologia_i_leczenie_nadcisnienia_plucnego_w_Polsce_AD_2017-2841 (dostęp: 05.06.2020)
115. Kuwano K, Hashino A, Noda K, Kosugi K, Kuwabara K. *A long-acting and highly selective prostacyclin receptor agonist prodrug, 2-{4-[(5,6-diphenylpyrazin-2-yl)(isopropyl)amino]butoxy}-N-(methylsulfonyl)acetamide (NS-304), ameliorates rat pulmonary hypertension with unique relaxant responses of its active form, {4-[(5,6-di-phenylpyrazin-2-yl)(isopropyl)amino]butoxy}acetic acid (MRE-269), on rat pulmonary artery*. J Pharmacol Exp Ther, 2008; 326: 691–699
116. Lachant DJ, Meoli DF, Haight D, Lyons JA, Swarthout RF, White RJ. *Low dose monocrotaline causes a selective pulmonary vascular lesion in male and female pneumonectomized rats*. Exp Lung Res, 2018; 44: 51–61
117. Lan NHS, Massam BD, Kulkarni SS, Lang CC. *Pulmonary Arterial Hypertension: Pathophysiology and Treatment*. Diseases, 2018; 6: 38
118. Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK. *3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1)*. J Biol Chem, 1999; 274: 21926–21931
119. Lederer DJ, Bartels MN, Schluger NW, Brogan F, Jellen P, Thomashow BM, Kawut SM. *Sildenafil for chronic obstructive pulmonary disease: a randomized crossover trial*. COPD, 2012; 9: 268–275
120. Lee YH. *An overview of meta-analysis for clinicians*. Korean J Intern Med, 2018; 33: 277–283
121. Levin YD, White RJ. *Novel therapeutic approaches in pulmonary arterial hypertension: focus on tadalafil*. Drugs Today (Barc), 2011; 47: 145–156
122. Liu Y, Tian XY, Mao G, Fang X, Fung ML, Shyy J, Huang Y, Wang N. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Ameliorates Pulmonary Arterial Hypertension by Inhibiting 5-Hydroxytryptamine 2B Receptor*. Hypertension, 2012; 60: 1471–1478
123. Liu ZQ, Liu B, Yu L, Wang XQ, Wang J, Liu HM. *Simvastatin has beneficial effect on pulmonary artery hypertension by inhibiting NF- κ B expression*. Mol Cell Biochem, 2011; 354: 77–82
124. Luitel H, Sydykov A, Schymura Y, Mamazhakypov A, Janssen W, Pradhan K, Wietelmann A, Kosanovic D, Dahal BK, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F, Ghofrani HA, Schermuly RT. *Pressure overload leads to an increased accumulation and activity of mast cells in the right ventricle*. Physiol Rep, 2017; 5: e13146
125. Lythgoe MP, Rhodes CJ, Ghataorhe P, Attard M, Wharton J, Wilkins MR. *Why drugs fail in clinical trials in pulmonary arterial hypertension, and strategies to succeed in the future*. Pharmacol Ther, 2016; 164: 195–203
126. Maarman G, Lecour S, Butrous G, Thienemann F, Sliwa K. *A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet?* Pulm Circ, 2013; 3: 739–756
127. Maeder MT, Schoch OD, Kleiner R, Joerg L, Weilenmann D. *Pulmonary hypertension associated with left-sided heart disease*. Swiss Med Wkly, 2017; 147: w14395
128. Manjunath S, Sakhare PM. *Adenosine and adenosine receptors: Newer therapeutic perspective*. Indian J Pharmacol, 2009; 41: 97–105
129. Maron BA, Leopold JA. *The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the pathobiology of pulmonary arterial hypertension (2013 Grover Conference series)*. Pulm Circ, 2014; 4: 200–210

130. Martin KB, Klinger JR, Rounds SI. *Pulmonary arterial hypertension: new insights and new hope*. *Respirology*, 2006; 11: 6–17
131. McClenaghan C, Woo KV, Nichols CG. *Pulmonary Hypertension and ATP-Sensitive Potassium Channels*. *Hypertension*, 2019; 74: 14–22
132. McLaughlin VV, Shah SJ, Souza R, Humbert M. *Management of pulmonary arterial hypertension*. *J Am Coll Cardiol*, 2015; 65: 1976–1997
133. Medarametla V, Festin S, Sugarragchaa C, Eng A, Naqwi A, Wiedmann T, Zisman LS. *PK10453, a nonselective platelet-derived growth factor receptor inhibitor, prevents the progression of pulmonary arterial hypertension*. *Pulm Circ*, 2014; 4: 82–102
134. Michelakis ED, Gurtu V, Webster L, Barnes G, Watson G, Howard L, Cupitt J, Paterson I, Thompson RB, Chow K, O'Regan DP, Zhao L, Wharton J, Kiely DG, Kinnaird A, Boukouris AE, White C, Nagendran J, Freed DH, Wort SJ, Gibbs SR, Wilkins MR. *Inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase improves pulmonary arterial hypertension in genetically susceptible patients*. *Sci Transl Med*, 2017; 9: eaao4583
135. Miszczyk E, Walencka M, Mikołajczyk-Chmiela M. *Modele zwierzęce w badaniach nad przebiegiem zakażeń Helicobacter pylori*. *Postepy Hig Med Dosw*, 2014; 68: 603–615
136. Mizuno S, Farkas L, Al Hussein A, Farkas D, Gomez-Arroyo J, Kraskauskas D, Nicolls MR, Cool CD, Bogaard HJ, Voelkel NF. *Severe pulmonary arterial hypertension induced by SU5416 and ovalbumin immunization*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012; 47: 679–687
137. Montani D, Chamaus MC, Savale L, Natali D, Price LC, Jaïs X, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O. *Phosphodiesterase type 5 inhibitors in pulmonary arterial hypertension*. *Adv Ther*, 2009; 26: 813–825
138. Morecroft I, Pang L, Baranowska M, Nilsen M, Loughlin L, Dempsie Y, Millet C, MacLean MR. *In vivo effects of a combined 5-HT1B receptor/SERT antagonist in experimental pulmonary hypertension*. *Cardiovasc Res*, 2010; 85: 593–603
139. Moreno-Vinasco L, Garcia JG. *Receptor tyrosine kinase inhibitors in rodent pulmonary hypertension*. *Adv Exp Med Biol*, 2010; 661: 419–434
140. Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR, McMurtry IF, Stenmark KR, Thistlethwaite PA, Weissmann N, Yuan JX, Weir EK. *Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension*. *J Am Coll Cardiol*, 2009; 54: S20–S31
141. Morrison K, Studer R, Ernst R, Haag F, Kauser K, Clozel M. *Differential effects of Selexipag and prostacyclin analogs in rat pulmonary artery*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012; 343: 547–555
142. Mubarak KK. *A review of prostaglandin analogs in the management of patients with pulmonary arterial hypertension*. *Respir Med*, 2010; 104: 9–21
143. Muhammad SA, Abbas AY, Saidu Y, Fakurazi S, Bilbis LS. *Therapeutic efficacy of mesenchymal stromal cells and secretome in pulmonary arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis*. *Biochimie*, 2020; 168: 156–168
144. Nickel NP, Spiekerkoetter E, Gu M, Li CG, Li H, Kaschwich M, Diebold I, Hennigs JK, Kim KY, Miyagawa K, Wang L, Cao A, Sa S, Jiang X, Stockstill RW, Nicolls MR, Zamanian RT, Bland RD, Rabinovitch M. *Elafin Reverses Pulmonary Hypertension via Caveolin-1-Dependent Bone Morphogenetic Protein Signaling*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015; 191: 1273–1286
145. Nogueira-Ferreira R, Faria-Costa G, Ferreira R, Henriques-Coelho T. *Animal models for the study of pulmonary hypertension: potential and limitations*. *Cardiol Cardiovasc*, 2016; 1: 1–22
146. Nogueira-Ferreira R, Vitorino R, Ferreira R, Henriques-Coelho T. *Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach*. *Pulm Pharmacol Ther*, 2015; 35: 8–16
147. Nożyński J, Zembala-Nożyńska E. *Nadciśnienie płucne*. W Skalski J.H, Religa Z (red.). *Kardiochirurgia dziecięca*. Katowice: Wydawnictwo Naukowe „Śląsk”; 2003
148. Ochoa CD, Wu RF, Terada LS. *ROS signaling and ER stress in cardiovascular disease*. *Mol Aspects Med*, 2018; 63: 18–29

149. Okada K, Tanaka Y, Bernstein M, Zhang W, Patterson GA, Botney MD. *Pulmonary hemodynamics modify the rat pulmonary artery response to injury. A neointimal model of pulmonary hypertension.* Am J Pathol, 1997; 151: 1019–1025
150. Olszewski J, Jabłecka A, Piątek J, Samborski W, Zawadziński J. *Badania eksperymentalne – przedkliniczne na zwierzętach.* Nowiny Lekarskie, 2011; 80: 219–221
151. Pan LC, Wilson DW, Segall HJ. *Strain differences in the response of Fischer 344 and Sprague-Dawley rats to monocrotaline induced pulmonary vascular disease.* Toxicology, 1993; 79: 21–35
152. Paulin R, Michelakis ED. *The metabolic theory of pulmonary arterial hypertension.* Circ Res, 2014; 115: 148–164
153. Perros F, de Man FS, Bogaard HJ, Antigny F, Simonneau G, Bonnet S, Provencher S, Galiè N, Humbert M. *Use of β -Blockers in Pulmonary Hypertension.* Circ Heart Fail, 2017; 10: e003703
154. Perros F, Dorfmüller P, Humbert M. *Current insights on the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension.* Semin Respir Crit Care Med, 2005; 26: 355–364
155. Perros F, Montani D, Dorfmüller P, Durand-Gasselini I, Tcherakian C, Le Pavec J, Mazmanian M, Fadel E, Mussot S, Mercier O, Hervé P, Emilie D, Eddahibi S, Simonneau G, Souza R, Humbert M. *Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension.* Am J Respir Crit Care Med, 2008; 178: 81–88
156. Petkov V, Mosgoeller W, Ziesche R, Raderer M, Stiebelhner L, Vonbank K, Funk GC, Hamilton G, Novotny C, Burian B, Block LH. *Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension.* J Clin Invest, 2003; 111: 1339–1346
157. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. *Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate dependent signaling functions.* Endocr Rev, 2006; 27: 47–72
158. Price LC, Wort SJ, Perros F, Dorfmüller P, Huertas A, Montani D, Cohen-Kaminsky S, Humbert M. *Inflammation in pulmonary arterial hypertension.* Chest, 2012; 141: 210–221
159. Program Narodowego Funduszu Zdrowia, załącznik B.31. do Obwieszczenia Ministra Zdrowia z dnia 21 grudnia 2020 r: <https://www.mp.pl/nadcisnienieplucne/tetnicze/256022,leczenie-tetniczego-nadcisnienia-plucnegoicd-10-i27-i270> (dostęp: 10.01.2021)
160. Pullamsetti SS, Savai R, Seeger W, Goncharova EA. *Translational Advances in the Field of Pulmonary Hypertension. From Cancer Biology to New Pulmonary Arterial Hypertension Therapeutics. Targeting Cell Growth and Proliferation Signaling Hubs.* Am J Respir Crit Care Med, 2017; 195: 425–437
161. Ryan J, Bloch K, Archer SL. *Rodent models of pulmonary hypertension: harmonisation with the world health organisation's categorisation of human PH.* Int J Clin Pract Suppl, 2011; 172: 15–34
162. Rybarczyk A, Wierzbicki P, Kowalczyk A, Kmiec Z. *Role of the Hippo pathway in cell proliferation and organ size control. Disorders of the pathway in cancer diseases.* Postepy Hig Med Dosw, 2014; 68: 504–516
163. Sacks RS, Remillard CV, Agange N, Auger WR, Thistlethwaite PA, Yuan JX. *Molecular biology of chronic thromboembolic pulmonary hypertension.* Semin Thorac Cardiovasc Surg, 2006; 18: 265–276
164. Sadushi-Kolici R, Jansa P, Kopec G, Torbicki A, Skoro-Sajer N, Campean IA, Halank M, Simkova I, Karlocai K, Steringer-Mascherbauer R, Samarzija M, Salobir B, Klepetko W, Lindner J, Lang IM. *Subcutaneous treprostinil for the treatment of severe non-operable chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTREPH): a double-blind, phase 3, randomised controlled trial.* Lancet Respir Med, 2019; 7: 239–248
165. Said SI, Hamidi SA, Dickman KG, Szema AM, Lyubsky S, Lin RZ, Jiang Y, Chen JJ, Waschek JA, Kort S. *Moderate pulmonary arterial hypertension in male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene.* Circulation, 2007; 115: 1260–1268
166. Sakao S, Tatsumi K. *The effects of antiangiogenic compound SU5416 in a rat model of pulmonary arterial hypertension.* Respiration, 2011; 81: 253–261

167. Santos-Ribeiro D, Mendes-Ferreira P, Maia-Rocha C, Adão R, Leite-Moreira AF, Brás-Silva C. *Pulmonary arterial hypertension: Basic knowledge for clinicians*. Arch Cardiovasc Dis, 2016; 109: 550–561
168. Sardana M, Moll M, Farber HW. *Novel investigational therapies for treating pulmonary arterial hypertension*. Expert Opin Investig Drugs, 2015; 24: 1571–1596
169. Satoh T, Satoh K, Yaoita N, Kikuchi N, Omura J, Kurosawa R, Numano K, Al-Mamun E, Siddique MA, Sunamura S, Nogi M, Suzuki K, Miyata S, Morser J, Shimokawa H. *Activated TAFI Promotes the Development of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: A Possible Novel Therapeutic Target*. Circ Res, 2017; 120: 1246–1262
170. Seferian A, Simonneau G. *Therapies for pulmonary arterial hypertension: where are we today, where do we go tomorrow?* Eur Respir Rev, 2013; 22: 217–226
171. Shenoy V, Qi Y, Katovich MJ, Raizada MK. *ACE2, a promising therapeutic target for pulmonary hypertension*. Curr Opin Pharmacol, 2011; 11: 150–155
172. Shimoda LA, Laurie SS. *Vascular remodeling in pulmonary hypertension*. J Mol Med, 2013; 91: 297–309
173. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna KR, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R. *Updated clinical classification of pulmonary hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2013; 62: D34–D41
174. Sirmagul B, Ilgin S, Atli O, Usanmaz SE, Demirel-Yilmaz E. *Assessment of the endothelial functions in monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. Clin Exp Hypertens, 2013; 35: 220–227
175. Sitbon O, Morrell NW. *Pathways in pulmonary arterial hypertension: the future is here*. Eur Respir Rev, 2012; 21: 321–327
176. Sitbon O, Vonk Noordegraaf A. *Epoprostenol and pulmonary arterial hypertension: 20 years of clinical experience*. Eur Respir Rev, 2017; 26: 160055
177. Spyropoulos F, Vitali SH, Touma M, Rose CD, Petty CR, Levy P, Kourembanas S, Christou H. *Echocardiographic markers of pulmonary hemodynamics and right ventricular hypertrophy in rat models of pulmonary hypertension*. Pulm Circ, 2020; 10: 2045894020910976
178. Stenmark KR, Meyrick B, Galiè N, Mooi WJ, McMurtry IF. *Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009; 297: L1013–L1032
179. Stenmark KR, Tudor RM. *Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ and Mitochondria: Drivers or Passengers on the Road to Pulmonary Hypertension?* Am J Respir Cell Mol Biol, 2018; 58: 555–557
180. Suen CM, Stewart DJ, Montroy J, Welsh C, Levac B, Wesch N, Zhai A, Fergusson D, McIntyre L, Lalu MM. *Regenerative cell therapy for pulmonary arterial hypertension in animal models: a systematic review*. Stem Cell Res Ther, 2019; 10: 75
181. Suntharalingam J, Treacy CM, Doughty NJ, Goldsmith K, Soon E, Toshner MR, Sheares KK, Hughes R, Morrell NW, Pepke-Zaba J. *Long-term use of sildenafil in inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension*. Chest, 2008; 134: 229–236
182. Sutliff RL, Kang BY, Hart CM. *PPAR γ as a potential therapeutic target in pulmonary hypertension*. Ther Adv Respir Dis, 2010; 4: 143–160
183. Tabima DM, Frizzell S, Gladwin MT. *Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension*. Free Radic Biol Med, 2012; 52: 1970–1986
184. Tada Y, Laudi S, Haral J, Carr M, Ivester C, Tanabe N, Takiguchi Y, Tatsumi K, Kuriyama T, Nichols WC, West J. *Murine pulmonary response to chronic hypoxia is strain specific*. Exp Lung Res, 2008; 34: 313–323
185. Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, Archer SL. *Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management*. BMJ, 2018; 360: j5492

186. Torbicki A, Wieteska M, Biederman A. *Przewlekłe zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne. Zakrzepy i zatory*, red. Windyga J, Pasierski T, Torbicki A, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2014; 555–567
187. Torres F, Farber H, Ristic A, McLaughlin V, Adams J, Zhang J, Klassen P, Shanahan W, Grundy J, Hoffmann I, Cabell C, Escribano Subías P, Sood N, Keogh A, D'Souza G, Rubin L. *Efficacy and safety of ralinepag, a novel oral IP agonist, in PAH patients on mono or dual background therapy: results from a phase 2 randomised, parallel group, placebo-controlled trial*. Eur Respir J, 2019; 54: 1901030
188. Toxvig AK, Wehland M, Grimm D, Infanger M, Krüger M. *A focus on riociguat in the treatment of pulmonary arterial hypertension*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2019; 125: 202–214
189. Tran TA, Kramer B, Shin YJ, Vallar P, Boatman PD, Zou N, Sage CR, Gharbaoui T, Krishnan A, Pal B, Shakya SR, Garrido Montalban A, Adams JW, Ramirez J, Behan DP, Shifrina A, Blackburn A, Leakakos T, Shi Y, Morgan M, Sadeque A, Chen W, Unett DJ, Gaidarov I, Chen X, Chang S, Shu HH, Tung SF, Semple G. *Discovery of 2-(((1*r*,4*r*)-4-(((4-Chlorophenyl)(phenyl)carbamoyloxy)methyl)cyclohexyl)methoxy)acetate (Ralinepag): An Orally Active Prostacyclin Receptor Agonist for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension*. J Med Chem, 2017; 60: 913–927
190. Tual L, Morel OE, Favret F, Fouillit M, Guernier C, Buvry A, Germain L, Dhonneur G, Bernaudin JF, Richalet JP. *Carvedilol inhibits right ventricular hypertrophy induced by chronic hypobaric hypoxia*. Pflugers Arch, 2006; 452: 371–379
191. Tuder RM, Abman SH, Braun T, Capron F, Stevens T, Thistlethwaite PA, Haworth SG. *Development and pathology of pulmonary hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2009; 54: S3–S9
192. Vassallo FG, Kodric M, Scarduelli C, Harari S, Potena A, Scarda A, Piattella M, Cassandro R, Confalonieri M. *Bosentan for patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension*. Eur J Intern Med, 2009; 20: 24–29
193. Villegas LR, Kluck D, Field C, Oberley-Deegan RE, Woods C, Yeager ME, El Kasmi KC, Savani RC, Bowler RP, Nozik-Grayck E. *Superoxide dismutase mimetic, MnTE-2-PyP, attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, pulmonary vascular remodeling, and activation of the NALP3 inflammasome*. Antioxid Redox Signal, 2013; 18: 1753–1764
194. Voelkel NF, Tamosiuniene R, Nicolls MR. *Challenges and opportunities in treating inflammation associated with pulmonary hypertension*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2016; 14: 939–951
195. Wan X, Wang W, Liu J, Tong T. *Estimating the sample mean and standard deviation from the sample size, median, range and/or interquartile range*. BMC Med Res Methodol, 2014; 14: 135
196. Wang C, Chao C, Chen LM, Chao L, Chao J. *High-salt diet upregulates kininogen and downregulates tissue kallikrein expression in Dahl-SS and SHR rats*. Am J Physiol, 1996; 271: F824–F830
197. Wang L, Yang T, Wang C. *Are statins beneficial for the treatment of pulmonary hypertension?* Chronic Dis Transl Med, 2017; 3: 213–220
198. Wang S, Ye L, Hong H, Tang C, Li M, Zhang Z, Liu J. *A neonatal rat model of increased right ventricular afterload by pulmonary artery banding*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2017; 154: 1734–1739
199. Waxman AB, Zamanian RT. *Pulmonary arterial hypertension: new insights into the optimal role of current and emerging prostacyclin therapies*. Am J Cardiol, 2013; 111: 1A–16A
200. Wick MJ, Buesing EJ, Wehling CA, Loomis ZL, Cool CD, Zamora MR, Miller YE, Colgan SP, Hersh LB, Voelkel NF, Dempsey EC. *Decreased neprilysin and pulmonary vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2011; 183: 330–340
201. Wierzbicki M. *Modele zwierzęce w badaniach medycznych, biologicznych i zootechnicznych*. Przegląd hodowlany, 2014; 6: 26–28

202. Wilkins MR, Ali O, Bradlow W, Wharton J, Taegtmeyer A, Rhodes CJ, Ghofrani HA, Howard L, Nihoyannopoulos P, Mohiaddin RH, Gibbs JS. *Simvastatin as a treatment for pulmonary hypertension trial*. Am J Respir Crit Care Med, 2010; 181: 1106–1113
203. Yaghi S, Novikov A, Trandafirescu T. *Clinical update on pulmonary hypertension*. J Investig Med, 2020; 68: 821–827
204. Yan D, Li G, Zhang Y, Liu Y. *Angiotensin-converting enzyme 2 activation suppresses pulmonary vascular remodeling by inducing apoptosis through the Hippo signaling pathway in rats with pulmonary arterial hypertension*. Clin Exp Hypertens, 2019; 41: 589–598
205. Yaoita N, Satoh K, Satoh T, Sugimura K, Tatebe S, Yamamoto S, Aoki T, Miura M, Miyata S, Kawamura T, Horiuchi H, Fukumoto Y, Shimokawa H. *Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016; 36: 1293–1301
206. Yasuda T, Tada Y, Tanabe N, Tatsumi K, West J. *Rho-kinase inhibition alleviates pulmonary hypertension in transgenic mice expressing a dominant-negative type II bone morphogenetic protein receptor gene*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011; 301: L667–L674
207. Yuan JX, Rubin LJ. *Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: the need for multiple hits*. Circulation, 2005; 111: 534–538
208. Zeng WJ, Xiong CM, Zhao L, Shan GL, Liu ZH, Xue F, Gu Q, Ni XH, Zhao ZH, Cheng XS, Wilkins MR, He JG. *Atorvastatin in pulmonary arterial hypertension (APATH) study*. Eur Respir J, 2012; 40: 67–74
209. Zhang T, Kawaguchi N, Yoshihara K, Hayama E, Furutani Y, Kawaguchi K, Tanaka T, Nakanishi T. *Silibinin efficacy in a rat model of pulmonary arterial hypertension using monocrotaline and chronic hypoxia*. Respir Res, 2019; 20: 79

Załącznik 1

Wykaz zakwalifikowanych publikacji

1. Abid S, Houssaini A, Chevarin C, Marcos E, Tissot CM, Gary-Bobo G, Wan F, Mouraret N, Amsellem V, Dubois-Randé JL, Hamon M, Adnot S. *Inhibition of gut- and lung-derived serotonin attenuates pulmonary hypertension in mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012; 303: L500–L508
2. Agard C, Rolli-Derkinderen M, Dumas de La Roque E, Rio M, Sagan C, Savineau JP, Loirand G, Pacaud P. *Protective role of the antidiabetic drug metformin against chronic experimental pulmonary hypertension*. Br J Pharmacol, 2009; 158: 1285–1294
3. Ahmed LA, Obaid AA, Zaki HF, Agha AM. *Naringenin adds to the protective effect of L-arginine in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats: favorable modulation of oxidative stress, inflammation and nitric oxide*. Eur J Pharm Sci, 2014; 62: 161–170
4. Ahmed LA, Obaid AA, Zaki HF, Agha AM. *Role of oxidative stress, inflammation, nitric oxide and transforming growth factor-beta in the protective effect of diosgenin in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. Eur J Pharmacol, 2014; 740: 379–387
5. Akagi S, Nakamura K, Miura D, Saito Y, Matsubara H, Ogawa A, Matoba T, Egashira K, Ito H. *Delivery of imatinib-incorporated nanoparticles into lungs suppresses the development of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension*. Int Heart J, 2015; 56: 354–359
6. Alencar AK, Pereira SL, Montagnoli TL, Maia RC, Kümmerle AE, Landgraf SS, Caruso-Neves C, Ferraz EB, Tesch R, Nascimento JH, de Sant'Anna CM, Fraga CA, Barreiro EJ, Sudo RT, Zapata-Sudo G. *Beneficial effects of a novel agonist of the adenosine A2A receptor on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. Br J Pharmacol, 2013; 169: 953–962
7. Alencar AK, Pereira SL, da Silva FE, Mendes LV, Cunha VM, Lima LM, Montagnoli TL, Caruso-Neves C, Ferraz EB, Tesch R, Nascimento JH, de Sant'Anna CM, Fraga CA, Barreiro EJ, Sudo RT, Zapata-Sudo G. *N-acylhydrazone derivative ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension through the modulation of adenosine AA2R activity*. Int J Cardiol, 2014; 173: 154–162
8. Al-Hiti H, Chovanec M, Melenovský V, Vajnerová O, Baňasová A, Kautzner J, Herget J. *L-arginine in combination with sildenafil potentiates the attenuation of hypoxic pulmonary hypertension in rats*. Physiol Res, 2013; 62: 589–595
9. Andersen CU, Mulvany MJ, Simonsen U. *Lack of synergistic effect of molsidomine and sildenafil on development of pulmonary hypertension in chronic hypoxic rats*. Eur J Pharmacol, 2005; 510: 87–96
10. Bai Y, Wang HM, Liu M, Wang Y, Lian GC, Zhang XH, Kang J, Wang HL. *4-Chloro-DL-phenylalanine protects against monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling and lung inflammation*. Int J Mol Med, 2014; 33: 373–382
11. Baliga RS, Zhao L, Madhani M, Lopez-Torondel B, Visintin C, Selwood D, Wilkins MR, MacAllister RJ, Hobbs AJ. *Synergy between natriuretic peptides and phosphodiesterase 5 inhibitors ameliorates pulmonary arterial hypertension*. Am J Respir Crit Care Med, 2008; 178: 861–869
12. Banasová A, Maxová H, Hampl V, Vízek M, Povýsilová V, Novotná J, Vajnerová O, Hnilicková O, Herget J. *Prevention of mast cell degranulation by disodium cromoglycate attenuates the development of hypoxic pulmonary hypertension in rats exposed to chronic hypoxia*. Respiration, 2008; 76: 102–107
13. Bauer EM, Zheng H, Lotze MT, Bauer PM. *Recombinant human interferon alpha 2b prevents and reverses experimental pulmonary hypertension*. PLoS One, 2014; 9: e96720
14. Bi LQ, Zhu R, Kong H, Wu SL, Li N, Zuo XR, Zhou SM, Kou JP, Yu BY, Wang H, Xie WP. *Ruscogenin attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. Int Immunopharmacol, 2013; 16: 7–16

15. Blumberg FC, Wolf K, Sandner P, Lorenz C, Riegger GA, Pfeifer M. *The NO donor molsidomine reduces endothelin-1 gene expression in chronic hypoxic rat lungs*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001; 280: L258–L263
16. Bogaard HJ, Natarajan R, Mizuno S, Abbate A, Chang PJ, Chau VQ, Hoke NN, Kraskauskas D, Kasper M, Salloum FN, Voelkel NF. *Adrenergic receptor blockade reverses right heart remodeling and dysfunction in pulmonary hypertensive rats*. Am J Respir Crit Care Med, 2010; 182: 652–660
17. Bonnet S, Dumas de La Roque E, Bégueret H, Marthan R, Fayon M, Dos Santos P, Savineau JP, Baulieu EE. *Dehydroepiandrosterone (DHEA) prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension*. Proc Natl Acad Sci USA, 2003; 100: 9488–9493
18. Breitling S, Krauszman A, Parihar R, Walther T, Friedberg MK, Kuebler WM. *Dose-dependent, therapeutic potential of angiotensin-(1-7) for the treatment of pulmonary arterial hypertension*. Pulm Circ, 2015; 5: 649–657
19. Bruce E, Shenoy V, Rathinasabapathy A, Espejo A, Horowitz A, Oswald A, Francis J, Nair A, Unger T, Raizada MK, Steckelings UM, Summers C, Katovich MJ. *Selective activation of angiotensin AT2 receptors attenuates progression of pulmonary hypertension and inhibits cardiopulmonary fibrosis*. Br J Pharmacol, 2015; 172: 2219–2231
20. Bubb KJ, Trinder SL, Baliga RS, Patel J, Clapp LH, MacAllister RJ, Hobbs AJ. *Inhibition of phosphodiesterase 2 augments cGMP and cAMP signaling to ameliorate pulmonary hypertension*. Circulation, 2014; 130: 496–507
21. Chan MC, Weisman AS, Kang H, Nguyen PH, Hickman T, Mecker SV, Hill NS, Lagna G, Hata A. *The amiloride derivative phenamil attenuates pulmonary vascular remodeling by activating NFAT and the bone morphogenetic protein signaling pathway*. Mol Cell Biol, 2011; 31: 517–530
22. Chang LT, Sun CK, Sheu JJ, Chiang CH, Youssef AA, Lee FY, Wu CJ, Yip HK. *Cilostazol therapy attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rat model*. Circ J, 2008; 72: 825–831
23. Chaumais MC, Ranchoux B, Montani D, Dorfmueller P, Tu L, Lecerf F, Raymond N, Guignabert C, Price L, Simonneau G, Cohen-Kaminsky S, Humbert M, Perros F. *N-acetylcysteine improves established monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. Respir Res, 2014; 15: 65
24. Chen L, Xiao J, Li Y, Ma H. *Ang-(1-7) might prevent the development of monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension in rats*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2011; 15: 1–7
25. Chen WS, Li XQ, Cao W, Xiao X, Dong L, Zhang JZ. *Vardenafil ameliorates calcium mobilization in pulmonary artery smooth muscle cells from hypoxic pulmonary hypertensive mice*. Arch Med Res, 2012; 43: 265–273
26. Chen X, Cheng D, Guan J, Xia X, Fan L, Su Q. *Preventive effects of montelukast on hypoxic pulmonary hypertension in rats*. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2003; 34: 555–558
27. Chen XY, Zhang W, Miao QF, Zhang YJ. *m-Nisoldipine attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension by suppressing 5-HT/ERK MAPK pathway*. Yao Xue Xue Bao, 2008; 43: 1011–1018
28. Cheng D, Chen W. *Effects of ginkgolide B on isobaric hypoxic pulmonary hypertension in rats*. Chin Med J, 1996; 109: 881–884
29. Chung HH, Dai ZK, Wu BN, Yeh JL, Chai CY, Chu KS, Liu CP, Chen IJ. *The xanthine derivative KMUP-1 inhibits models of pulmonary artery hypertension via increased NO and cGMP-dependent inhibition of RhoA/Rho kinase*. Br J Pharmacol, 2010; 160: 971–986
30. Church AC, Martin DH, Wadsworth R, Bryson G, Fisher AJ, Welsh DJ, Peacock AJ. *The reversal of pulmonary vascular remodeling through inhibition of p38 MAPK- α : a potential novel anti-inflammatory strategy in pulmonary hypertension*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015; 309: L333–L347
31. Courboulin A, Barrier M, Perreault T, Bonnet P, Tremblay VL, Paulin R, Tremblay E, Lambert C, Jacob MH, Bonnet SN, Provencher S, Bonnet S. *Plumbagin reverses proliferation and resistance to apoptosis in experimental PAH*. Eur Respir J, 2012; 40: 618–629
32. 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

33. Crossno JT Jr, Garat CV, Reusch JE, Morris KG, Dempsey EC, McMurtry IF, Stenmark KR, Klemm DJ. *Rosiglitazone attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007; 292: L885–L897
34. Csiszar A, Labinskyy N, Olson S, Pinto JT, Gupte S, Wu JM, Hu F, Ballabh P, Podlutzky A, Losonczy G, de Cabo R, Mathew R, Wolin MS, Ungvari Z. *Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. Hypertension, 2009; 54: 668–675
35. Dahal BK, Kosanovic D, Pamarthi PK, Sydykov A, Lai YJ, Kast R, Schirok H, Stasch JP, Ghofrani HA, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT. *Therapeutic efficacy of azaindole-1 in experimental pulmonary hypertension*. Eur Respir J, 2010; 36: 808–818
36. Dai L, Wu S. *Atorvastatin attenuates hypoxic pulmonary hypertension in rats by inhibiting RhoA/Rho kinase pathway*. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2011; 36: 58–63
37. Dai ZK, Cheng YJ, Chung HH, Wu JR, Chen IJ, Wu BN. *KMUP-1 ameliorates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension through the modulation of Ca²⁺ sensitization and K⁺ channel*. Life Sci, 2010; 86: 747–755
38. De Man FS, Handoko ML, van Ballegoij JJ, Schaliij I, Bogaards SJ, Postmus PE, van der Velden J, Westerhof N, Paulus WJ, Vonk-Noordegraaf A. *Bisoprolol Delays Progression Towards Right Heart Failure in Experimental Pulmonary Hypertension*. Circ Heart Fail, 2012; 5: 97–105
39. De Raaf MA, Hussaini AA, Gomez-Arroyo J, Kraskaukas D, Farkas D, Happé C, Voelkel NF, Bogaard HJ. *Histone deacetylase inhibition with trichostatin A does not reverse severe angioproliferative pulmonary hypertension in rats*. Pulm Circ, 2014; 4: 237–243
40. Delbeck M, Nickel KF, Perzborn E, Ellinghaus P, Strassburger J, Kast R, Laux V, Schäfer S, Schermuly RT, von Degenfeld G. *A role for coagulation factor Xa in experimental pulmonary arterial hypertension*. Cardiovasc Res, 2011; 92: 159–168
41. Dumitrascu R, Kulcke C, Königshoff M, Kouri F, Yang X, Morrell N, Ghofrani HA, Weissmann N, Reiter R, Seeger W, Grimminger F, Eickelberg O, Schermuly RT, Pullamsetti SS. *Terguride ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. Eur Respir J, 2011; 37: 1104–1118
42. Eba S, Hoshikawa Y, Moriguchi T, Mitsuishi Y, Satoh H, Ishida K, Watanabe T, Shimizu T, Shimokawa H, Okada Y, Yamamoto M, Kondo T. *The nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activator oltipraz attenuates chronic hypoxia-induced cardiopulmonary alterations in mice*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013; 49: 324–333
43. Elias-Al-Mamun M, Satoh K, Tanaka S, Shimizu T, Nergui S, Miyata S, Fukumoto Y, Shimokawa H. *Combination therapy with fasudil and sildenafil ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and survival in rats*. Circ J, 2014; 78: 967–976
44. Elmedal B, de Dam MY, Mulvany MJ, Simonsen U. *The superoxide dismutase mimetic, tempol, blunts right ventricular hypertrophy in chronic hypoxic rats*. Br J Pharmacol, 2004; 141: 105–113
45. Fan Z, Liu B, Zhang S, Liu H, Li Y, Wang D, Liu Y, Li J, Wang N, Liu Y, Zhang B. *YM155, a selective survivin inhibitor, reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats via upregulating voltage-gated potassium channels*. Clin Exp Hypertens, 2015; 37: 381–387
46. Farhat MY, Chen MF, Bhatti T, Iqbal A, Cathapermal S, Ramwell PW. *Protection by oestradiol against the development of cardiovascular changes associated with monocrotaline pulmonary hypertension in rats*. Br J Pharmacol, 1993; 110: 719–723
47. Faul JL, Nishimura T, Berry GJ, Benson GV, Pearl RG, Kao PN. *Triptolide attenuates pulmonary arterial hypertension and neointimal formation in rats*. Am J Respir Crit Care Med, 2000; 162: 2252–2258
48. Ferreira AJ, Shenoy V, Yamazato Y, Sriramula S, Francis J, Yuan L, Castellano RK, Ostrov DA, Oh SP, Katovich MJ, Raizada MK. *Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension*. Am J Respir Crit Care Med, 2009; 179: 1048–1054
49. Frump AL, Goss KN, Vayl A, Albrecht M, Fisher A, Tursunova R, Fierst J, Whitson J, Cucci AR, Brown MB, Lahm T. *Estradiol improves right ventricular function in rats with severe angioproliferative pulmonary hypertension: effects of endogenous and exogenous sex hormones*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015; 308: L873–L890

50. Gao H, Chen C, Huang S, Li B. *Quercetin attenuates the progression of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. J Biomed Res, 2012; 26: 98–102
51. Garat CV, Crossno JT Jr, Sullivan TM, Reusch JE, Klemm DJ. *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling attenuates hypoxia-induced pulmonary artery remodeling and suppresses CREB depletion in arterial smooth muscle cells*. J Cardiovasc Pharmacol, 2013; 62: 539–548
52. Gary-Bobo G, Houssaini A, Amsellem V, Rideau D, Pacaud P, Perrin A, Brégeon J, Marcos E, Dubois-Randé JL, Sitbon O, Savale L, Adnot S. *Effects of HIV protease inhibitors on progression of monocrotaline and hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats*. Circulation, 2010; 122: 1937–1947
53. Girgis RE, Li D, Zhan X, Garcia JG, Tudor RM, Hassoun PM, Johns RA. *Attenuation of chronic hypoxic pulmonary hypertension by simvastatin*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003; 285: H938–H945
54. Girgis RE, Mozammel S, Champion HC, Li D, Peng X, Shimoda L, Tudor RM, Johns RA, Hassoun PM. *Regression of chronic hypoxic pulmonary hypertension by simvastatin*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007; 292: L1105–L1110
55. Green DE, Murphy TC, Kang BY, Kleinhenz JM, Szyndralewicz C, Page P, Sutliff RL, Hart CM. *The Nox4 inhibitor GKT137831 attenuates hypoxia-induced pulmonary vascular cell proliferation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012; 47: 718–726
56. Guerard P, Rakotonianina Z, Goirand F, Rochette L, Dumas M, Lirussi F, Bardou M. *The HMG-CoA reductase inhibitor, pravastatin, prevents the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the rat through reduction of endothelial cell apoptosis and overexpression of eNOS*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2006; 373: 401–414
57. Guignabert C, Raffestin B, Benferhat R, Raoul W, Zadigue P, Rideau D, Hamon M, Adnot S, Eddahibi S. *Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. Circulation, 2005; 111: 2812–2819
58. Hamidi SA, Lin RZ, Szema AM, Lyubsky S, Jiang YP, Said SI. *VIP and endothelin receptor antagonist: an effective combination against experimental pulmonary arterial hypertension*. Respir Res, 2011; 12: 141
59. Hampl V, Bíbová J, Povýsilová V, Herget J. *Dehydroepiandrosterone sulphate reduces chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats*. Eur Respir J, 2003; 21: 862–865
60. Han DD, Wang Y, Zhang XH, Liu JR, Wang HL. *Fluoxetine protects against monocrotaline-induced pulmonary arterial remodeling by inhibition of hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor*. Can J Physiol Pharmacol, 2012; 90: 445–454
61. Hara Y, Sassi Y, Guibert C, Gambaryan N, Dorfmueller P, Eddahibi S, Lompré AM, Humbert M, Hulot JS. *Inhibition of MRP4 prevents and reverses pulmonary hypertension in mice*. J Clin Invest, 2011; 121: 2888–2897
62. Harrington LS, Moreno L, Reed A, Wort SJ, Desvergne B, Garland C, Zhao L, Mitchell JA. *The PPARbeta/delta agonist GW0742 relaxes pulmonary vessels and limits right heart hypertrophy in rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension*. PLoS One, 2010; 5
63. He Y, Cao X, Liu X, Li X, Xu Y, Liu J, Shi J. *Quercetin reverses experimental pulmonary arterial hypertension by modulating the TrkA pathway*. Exp Cell Res, 2015; 339: 122–134
64. Henriques-Coelho T, Roncon-Albuquerque Júnior R, Lourenço AP, Baptista MJ, Oliveira SM, Brandao-Nogueira A, Correia-Pinto J, Leite-Moreira AF. *Ghrelin reverses molecular, structural and hemodynamic alterations of the right ventricle in pulmonary hypertension*. Rev Port Cardiol, 2006; 25: 55–63
65. Herget J, Novotna J, Bibova J, Povysilova V, Vankova M, Hampl V. *Metalloproteinase inhibition by Batimastat attenuates pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003; 285: L199–L208
66. Hironaka E, Hongo M, Sakai A, Mawatari E, Terasawa F, Okumura N, Yamazaki A, Ushiyama Y, Yazaki Y, Kinoshita O. *Serotonin receptor antagonist inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension and prolongs survival in rats*. Respiration, 2006; 73: 105–112

67. Hongo M, Mawatari E, Sakai A, Ruan Z, Koizumi T, Terasawa F, Yazaki Y, Kinoshita O, Ikeda U, Shibamoto T. *Effects of nicorandil on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats*. J Cardiovasc Pharmacol, 2005; 46: 452–458
68. Hosokawa S, Haraguchi G, Sasaki A, Arai H, Muto S, Itai A, Doi S, Mizutani S, Isobe M. *Pathophysiological roles of nuclear factor kappaB (NF- κ B) in pulmonary arterial hypertension: effects of synthetic selective NF- κ B inhibitor IMD-0354*. Cardiovasc Res, 2013; 99: 35–43
69. Houssaini A, Abid S, Mouraret N, Wan F, Rideau D, Saker M, Marcos E, Tissot CM, Dubois-Randé JL, Amsellem V, Adnot S. *Rapamycin reverses pulmonary artery smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013; 48: 568–577
70. Hu H, Zharikov S, Patel JM. *Novel peptide for attenuation of hypoxia-induced pulmonary hypertension via modulation of nitric oxide release and phosphodiesterase-5 activity*. Peptides, 2012; 35: 78–85
71. Huang X, Fan R, Lu Y, Yu C, Xu X, Zhang X, Liu P, Yan S, Chen C, Wang L. *Regulatory effect of AMP-activated protein kinase on pulmonary hypertension induced by chronic hypoxia in rats: in vivo and in vitro studies*. Mol Biol Rep, 2014; 41: 4031–4041
72. Huang X, Zou L, Yu X, Chen M, Guo R, Cai H, Yao D, Xu X, Chen Y, Ding C, Cai X, Wang L. *Salidroside attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension via adenosine A2a receptor related mitochondria-dependent apoptosis pathway*. J Mol Cell Cardiol, 2015; 82: 153–66
73. Huang YF, Liu ML, Dong MQ, Yang WC, Zhang B, Luan LL, Dong HY, Xu M, Wang YX, Liu LL, Gao YQ, Li ZC. *Effects of sodium tanshinone II A sulphonate on hypoxic pulmonary hypertension in rats in vivo and on Kv2.1 expression in pulmonary artery smooth muscle cells in vitro*. J Ethnopharmacol, 2009; 125: 436–443
74. Huh JW, Kim SY, Lee JH, Lee YS. *YC-1 attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in mice*. Pulm Pharmacol Ther, 2011; 24: 638–646
75. Ilgin S, Burukoglu D, Atli O, Sirmagul B. *Effects of everolimus in combination with sildenafil in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. Cardiovasc Toxicol, 2012; 12: 46–55
76. Inoue H, Yano K, Noto T, Takagi M, Ikeo T, Kikkawa K. *Acute and chronic effects of T-1032, a novel selective phosphodiesterase type 5 inhibitor, on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. Biol Pharm Bull, 2002; 25: 1422–1426
77. Ishikawa K, Hashimoto H, Mitani S, Toki Y, Okumura K, Ito T. *Enalapril improves heart failure induced by monocrotaline without reducing pulmonary hypertension in rats: roles of preserved myocardial creatine kinase and lactate dehydrogenase isoenzymes*. Int J Cardiol, 1995; 47: 225–233
78. Jacquin S, Rincheval V, Mignotte B, Richard S, Humbert M, Mercier O, Londono-Vallejo A, Fadel E, Eddahibi S. *Inactivation of p53 is sufficient to induce development of pulmonary hypertension in rats*. PLoS One, 2015; 10: e0131940
79. Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Plichta P, Orszulak-Michalak D. *Concurrent Rho-Kinase and Tyrosine Kinase Platelet-Derived Growth Factor Inhibition in Experimental Pulmonary Hypertension*. Pharmacology, 2014; 93: 145–150
80. Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Cicha K, Orszulak-Michalak D. *Influence of imatinib at a low dose and sildenafil on pulmonary hypertension in rats*. Pharmazie, 2015; 70: 477–479
81. Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Łuczak A, Orszulak-Michalak D. *The beneficial impact of fasudil and sildenafil on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats: a hemodynamic and biochemical study*. Pharmacology, 2013; 91: 178–184
82. Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Surowiecka A, Kącikowska J, Orszulak-Michalak D. *HMG-CoA reductase inhibitors: An opportunity for the improvement of imatinib safety. An experimental study in rat pulmonary hypertension*. Pharmacol Rep, 2015; 67: 32–37
83. Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Wesołowska A, Orszulak-Michalak D. *Rosuvastatin, sildenafil and their combination in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rat*. Acta Pharm, 2014; 64: 345–353

84. Jeffery TK, Wanstall JC. *Perindopril, an angiotensin converting enzyme inhibitor, in pulmonary hypertensive rats: comparative effects on pulmonary vascular structure and function*. Br J Pharmacol, 1999; 128: 1407–1418
85. Jeffery TK, Wanstall JC. *Pulmonary vascular remodelling in hypoxic rats: effects of amlodipine, alone and with perindopril*. Eur J Pharmacol, 2001; 416: 123–131
86. Jiang BH, Maruyama J, Yokochi A, Mitani Y, Maruyama K. *A novel inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ONO-1714, does not ameliorate hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats*. Lung, 2007; 185: 303–308
87. Jiang H, Guan RJ, Wang HY. *Fasudil reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, 2013; 41: 239–244
88. Jiang L, Zhou T, Liu H. *Combined effects of the ATP-sensitive potassium channel opener pinacidil and simvastatin on pulmonary vascular remodeling in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension*. Pharmazie, 2012; 67: 547–552
89. Jin H, Wang Y, Zhou L, Liu L, Zhang P, Deng W, Yuan Y. *Melatonin attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting the inflammation and the proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells*. J Pineal Res, 2014; 57: 442–450
90. Kameshima S, Kazama K, Okada M, Yamawaki H. *Eukaryotic elongation factor 2 kinase mediates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension via reactive oxygen species-dependent vascular remodeling*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015; 308: H1298–H1305
91. Kanai Y, Hori S, Tanaka T, Yasuoka M, Watanabe K, Aikawa N, Hosoda Y. *Role of 5-hydroxytryptamine in the progression of monocrotaline induced pulmonary hypertension in rats*. Cardiovasc Res, 1993; 27: 1619–1623
92. Kanno S, Wu YJ, Lee PC, Billiar TR, Ho C. *Angiotensin-converting enzyme inhibitor preserves p21 and endothelial nitric oxide synthase expression in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats*. Circulation, 2001; 104: 945–950
93. Kataoka M, Nagaya N, Satoh T, Itoh T, Murakami S, Iwase T, Miyahara Y, Kyotani S, Sakai Y, Kangawa K, Ogawa S. *A long-acting prostacyclin agonist with thromboxane inhibitory activity for pulmonary hypertension*. Am J Respir Crit Care Med, 2005; 172: 1575–1580
94. Kato T, Nasu T, Sonoda H, Ito KM, Ikeda M, Ito K. *Evaluation of olmesartan medoxomil in the rat monocrotaline model of pulmonary hypertension*. J Cardiovasc Pharmacol, 2008; 51: 18–23
95. Kazama K, Okada M, Yamawaki H. *A novel adipocytokine, omentin, inhibits monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats*. Biochem Biophys Res Commun, 2014; 452: 142–146
96. Kim EK, Lee JH, Oh YM, Lee YS, Lee SD. *Rosiglitazone attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in rats*. Respirology, 2010; 15: 659–668
97. Kim SY, Lee JH, Huh JW, Kim HJ, Park MK, Ro JY, Oh YM, Lee SD, Lee YS. *Bortezomib alleviates experimental pulmonary arterial hypertension*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012; 47: 698–708
98. Klein M, Schermuly RT, Ellinghaus P, Milting H, Riedl B, Nikolova S, Pullamsetti SS, Weissmann N, Dony E, Savai R, Ghofrani HA, Grimminger F, Busch AE, Schäfer S. *Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling*. Circulation, 2008; 118: 2081–2090
99. Klinger JR, Warburton RR, Pietras L, Hill NS. *Brain natriuretic peptide inhibits hypoxic pulmonary hypertension in rats*. J Appl Physiol, 1998; 84: 1646–1652
100. Klinker A, Möller A, Pekarova M, Ravekes T, Friedrichs K, Berlin M, Scheu KM, Kubala L, Kolarova H, Ambrozova G, Schermuly RT, Woodcock SR, Freeman BA, Rosenkranz S, Baldus S, Rudolph V, Rudolph TK. *Protective effects of 10-nitro-oleic acid in a hypoxia-induced murine model of pulmonary hypertension*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014; 51: 155–162
101. Kojonazarov B, Sydykov A, Pullamsetti SS, Luitel H, Dahal BK, Kosanovic D, Tian X, Majewski M, Baumann C, Evans S, Phillips P, Fairman D, Davie N, Wayman C, Kilty I, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Ghofrani HA, Schermuly RT. *Effects of multikinase inhibitors on pressure overload-induced right ventricular remodeling*. Int J Cardiol, 2013; 167: 2630–2637

102. Kosanovic D, Kojonazarov B, Luitel H, Dahal BK, Sydykov A, Cornitescu T, Janssen W, Brandes RP, Davie N, Ghofrani HA, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT. *Therapeutic efficacy of TBC3711 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. Respir Res, 2011; 12: 87
103. Koyama M, Furuhashi M, Ishimura S, Mita T, Fuseya T, Okazaki Y, Yoshida H, Tsuchihashi K, Miura T. *Reduction of endoplasmic reticulum stress by 4-phenylbutyric acid prevents the development of hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014; 306: H1314–H1323
104. Kwon JH, Kim KC, Cho MS, Kim HS, Sohn S, Hong YM. *An inhibitory effect of tumor necrosis factor- α antagonist to gene expression in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats model*. Korean J Pediatr, 2013; 56: 116–124
105. Lahm T, Albrecht M, Fisher AJ, Selej M, Patel NG, Brown JA, Justice MJ, Brown MB, Van Demark M, Trulock KM, Dieudonne D, Reddy JG, Presson RG, Petrache I. *17 β -Estradiol attenuates hypoxic pulmonary hypertension via estrogen receptor-mediated effects*. Am J Respir Crit Care Med, 2012; 185: 965–980
106. Lai YL, Chen CF, Chien CT, Shiao HL, Thacker AA, Zhang HQ. *Capsaicin pretreatment attenuates chronic hypoxic pulmonary hypertension*. Respir Physiol, 1995; 99: 283–289
107. Lai YL, Wu HD, Chen CF. *Antioxidants attenuate chronic hypoxic pulmonary hypertension*. J Cardiovasc Pharmacol, 1998; 32: 714–720
108. Lan B, Hayama E, Kawaguchi N, Furutani Y, Nakanishi T. *Therapeutic efficacy of valproic acid in a combined monocrotaline and chronic hypoxia rat model of severe pulmonary hypertension*. PLoS One, 2015; 10: e0117211
109. Laudi S, Trump S, Schmitz V, West J, McMurtry IF, Mutlak H, Christians U, Weimann J, Kaisers U, Steudel W. *Serotonin transporter protein in pulmonary hypertensive rats treated with atorvastatin*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007; 293: L630–L638
110. Laursen BE, Dam MY, Mulvany MJ, Simonsen U. *Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling and right ventricular hypertrophy is unaltered by long-term oral L-arginine administration*. Vascu Pharmacol, 2008; 49: 71–76
111. Lee DS, Kim YK, Jung YW. *Simvastatin, sildenafil and their combination in monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension*. Korean Circ J, 2010; 40: 659–664
112. Li G, Liu Y, Zhu Y, Liu A, Xu Y, Li X, Li Z, Su J, Sun L. *ACE2 activation confers endothelial protection and attenuates neointimal lesions in prevention of severe pulmonary arterial hypertension in rats*. Lung, 2013; 191: 327–336
113. Li G, Xu YL, Ling F, Liu AJ, Wang D, Wang Q, Liu YL. *Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against pulmonary arterial hypertension through improving early endothelial function and mediating cytokines levels*. Chin Med J, 2012; 125: 1381–1388
114. Li H, Lu W, Cai WW, Wang PJ, Zhang N, Yu CP, Wang DL, Liu BC, Sun W. *Telmisartan attenuates monocrotaline-induced pulmonary artery endothelial dysfunction through a PPAR gamma-dependent PI3K/Akt/eNOS pathway*. Pulm Pharmacol Ther, 2014; 28: 17–24
115. Li J, Long C, Cui W, Wang H. *Iptakalim ameliorates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2013; 18: 60–69
116. Li J, Shi QX, Fan R, Zhang LJ, Zhang SM, Guo HT, Wang YM, Kaye AJ, Kaye AD, Bueno FR, Xu XZ, Yu SQ, Yi DH, Pei JM. *Vasculoprotective effect of U50,488H in rats exposed to chronic hypoxia: role of Akt-stimulated NO production*. J Appl Physiol, 2013; 114: 238–244
117. Li J, Zhang P, Zhang QY, Zhang SM, Guo HT, Bi H, Wang YM, Sun X, Liu JC, Cheng L, Cui Q, Yu SQ, Kaye AD, Yi DH, Pei JM. *Effects of U50,488H on hypoxia pulmonary hypertension and its underlying mechanism*. Vascu Pharmacol, 2009; 51: 72–77
118. Li XL, Guan RJ, Xu QH, Wu ZY. *Effects of rosuvastatin on monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension in rats*. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, 2011; 39: 247–253
119. Li XL, Guan RJ, Li JJ. *Attenuation of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats by rosuvastatin*. J Cardiovasc Pharmacol, 2012; 60: 219–226
120. Li XQ, Hong Y, Wang Y, Zhang XH, Wang HL. *Sertraline protects against monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006; 33:1047–1051

121. Li XW, Gao YX, Li S, Yang JR. *Effect of sesamin on pulmonary vascular remodeling in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2015; 40: 1355–1361
122. Li XW, Guo B, Shen YY, Yang JR. *Effect of chrysin on expression of NOX4 and NF- κ B in right ventricle of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension of rats*. Yao Xue Xue Bao, 2015; 50: 1128–1134
123. Li XW, Wang XM, Li S, Yang JR. *Effects of chrysin (5,7-dihydroxyflavone) on vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats*. Chin Med, 2015; 10: 4
124. Li XW, Wang XM, Li S, Yang JR. *Effects of rutaecarpine on right ventricular remodeling in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi, 2014; 30: 405–410
125. Li ZC, Zhang FQ, Song JC, Mei QB, Zhao DH. *Therapeutic effects of DCDDP, a calcium channel blocker, on chronic pulmonary hypertension in rat*. J Appl Physiol, 2002; 92: 997–1003
126. Liu B, Luo XJ, Yang ZB, Zhang JJ, Li TB, Zhang XJ, Ma QL, Zhang GG, Hu CP, Peng J. *Inhibition of 450/VPO1 pathway and inflammatory reaction by trimethoxystilbene in prevention of cardiovascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertensive rats*. J Cardiovasc Pharmacol, 2014; 63: 567–576
127. Liu B, Wang XQ, Yu L, Zhou TF, Wang XM, Liu HM. *Simvastatin restores down-regulated GATA-6 expression in pulmonary hypertensive rats*. Exp Lung Res, 2009; 35: 411–426
128. Liu B, Wang XM, Zhou TF, Hua YM, Liu HM, Wei L, Qiao LN, Wang XQ, Zhao SS, Shi K. *Expression of connective tissue growth factor and its down-regulation by simvastatin administration in pulmonary hypertensive rats*. Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2008; 46: 359–365
129. Liu C, Fang C, Cao G, Liu K, Wang B, Wan Z, Li S, Wu S. *Ethyl pyruvate ameliorates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats*. J Cardiovasc Pharmacol, 2014; 64: 7–15
130. Liu M, Wang Y, Zheng L, Zheng W, Dong K, Chen S, Zhang B, Li Z. *Fasudil reversed MCT-induced and chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension by attenuating oxidative stress and inhibiting the expression of Trx1 and HIF-1*. Respir Physiol Neurobiol, 2014; 201: 38–46
131. Liu P, Yan S, Chen M, Chen A, Yao D, Xu X, Cai X, Wang L, Huang X. *Effects of baicalin on collagen I and collagen III expression in pulmonary arteries of rats with hypoxic pulmonary hypertension*. Int J Mol Med, 2015; 35: 901–908
132. Liu Y, Zhang B, Dong MQ, Niu W, Luo Y, Gao YQ, Li ZC. *Attenuation of pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation following hypoxic pulmonary hypertension by the Na⁺/H⁺ exchange inhibitor amiloride*. Chin J Physiol, 2010; 53: 36–44
133. Liu Y, Tian H, Yan X, Fan F, Wang W, Han J. *Serotonin inhibits apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells through 5-HT_{2A} receptors involved in the pulmonary artery remodeling of pulmonary artery hypertension*. Exp Lung Res, 2013; 39: 70–79
134. Liu Y, Tian XY, Mao G, Fang X, Fung ML, Shyy JY, Huang Y, Wang N. *Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ameliorates pulmonary arterial hypertension by inhibiting 5-hydroxytryptamine 2B receptor*. Hypertension, 2012; 60: 1471–1478
135. Liu ZQ, Liu B, Yu L, Wang XQ, Wang J, Liu HM. *Simvastatin has beneficial effect on pulmonary artery hypertension by inhibiting NF- κ B expression*. Mol Cell Biochem, 2011; 354: 77–82
136. Luan Y, Chao S, Ju ZY, Wang J, Xue X, Qi TG, Cheng GH, Kong F. *Therapeutic effects of baicalin on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by inhibiting inflammatory response*. Int Immunopharmacol, 2015; 26: 188–193
137. Ma W, Han W, Greer PA, Tudor RM, Toque HA, Wang KK, Caldwell RW, Su Y. *Calpain mediates pulmonary vascular remodeling in rodent models of pulmonary hypertension, and its inhibition attenuates pathologic features of disease*. J Clin Invest, 2011; 121: 4548–4566
138. Mao SZ, Hong L, Hu LG, Fan XF, Zhang L, Guo YM, Gong YS. *Effect of apelin on hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of the NO pathway*. Sheng Li Xue Bao, 2009; 61: 480–484
139. Marcos E, Adnot S, Pham MH, Nosjean A, Raffestin B, Hamon M, Eddahibi S. *Serotonin transporter inhibitors protect against hypoxic pulmonary hypertension*. Am J Respir Crit Care Med, 2003; 168: 487–493

140. Maron BA, Zhang YY, White K, Chan SY, Handy DE, Mahoney CE, Loscalzo J, Leopold JA. *Aldosterone inactivates the endothelin-B receptor via a cysteinyl thiol redox switch to decrease pulmonary endothelial nitric oxide levels and modulate pulmonary arterial hypertension*. Circulation, 2012; 126: 963–974
141. Matori H, Umar S, Nadadur RD, Sharma S, Partow-Navid R, Afkhami M, Amjedi M, Eghbali M. *Genistein, a soy phytoestrogen, reverses severe pulmonary hypertension and prevents right heart failure in rats*. Hypertension, 2012; 60: 425–430
142. Mawatari E, Hongo M, Sakai A, Terasawa F, Takahashi M, Yazaki Y, Kinoshita O, Ikeda U. *Amlodipine prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension and prolongs survival in rats independent of blood pressure lowering*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007; 34: 594–600
143. Maxová H, Hezinová A, Vízek M. *Disodium cromoglycate attenuates hypoxia induced enlargement of end-expiratory lung volume in rats*. Physiol Res, 2011; 60: 831–834
144. Maxová H, Vasilková M, Novotná J, Vajnerová O, Bansová A, Vízek M, Herget J. *Prevention of mast cell degranulation by disodium cromoglycate delayed the regression of hypoxic pulmonary hypertension in rats*. Respiration, 2010; 80: 335–339
145. McMurtry MS, Bonnet S, Michelakis ED, Bonnet S, Haromy A, Archer SL. *Statin therapy, alone or with rapamycin, does not reverse monocrotaline pulmonary arterial hypertension: the rapamycin-atorvastatin-simvastatin study*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007; 293: L933–L940
146. Medarametla V, Festin S, Sugarragchaa C, Eng A, Naqwi A, Wiedmann T, Zisman LS. *PK10453, a nonselective platelet-derived growth factor receptor inhibitor, prevents the progression of pulmonary arterial hypertension*. Pulm Circ, 2014; 4: 82–102
147. Megalou AJ, Glava C, Oikonomidis DL, Vilaeti A, Agelaki MG, Baltogiannis GG, Papalois A, Vlahos AP, Kolettis TM. *Transforming growth factor- β inhibition attenuates pulmonary arterial hypertension in rats*. Int J Clin Exp Med, 2010; 3: 332–340
148. Megalou AJ, Glava C, Vilaeti AD, Oikonomidis DL, Baltogiannis GG, Papalois A, Vlahos AP, Kolettis TM. *Transforming growth factor- β inhibition and endothelin receptor blockade in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. Pulm Circ, 2012; 2: 461–469
149. Mei Y, Jin H, Tian W, Wang H, Wang H, Zhao Y, Zhang Z, Meng F. *Urantide alleviates monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension in Wistar rats*. Pulm Pharmacol Ther, 2011; 24: 386–393
150. Michelakis ED, McMurtry MS, Wu XC, Dyck JR, Moudgil R, Hopkins TA, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Waite R, Archer SL. *Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels*. Circulation, 2002; 105: 244–250
151. Mitani Y, Maruyama K, Sakurai M. *Prolonged administration of L-arginine ameliorates chronic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats*. Circulation, 1997; 96: 689–697
152. Miyata M, Ito M, Sasajima T, Ohira H, Sato Y, Kasukawa R. *Development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension is attenuated by a serotonin receptor antagonist*. Lung, 2000; 178: 63–73
153. Morales-Cano D, Menendez C, Moreno E, Moral-Sanz J, Barreira B, Galindo P, Pandolfi R, Jimenez R, Moreno L, Cogolludo A, Duarte J, Perez-Vizcaino F. *The flavonoid quercetin reverses pulmonary hypertension in rats*. PLoS One, 2014; 9: e114492
154. Morecroft I, Pang L, Baranowska M, Nilsen M, Loughlin L, Dempsey Y, Millet C, MacLean MR. *In vivo effects of a combined 5-HT_{1B} receptor/SERT antagonist in experimental pulmonary hypertension*. Cardiovasc Res, 2010; 85: 593–603
155. Morel OE, Buvry A, Le Corvoisier P, Tual L, Favret F, León-Velarde F, Crozatier B, Richalet JP. *Effects of nifedipine-induced pulmonary vasodilatation on cardiac receptors and protein kinase C isoforms in the chronically hypoxic rat*. Pflugers Arch, 2003; 446: 356–364

156. Morin C, Hiram R, Rousseau E, Blier PU, Fortin S. *Docosapentaenoic acid monoacylglyceride reduces inflammation and vascular remodeling in experimental pulmonary hypertension*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014; 307: H574–H586
157. Mouchaers KT, Schalij I, de Boer MA, Postmus PE, van Hinsbergh VW, van Nieuw Amerongen GP, Vonk Noordegraaf A, van der Laarse WJ. *Fasudil reduces monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: comparison with bosentan and sildenafil*. Eur Respir J, 2010; 36: 800–807
158. Mourelle M, Martin MT, Giménez F. *Treatment with LA-419 prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension and lung injury in the rat*. Proc West Pharmacol Soc, 2011; 54: 89–93
159. Murata T, Kinoshita K, Hori M, Kuwahara M, Tsubone H, Karaki H, Ozaki H. *Statin protects endothelial nitric oxide synthase activity in hypoxia-induced pulmonary hypertension*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005; 25: 2335–2342
160. Murugesan P, Hildebrandt T, Bernlöhner C, Lee D, Khang G, Doods H, Wu D. *Inhibition of kinin B1 receptors attenuates pulmonary hypertension and vascular remodeling*. Hypertension, 2015; 66: 906–912
161. Nagata T, Uehara Y, Hara K, Igarashi K, Hazama H, Hisada T, Kimura K, Goto A, Omata M. *Thromboxane inhibition and monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. Respirology, 1997; 2: 283–289
162. Nagaya N, Okumura H, Uematsu M, Shimizu W, Ono F, Shirai M, Mori H, Miyatake K, Kangawa K. *Repeated inhalation of adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003; 285: H2125–H2131
163. Nakamura A, Nagaya N, Obata H, Sakai K, Sakai Y, Yoshikawa M, Hamada K, Matsumoto K, Kimura H. *Oral administration of a novel long-acting prostacyclin agonist with thromboxane synthase inhibitory activity for pulmonary arterial hypertension*. Circ J, 2013; 77: 2127–2133
164. Nakata TM, Tanaka R, Yoshiyuki R, Fukayama T, Goya S, Fukushima R. *Effects of single drug and combined short-term administration of sildenafil, pimobendan, and nicorandil on right ventricular function in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. J Cardiovasc Pharmacol, 2015; 65: 640–648
165. Nickel NP, Spiekerkoetter E, Gu M, Li CG, Li H, Kaschwich M, Diebold I, Hennigs JK, Kim KY, Miyagawa K, Wang L, Cao A, Sa S, Jiang X, Stockstill RW, Nicolls MR, Zamanian RT, Bland RD, Rabinovitch M. *Elafin reverses pulmonary hypertension via caveolin-1-dependent bone morphogenetic protein signaling*. Am J Respir Crit Care Med, 2015; 191: 1273–1286
166. Nisbet RE, Bland JM, Kleinhenz DJ, Mitchell PO, Walp ER, Sutliff RL, Hart CM. *Rosiglitazone attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in a mouse model*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010; 42: 482–490
167. Nishida M, Hasegawa Y, Tanida I, Nakagawa E, Inaji H, Ohkita M, Matsumura Y. *Preventive effects of raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in intact and ovariectomized female rats*. Eur J Pharmacol, 2009; 614: 70–76
168. Nishimura T, Faul JL, Berry GJ, Veve I, Pearl RG, Kao PN. *40-O-(2-hydroxyethyl)-rapamycin attenuates pulmonary arterial hypertension and neointimal formation in rats*. Am J Respir Crit Care Med, 2001; 163: 498–502
169. 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
170. Nong Z, Stassen JM, Moons L, Collen D, Janssens S. *Inhibition of tissue angiotensin-converting enzyme with quinapril reduces hypoxic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling*. Circulation, 1996; 94: 1941–1947
171. 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
172. Onat AM, Pehlivan Y, Turkbeyler IH, Demir T, Kaplan DS, Ceribasi AO, Orkmez M, Tutar E, Taysi S, Sayarlioglu M, Kisacik B. *Urotensin inhibition with palosuran could be a promising alternative in pulmonary arterial hypertension*. Inflammation, 2013; 36: 405–412

173. Ono S, Westcott JY, Voelkel NF. *PAF antagonists inhibit pulmonary vascular remodeling induced by hypobaric hypoxia in rats*. J Appl Physiol, 1992; 73:1084–1092
174. Ono S, Voelkel NF. *PAF receptor blockade inhibits lung vascular changes in the rat monocrotaline model*. Lung, 1992; 170: 31–40
175. Ou ZJ, Wei W, Huang DD, Luo W, Luo D, Wang ZP, Zhang X, Ou JS. *L-arginine restores endothelial nitric oxide synthase-coupled activity and attenuates monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension in rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010; 298: E1131–E1139
176. Paffett ML, Channell MM, Naik JS, Lucas SN, Campen MJ. *Cardiac and Vascular Atrogin-1 mRNA expression is not associated with dexamethasone efficacy in the monocrotaline model of pulmonary hypertension*. Cardiovasc Toxicol, 2012; 12: 226–234
177. Paffett ML, Lucas SN, Campen MJ. *Resveratrol reverses monocrotaline-induced pulmonary vascular and cardiac dysfunction: a potential role for atrogin-1 in smooth muscle*. Vascu Pharmacol, 2012; 56: 64–73
178. Pankey EA, Badejo AM, Casey DB, Lasker GF, Riehl RA, Murthy SN, Nossaman BD, Kadowitz PJ. *Effect of chronic sodium nitrite therapy on monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. Nitric Oxide, 2012; 27: 1–8
179. Pankey EA, Thammasiboon S, Lasker GF, Baber S, Lasky JA, Kadowitz PJ. *Imatinib attenuates monocrotaline pulmonary hypertension and has potent vasodilator activity in pulmonary and systemic vascular beds in the rat*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013; 305: H1288–H1296
180. Pehlivan Y, Dokuyucu R, Demir T, Kaplan DS, Koc I, Orkmez M, Turkbeyler IH, Ceribasi AO, Tutar E, Taysi S, Kisacik B, Onat AM. *Palosuran treatment effective as bosentan in the treatment model of pulmonary arterial hypertension*. Inflammation, 2014; 37: 1280–1288
181. Pei JM, Sun X, Guo HT, Ma S, Zang YM, Lu SY, Bi H, Wang YM, Ma H, Ma XL. *U50,488H depresses pulmonary pressure in rats subjected to chronic hypoxia*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006; 47: 594–598
182. Pei Y, Ma P, Wang X, Zhang W, Zhang X, Zheng P, Yan L, Xu Q, Dai G. *Rosuvastatin attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension via regulation of Akt/eNOS signaling and asymmetric dimethylarginine metabolism*. Eur J Pharmacol, 2011; 666: 165–172
183. Pereira SL, Kummerle AE, Fraga CA, Barreiro EJ, Rocha Nde N, Ferraz EB, do Nascimento JH, Sudo RT, Zapata-Sudo G. *A novel Ca²⁺ channel antagonist reverses cardiac hypertrophy and pulmonary arteriolar remodeling in experimental pulmonary hypertension*. Eur J Pharmacol, 2013; 702: 316–322
184. Perros F, Ranchoux B, Izikki M, Bentebbal S, Happé C, Antigny F, Jourdon P, Dorfmueller P, Lecerf F, Fadel E, Simonneau G, Humbert M, Bogaard HJ, Eddahibi S. *Nebivolol for improving endothelial dysfunction, pulmonary vascular remodeling, and right heart function in pulmonary hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2015; 65: 668–681
185. Pichon A, Connes P, Quidu P, Marchant D, Brunet J, Levy BI, Vilar J, Safeukui I, Cymbalista F, Maignan M, Richalet JP, Favret F. *Acetazolamide and chronic hypoxia: effects on haemorheology and pulmonary haemodynamics*. Eur Respir J, 2012; 40: 1401–1409
186. Pidgeon GP, Tamosiuniene R, Chen G, Leonard I, Belton O, Bradford A, Fitzgerald DJ. *Intravascular thrombosis after hypoxia-induced pulmonary hypertension: regulation by cyclooxygenase-2*. Circulation, 2004; 110: 2701–2707
187. Polonio IB, Acencio MM, Pazetti R, Almeida FM, Silva BS, Pereira KA, Souza R. *Lodenafil treatment in the monocrotaline model of pulmonary hypertension in rats*. J Bras Pneumol, 2014; 40: 421–424
188. Porvasnik SL, Germain S, Embury J, Gannon KS, Jacques V, Murray J, Byrne BJ, Shacham S, Al-Mousily F. *PRX-08066, a novel 5-hydroxytryptamine receptor 2B antagonist, reduces monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension and right ventricular hypertrophy in rats*. J Pharmacol Exp Ther, 2010; 334: 364–372
189. Preston IR, Sagliani KD, Warburton RR, Hill NS, Fanburg BL, Jaffe IZ. *Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates experimental pulmonary hypertension*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013; 304: L678–L688

190. Price LC, Montani D, Tcherakian C, Dorfmueller P, Souza R, Gambaryan N, Chaumais MC, Shao DM, Simonneau G, Howard LS, Adcock IM, Wort SJ, Humbert M, Perros F. *Dexamethasone reverses monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats*. Eur Respir J, 2011; 37: 813–822
191. Pullamsetti S, Krick S, Yilmaz H, Ghofrani HA, Schudt C, Weissmann N, Fuchs B, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. *Inhaled tolafertrine reverses pulmonary vascular remodeling via inhibition of smooth muscle cell migration*. Respir Res, 2005; 6: 128
192. Pullamsetti SS, Savai R, Schaefer MB, Wilhelm J, Ghofrani HA, Weissmann N, Schudt C, Fleming I, Mayer K, Leiper J, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. *cAMP phosphodiesterase inhibitors increases nitric oxide production by modulating dimethylarginine dimethylaminohydrolases*. Circulation, 2011; 123: 1194–1204
193. Qi J, Du J, Zhao B. *The mechanism responsible for alleviation of hypoxic pulmonary vascular structural remodeling by L-arginine*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2000; 80: 214–218
194. Qi J, Du J, Wang L, Zhao B, Tang C. *Alleviation of hypoxic pulmonary vascular structural remodeling by L-arginine*. Chin Med J, 2001; 114: 933–936
195. Quinn DA, Du HK, Thompson BT, Hales CA. *Amiloride analogs inhibit chronic hypoxic pulmonary hypertension*. Am J Respir Crit Care Med, 1998; 157: 1263–1268
196. Rakotoniana Z, Guerard P, Lirussi F, Goirand F, Rochette L, Dumas M, Bardou M. *The protective effect of HMG-CoA reductase inhibitors against monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the rat might not be a class effect: comparison of pravastatin and atorvastatin*. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 2006; 374: 195–206
197. Rakotoniana Z, Guerard P, Lirussi F, Rochette L, Dumas M, Goirand F, Bardou M. *Celecoxib but not the combination of celecoxib+atorvastatin prevents the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the rat*. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 2008; 378: 241–251
198. Rocchetti M, Sala L, Rizzetto R, Staszewsky LI, Alemanni M, Zambelli V, Russo I, Barile L, Cornaghi L, Altomare C, Ronchi C, Mostacciuolo G, Lucchetti J, Gobbi M, Latini R, Zaza A. *Ranolazine prevents INaL enhancement and blunts myocardial remodelling in a model of pulmonary hypertension*. Cardiovasc Res, 2014; 104: 37–48
199. Sahara M, Sata M, Morita T, Hirata Y, Nagai R. *Nicorandil attenuates monocrotaline-induced vascular endothelial damage and pulmonary arterial hypertension*. PLoS One, 2012; 7: e33367
200. Samillan V, Haider T, Vogel J, Leuenberger C, Brock M, Schwarzwald C, Gassmann M, Ostergaard L. *Combination of erythropoietin and sildenafil can effectively attenuate hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice*. Pulm Circ, 2013; 3: 898–907
201. Satoh M, Satoh A. *3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors and phosphodiesterase type V inhibitors attenuate right ventricular pressure and remodeling in a rat model of pulmonary hypertension*. J Pharm Pharm Sci, 2009; 11: 118s–130s
202. Sawada H, Mitani Y, Maruyama J, Jiang BH, Ikeyama Y, Dida FA, Yamamoto H, Imanaka-Yoshida K, Shimpo H, Mizoguchi A, Maruyama K, Komada Y. *A nuclear factor-kappaB inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate ameliorates pulmonary hypertension in rats*. Chest, 2007; 132: 1265–1274
203. Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Samidurai A, Pullamsetti S, Weissmann N, Schudt C, Ermert L, Seeger W, Grimminger F. *Antiremodeling effects of iloprost and the dual-selective phosphodiesterase 3/4 inhibitor tolafertrine in chronic experimental pulmonary hypertension*. Circ Res, 2004; 94: 1101–1108
204. Schwenke DO, Tokudome T, Shirai M, Hosoda H, Horio T, Kishimoto I, Kangawa K. *Exogenous ghrelin attenuates the progression of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in conscious rats*. Endocrinology, 2008; 149: 237–244
205. Shen L, Shen J, Pu J, He B. *Aspirin attenuates pulmonary arterial hypertension in rats by reducing plasma 5-hydroxytryptamine levels*. Cell Biochem Biophys, 2011; 61: 23–31
206. Shi K, Qiao LN, Liu B, Zhao SS, Zhou TF, Wang XM, Wei L, Liu HM, Hua YM. *Effect of doxycycline on the development of pulmonary hypertension induced by four methods in rats*. Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2009; 47: 260–264

207. Sun X, Ku DD. *Rosuvastatin provides pleiotropic protection against pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy, and coronary endothelial dysfunction in rats.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008; 294: H801–H809
208. Sun XZ, Shu-Yan Li, Xiang-Yang Tian, Qing-Quan Wu. *Effect of fasudil on hypoxic pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy in rats.* Int J Clin Exp Pathol 2015; 8: 9517–9521.
209. Sun XZ, Tian XY, Wang DW, Li J. *Effects of fasudil on hypoxic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats.* Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014; 18: 959–964
210. Suzuki C, Takahashi M, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Hongo M, Hoshikawa Y, Ito T, Miyashita H, Kobayashi E, Shimada K, Ikeda U. *Mycophenolate mofetil attenuates pulmonary arterial hypertension in rats.* Biochem Biophys Res Commun, 2006; 349: 781–788.
211. Suzuki R, Maehara R, Kobuchi S, Tanaka R, Ohkita M, Matsumura Y. *Beneficial effects of γ -aminobutyric acid on right ventricular pressure and pulmonary vascular remodeling in experimental pulmonary hypertension.* Life Sci, 2012; 91: 693–698
212. Takahashi T, Kanda T, Imai S, Suzuki T, Kobayashi I, Murata K. *Semotiadil inhibits the development of right ventricular hypertrophy and medial thickening of pulmonary arteries in a rat model of pulmonary hypertension.* Cardiovasc Drugs Ther, 1995; 9: 809–814
213. Takahashi T, Kanda T, Inoue M, Suzuki T, Kobayashi I, Kodama K, Nagai R. *A selective type V phosphodiesterase inhibitor, E4021, protects the development of right ventricular overload and medial thickening of pulmonary arteries in a rat model of pulmonary hypertension.* Life Sci, 1996; 59: 371–377
214. Tan JX, Chen XM, Fang X, Tao MJ, Huang XL. *Effects of continuous adenosine infusion on pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats.* Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2008; 28: 1052–1055
215. Tan JX, Huang XL, Wang B, Fang X, Huang DN. *Adenosine receptors agonists mitigated PAH of rats induced by chronic hypoxia through reduction of renin activity/angiotensin II levels and increase of inducible nitric oxide synthase-nitric oxide levels.* Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2012; 50: 782–787
216. Tang B, Chen GX, Liang MY, Yao JP, Wu ZK. *Ellagic acid prevents monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension via inhibiting NLRP3 inflammasome activation in rats.* Int J Cardiol, 2015; 180: 134–141
217. Thompson JS, Sheedy W, Morice AH. *Effects of the neutral endopeptidase inhibitor, SCH 42495, on the cardiovascular remodelling secondary to chronic hypoxia in rats.* Clin Sci, 1994; 87: 109–114
218. Thompson JS, Sheedy W, Morice AH. *Neutral endopeptidase (NEP) inhibition in rats with established pulmonary hypertension secondary to chronic hypoxia.* Br J Pharmacol, 1994; 113: 1121–1126
219. Tian X, Vroom C, Ghofrani HA, Weissmann N, Bieniek E, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT, Pullamsetti SS. *Phosphodiesterase 10A upregulation contributes to pulmonary vascular remodeling.* PLoS One, 2011; 6: e18136
220. Tofovic SP, Jones T, Petrusevska G. *Dose-dependent therapeutic effects of 2-Methoxyestradiol on Monocrotaline-Induced pulmonary hypertension and vascular remodelling.* Prilozi, 2010; 31: 279–295
221. Tofovic SP, Jones TJ, Bilan VP, Jackson EK, Petrusevska G. *Synergistic therapeutic effects of 2-methoxyestradiol with either sildenafil or bosentan on amelioration of monocrotaline-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling.* J Cardiovasc Pharmacol, 2010; 56: 475–483
222. Tofovic SP, Salah EM, Mady HH, Jackson EK, Melhem MF. *Estradiol metabolites attenuate monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats.* J Cardiovasc Pharmacol, 2005; 46: 430–437
223. Tofovic SP, Zhang X, Zhu H, Jackson EK, Rafikova O, Petrusevska G. *2-Ethoxyestradiol is antimitogenic and attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling.* Vascu Pharmacol, 2008; 48: 174–183

224. Tual L, Morel OE, Favret F, Fouillit M, Guernier C, Buvry A, Germain L, Dhonneur G, Bernaudin JF, Richalet JP. *Carvedilol inhibits right ventricular hypertrophy induced by chronic hypobaric hypoxia*. Pflugers Arch, 2006; 452: 371–379
225. Umar S, Iorga A, Matori H, Nadadur RD, Li J, Maltese F, van der Laarse A, Eghbali M. *Estrogen rescues preexisting severe pulmonary hypertension in rats*. Am J Respir Crit Care Med, 2011; 184: 715–723
226. Uzun O, Balbay O, Comunoglu NU, Yavuz O, Nihat Annakkaya A, Güler S, Silan C, Erbaş M, Arbak P. *Hypobaric-hypoxia-induced pulmonary damage in rats ameliorated by antioxidant erdosteine*. Acta Histochem, 2006; 108: 59–68
227. Villegas LR, Kluck D, Field C, Oberley-Deegan RE, Woods C, Yeager ME, El Kasmi KC, Savani RC, Bowler RP, Nozik-Grayck E. *Superoxide dismutase mimetic, MnTE-2-PyP, attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, pulmonary vascular remodeling, and activation of the NALP3 inflammasome*. Antioxid Redox Signal, 2013; 18: 1753–1764
228. Wang AP, Li XH, Yang YM, Li WQ, Zhang W, Hu CP, Zhang Z, Li YJ. *A Critical Role of the mTOR/eIF2 α Pathway in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension*. PLoS One, 2015; 10: e0130806
229. Wang HL, Zhang XH, Jin X, Xing J, Zhang DR. *Tetrandrine inhibited chronic "inflammatory" pulmonary hypertension in rats*. Zhongguo Yao Li Xue Bao, 1997; 18: 401–404
230. Wang HM, Wang Y, Liu M, Bai Y, Zhang XH, Sun YX, Wang HL. *Fluoxetine inhibits monocrotaline-induced pulmonary arterial remodeling involved in inhibition of RhoA-Rho kinase and Akt signalling pathways in rats*. Can J Physiol Pharmacol, 2012; 90: 1506–1515
231. Wang J, Jiang Q, Wan L, Yang K, Zhang Y, Chen Y, Wang E, Lai N, Zhao L, Jiang H, Sun Y, Zhong N, Ran P, Lu W. *Sodium tanshinone IIA sulfonate inhibits canonical transient receptor potential expression in pulmonary arterial smooth muscle from pulmonary hypertensive rats*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013; 48: 125–134
232. Wang LX, Sun Y, Chen C, Huang XY, Lin Q, Qian GQ, Dong W, Chen YF. *Effects and mechanism of oridonin on pulmonary hypertension induced by chronic hypoxia-hypercapnia in rats*. Chin Med J, 2009; 122: 1380–1387
233. Wang SH, Liu S, Yang JH, Wang ZZ, Li J, Hou WW. *Protective effects of beraprost plus simvastatin on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2013; 93: 1691–1695
234. Wang W, Wang YL, Chen XY, Li YT, Hao W, Jin YP, Han B. *Dexamethasone attenuates development of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension*. Mol Biol Rep, 2011; 38: 3277–3284
235. Wang X, Yang Y, Yang D, Tong G, Lv S, Lin X, Chen C, Dong W. *Tetrandrine prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats through regulation of the protein expression of inducible nitric oxide synthase and cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase type 1*. J Vasc Surg, 2016; 64: 1468–1477
236. Wang XB, Wang W, Zhu XC, Ye WJ, Cai H, Wu PL, Huang XY, Wang LX. *The potential of asiaticoside for TGF- β 1/Smad signaling inhibition in prevention and progression of hypoxia-induced pulmonary hypertension*. Life Sci, 2015; 137: 56–64
237. Wang XF, Lu WX, Guo J, Li G, Zhang YJ. *Protective effects of rosiglitazone intervention on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats and related inflammatory mechanisms*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2012; 92: 2144–2147
238. Wang Y, Han DD, Wang HM, Liu M, Zhang XH, Wang HL. *Downregulation of osteopontin is associated with fluoxetine amelioration of monocrotaline-induced pulmonary inflammation and vascular remodelling*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011; 38: 365–372
239. Wang Y, Zhang XH, Wang HL. *Involvement of BMPR2 in the protective effect of fluoxetine against monocrotaline-induced endothelial apoptosis in rats*. Can J Physiol Pharmacol, 2011; 89: 345–354
240. Wei L, Liu T, Liu B, Wang XM, Zhao L, Zhou TF. *Effect of triptolide on the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in lungs of experimental pulmonary hypertension*. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi, 2007; 9: 479–483

241. Weissmann N, Hackemack S, Dahal BK, Pullamsetti SS, Savai R, Mittal M, Fuchs B, Medebach T, Dumitrascu R, Eickels Mv, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. *The soluble guanylate cyclase activator HMR1766 reverses hypoxia-induced experimental pulmonary hypertension in mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009; 297: L658–L665
242. Wu JR, Kao LP, Wu BN, Dai ZK, Wang YY, Chai CY, Chen IJ. *Buffered l-ascorbic acid, alone or bound to KMUP-1 or sildenafil, reduces vascular endothelium growth factor and restores endothelium nitric oxide synthase in hypoxic pulmonary artery*. Kaohsiung J Med Sci, 2015; 31: 241–254
243. Wu Q, Wang HY, Li J, Zhou P, Wang QL, Zhao L, Fan R, Wang YM, Xu XZ, Yi DH, Yu SQ, Pei JM. *κ -opioid receptor stimulation improves endothelial function in hypoxic pulmonary hypertension*. PLoS One, 2013; 8: e60850
244. Xia XQ, Cheng DY, Guan J, Chen XJ. *Preventive effects of urapidil on hypoxic pulmonary hypertension in rats*. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2004; 35: 71–73
245. Xie L, Lin P, Xie H, Xu C. *Effects of atorvastatin and losartan on monocrotaline-induced pulmonary artery remodeling in rats*. Clin Exp Hypertens, 2010; 32: 547–554
246. Xie W, Wang H, Wang H, Hu G. *Effects of iptakalim hydrochloride, a novel KATP channel opener, on pulmonary vascular remodeling in hypoxic rats*. Life Sci, 2004; 75: 2065–2076
247. Xie X, Wang G, Zhang D, Zhang Y, Zhu Y, Li F, Li S, Li M. *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ ameliorates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats*. Biomed Rep, 2015; 3: 537–542
248. Xin Y, Lv JQ, Wang YZ, Zhang J, Zhang X. *Effect of all-trans retinoic acids (ATRA) on the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) in the lung tissues of rats with pulmonary arterial hypertension (PAH)*. Genet Mol Res, 2015; 14: 14308–14313
249. Xu DQ, Luo Y, Liu Y, Wang J, Zhang B, Xu M, Wang YX, Dong HY, Dong MQ, Zhao PT, Niu W, Liu ML, Gao YQ, Li ZC. *Beta-estradiol attenuates hypoxic pulmonary hypertension by stabilizing the expression of p27kip1 in rats*. Respir Res, 2010; 11: 182
250. Yamada Y, Maruyama J, Zhang E, Okada A, Yokochi A, Sawada H, Mitani Y, Hayashi T, Suzuki K, Maruyama K. *Effect of thrombomodulin on the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. J Anesth, 2014; 28: 26–33
251. Yan J, Chen R, Liu P, Gu Y. *Docosahexaenoic acid inhibits development of hypoxic pulmonary hypertension: in vitro and in vivo studies*. Int J Cardiol, 2013; 168: 4111–4116
252. Yang DL, Zhang HG, Xu YL, Gao YH, Yang XJ, Hao XQ, Li XH. *Resveratrol inhibits right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline in rats*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010; 37: 150–155
253. Yang H, Xu Y, Zhang Z. *The effect of ginkgo biloba on hypoxic pulmonary hypertension and the role of protein kinase C*. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2000; 23: 602–605
254. Yang L, Zheng BX, Cheng DY, Su QL, Fan LL, Yang YJ, Mu M, Chen WB. *The effect of breviscapine on the pulmonary arterial pressure and the expression of Rho-kinase in pulmonary arterioles of hypoxic rats*. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2008; 31: 826–830
255. Yang PS, Kim DH, Lee YJ, Lee SE, Kang WJ, Chang HJ, Shin JS. *Glycyrrhizin, inhibitor of high mobility group box-1, attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in rats*. Respir Res, 2014; 15: 148
256. Yavuz T, Uzun O, Macit A, Comunoglu C, Yavuz O, Silan C, Yuksel H, Yildirim HA. *Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension*. Pathol Res Pract, 2013; 209: 302–308
257. Yin Y, Wu X, Yang Z, Zhao J, Wang X, Zhang Q, Yuan M, Xie L, Liu H, He Q. *The potential efficacy of R8-modified paclitaxel-loaded liposomes on pulmonary arterial hypertension*. Pharm Res, 2013; 30: 2050–2062
258. Yu J, Feng HS, Chen BY, Qu P, Liu LB, Chen JK, Tie R, Huang XJ, Zhao YF, Zhu XX, Zhu MZ. *Protective effects of vasonatin peptide against hypobaric hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010; 37: 69–74
259. Yu L, Fan ZY, Xie L, Li CY, Qin CY, Liu LJ, Liu HM. *Mechanisms for reversal of pulmonary hypertension by rapamycin in rats*. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi, 2015; 17: 731–735

260. Yuyama H, Fujimori A, Sanagi M, Koakutsu A, Noguchi Y, Sudoh K, Sasamata M, Miyata K. *A novel and selective endothelin ET(A) receptor antagonist YM598 prevents the development of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats*. *Vascul Pharmacol*, 2005; 43: 40–46
261. Zambelli V, Santaniello A, Fumagalli F, Masson S, Scorza R, Beretta L, Latini R. *Efficacy of aminaftone in a rat model of monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. *Eur J Pharmacol*, 2011; 667: 287–291
262. Zapata-Sudo G, Pontes LB, da Silva JS, Lima LM, Nunes IK, Barreiro EJ, Sudo RT. *Benzenesulfonamide attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in a rat model*. *Eur J Pharmacol*, 2012; 690: 176–182
263. Zeng Z, Huang H, Li X. *The effect and mechanism of felodipine on monocrotaline induced pulmonary hypertension in rats*. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 2002; 25: 461–464
264. Zhai FG, Zhang XH, Wang HL. *Fluoxetine protects against monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: potential roles of induction of apoptosis and upregulation of Kv1.5 channels in rats*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009; 36: 850–856
265. Zhang B, Niu W, Xu D, Li Y, Liu M, Wang Y, Luo Y, Zhao P, Liu Y, Dong M, Sun R, Dong H, Li Z. *Oxymatrine prevents hypoxia and monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. *Free Radic Biol Med*, 2014; 69: 198–207
266. Zhang D, Wang G, Han D, Zhang Y, Xu J, Lu J, Li S, Xie X, Liu L, Dong L, Li M. *Activation of PPAR- γ ameliorates pulmonary arterial hypertension via inducing heme oxygenase-1 and p21(WAF1): an in vivo study in rats*. *Life Sci*, 2014; 98: 39–43
267. Zhang E, Maruyama J, Yokochi A, Mitani Y, Sawada H, Nishikawa M, Ma N, Maruyama K. *Sarpogrelate hydrochloride, a serotonin 5HT_{2A} receptor antagonist, ameliorates the development of chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats*. *J Anesth*, 2015; 29: 715–723
268. Zhang E, Jiang B, Yokochi A, Maruyama J, Mitani Y, Ma N, Maruyama K. *Effect of all-trans-retinoic acid on the development of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension*. *Circ J*, 2010; 74: 1696–1703
269. Zhang L, Pu Z, Wang J, Zhang Z, Hu D, Wang J. *Baicalin inhibits hypoxia-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation via the AKT/HIF-1 α /p27-associated pathway*. *Int J Mol Sci*, 2014; 15: 8153–8168
270. Zhang L, Li J, Shi Q, Fan R, Kaye AJ, Wang Y, Sun X, Rivera FB, Kaye AD, Pei J. *Role of κ -opioid receptor in hypoxic pulmonary artery hypertension and its underlying mechanism*. *Am J Ther*, 2013; 20: 329–336
271. Zhang LL, Lu J, Li MT, Wang Q, Zeng XF. *Preventive and remedial application of etanercept attenuate monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension*. *Int J Rheum Dis*, 2016; 19: 192–198
272. Zhang WH, Liu CP, Zhang YJ, Ji YQ, Lu WX, Zeng Q. *Additive effect of tadalafil and simvastatin on monocrotaline-induced pulmonary hypertension rats*. *Scand Cardiovasc J*, 2012; 46: 374–380
273. Zhang WH, Lu WX, Zhang YJ, Ji YQ, Liu CP, Li G. *Simvastatin prevents the development of pulmonary hypertension in the rats through reduction of inflammation*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2009; 89: 855–859
274. Zhang Y, Dai L, Wu S, Chen P, Zhao S. *Atorvastatin attenuates involvement of RhoA/Rho-kinase pathway and NF- κ B activation in hypoxic pulmonary hypertensive rats*. *Chin Med J*, 2014; 127: 869–872
275. Zhang Y, Xie X, Zhu Y, Liu L, Feng W, Pan Y, Zhai C, Ke R, Li S, Song Y, Fan Y, Fan F, Wang X, Li F, Li M. *Inhibition of Notch3 prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension*. *Exp Lung Res*, 2015; 41: 435–443
276. Zhang Y, Wang D, Zhu T, Li C. *Genistein attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats by up-regulating heme oxygenase-1 expression*. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2012; 32: 151–154
277. Zhang YF, Zheng Y. *The effects of mycophenolate mofetil on cytokines and their receptors in pulmonary arterial hypertension in rats*. *Scand J Rheumatol*, 2015; 44: 412–415

278. Zhao L, Sebkhi A, Ali O, Wojciak-Stothard B, Mamanova L, Yang Q, Wharton J, Wilkins MR. *Simvastatin and sildenafil combine to attenuate pulmonary hypertension*. Eur Respir J, 2009; 34: 948–957
279. Zhao L, al Tubuly R, Sebkhi A, Owji AA, Nunez DJ, Wilkins MR. *Angiotensin II receptor expression and inhibition in the chronically hypoxic rat lung*. Br J Pharmacol, 1996; 119: 1217–1222
280. Zhao S, Zheng MX, Chen HE, Wu CY, Wang WT. *Effect of panax notoginseng saponins injection on the p38MAPK pathway in lung tissue in a rat model of hypoxic pulmonary hypertension*. Chin J Integr Med, 2015; 21: 147–151
281. Zheng L, Liu M, Wei M, Liu Y, Dong M, Luo Y, Zhao P, Dong H, Niu W, Yan Z, Li Z. *Tanshinone IIA attenuates hypoxic pulmonary hypertension via modulating KV currents*. Respir Physiol Neurobiol, 2015; 205: 120–128
282. Zhong X, Liang G, He Z. *Laboratory study on protective and therapeutic effects of pinacidil on pulmonary vascular remodeling in rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension*. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2000; 23: 727–729
283. Zhou KR, Lai YL. *Capsaicin pretreatment attenuates monocrotaline-induced ventilatory dysfunction and pulmonary hypertension*. J Appl Physiol, 1993; 75: 2781–2788
284. Zhou S, Li MT, Jia YY, Liu JJ, Wang Q, Tian Z, Liu YT, Chen HZ, Liu DP, Zeng XF. *Regulation of cell cycle regulators by SIRT1 contributes to resveratrol-mediated prevention of pulmonary arterial hypertension*. Biomed Res Int, 2015; 762349
285. Zhu R, Bi LQ, Wu SL, Li L, Kong H, Xie WP, Wang H, Meng ZL. *Iptakalim attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in rats by endothelial function protection*. Mol Med Rep, 2015; 12: 2945–2952
286. Zhu R, Bi L, Kong H, Xie W, Hong Y, Wang H. *Ruscogenin exerts beneficial effects on monocrotaline-induced pulmonary hypertension by inhibiting NF- κ B expression*. Int J Clin Exp Pathol, 2015; 8: 12169–12176
287. Zhu SP, Mao ZF, Huang J, Wang JY. *Continuous fluoxetine administration prevents recurrence of pulmonary arterial hypertension and prolongs survival in rats*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009; 36: e1–e5
288. Zopf DA, das Neves LA, Nikula KJ, Huang J, Senese PB, Gralinski MR. *C-122, a novel antagonist of serotonin receptor 5-HT_{2B}, prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats*. Eur J Pharmacol, 2011; 670: 195–203
289. Zuo X, Zong F, Wang H, Wang Q, Xie W, Wang H. *Iptakalim, a novel ATP-sensitive potassium channel opener, inhibits pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation by downregulation of PKC- α* . J Biomed Res, 2011; 25: 392–401
290. Zuo XR, Wang Q, Cao Q, Yu YZ, Wang H, Bi LQ, Xie WP, Wang H. *Nicorandil prevents right ventricular remodeling by inhibiting apoptosis and lowering pressure overload in rats with pulmonary arterial hypertension*. PLoS One, 2012; 7: e44485

Załącznik 2

Tabela 1. Charakterystyka zakwalifikowanych artykułów

Autor	Rok opublikowania	Gatunek	Rodzaj metody indukcji PH	Dawka induktora PH (mg/kg m.c.)	Czas trwania indukcji PH (dni)	Oceniane parametry
Abid S	2012	mysz	CH	-	14	RVSP, RVH
Agard C	2009	szczur	MCT/CH	60/-	30/21	mPAP, RVH
Ahmed L	2014	szczur	MCT	60	21	MABP, RVH, WT
Ahmed L	2014	szczur	MCT	60	21	MABP, RVH, WT
Akagi S	2015	szczur	MCT	60	21	RVSP, RVH
Alencar A	2013	szczur	MCT	60	28	RVSP, RVH
Alencar A	2014	szczur	MCT	60	28	RVSP
Al-Hiti H	2013	szczur	CH	-	21	CO, mPAP, RVH
Andersen C	2005	szczur	CH	-	14	MABP, RVSP, RVH
Bai Y	2014	szczur	MCT	60	21	RVSP, RVH
Baliga R	2008	szczur	CH	-	14	MABP, mPAP, RVH
Banasová A	2008	szczur	CH	-	21	CO, MABP, mPAP, RVH
Bauer E	2014	mysz	CH	-	21/42	RVSP, RVH
Bi LQ	2013	szczur	MCT	60	20	mPAP, RVSP, WT
Blumberg F	2001	szczur	CH	-	28	RVSP
Bogaard H	2010	szczur	Sugen 5416/MCT	20/60	56	CO, RVSP
Bonnet S	2003	szczur	CH	-	7/14/21	CO, mPAP, WT
Breitling S	2015	szczur	MCT	40	35	RVSP, RVH, WT
Bruce E	2015	szczur	MCT	50	28	RVSP, RVH, WT
Bubb K	2014	mysz	CH	-	21	MABP, RVSP, RVH
Chan M	2011	szczur	CH	-	21	RVH
Chang L	2008	szczur	MCT	75	90	RVSP, RVH

Tabela 1. cd

Chaumais M	2014	szczur	MCT	60	28	CO, mPAP, RVSP, RVH, TPR
Chen L	2011	szczur	MCT	60	28	RVSP, RVH
Chen W	2012	mysz	CH	-	14	RVSP, RVH
Chen X	2003	szczur	CH	-	21	RVH, WT
Chen XY	2008	szczur	MCT	60	28	MABP, mPAP, RVH
Cheng D	1996	szczur	CH	-	21	CO, MABP, mPAP, PVR, RVH, WT
Chung HH	2010	szczur	MCT	60	21	MABP, mPAP, RVH, WT
Church A	2015	szczur	MCT/CH	60/-	28	RVSP, RVH
Courboulin A	2012	szczur	MCT	60	28	CO, mPAP
Cowan K	2000	szczur	MCT	60	28	mPAP, RVH, WT
Crossno J	2007	szczur	CH	-	21	CO, mPAP, TPR
Csiszar A	2009	szczur	MCT	60	14/21	RVSP
Dahal B	2010	szczur/mysz	MCT/CH	60/-	35	RVSP, RVH, WT, TPR
Dai L	2011	szczur	CH	-	28	mPAP, RVH, WT
Dai Z	2010	szczur	MCT	60	21	MABP, RVSP, RVH
De Man F	2012	szczur	MCT	60	31	RVSP, RVH
De Raaf M	2014	szczur	Sugen 5416	20	28	RVSP
Delbeck M	2011	szczur	MCT	60	28	CO, RVSP, RVH
Dumitrascu R	2011	szczur	MCT	60	28	RVSP, RVH, WT
Eba S	2013	mysz	CH	-	21	RVSP, RVH, WT
Elias-Al-Mamun M	2014	szczur	MCT	60	21/63	RVSP, RVH
Elmedal B	2004	szczur	CH	-	14	MABP, RVSP, RVH
Fan Z	2015	szczur	CH	-	21	mPAP, RVH
Farhat M	1993	szczur	MCT	60	28	RVH, WT
Faul JL	2000	szczur	LP+MCT	60	28	mPAP, RVSP, RVH
Ferreira A	2009	szczur	MCT	50	28	RVSP, RVH, WT
Frump A	2015	szczur	Sugen 5416	20	49	CI, RVSP, RVH
Gao H	2012	szczur	MCT	50	41	mPAP, RVH, WT
Garat CV	2013	szczur	CH	-	21	CO, mPAP, RVH, TPR
Gary-Bobo G	2010	szczur	MCT	60	21/42	mPAP, RVH, WT
Girgis R	2003	szczur	CH	-	14	mPAP, RVH
Girgis R	2007	szczur	CH	-	14	MABP, mPAP, RVH

Tabela 1. cd

Green D	2012	mysz	CH	-	21	RVSP, RVH
Guerard P	2006	szczur	MCT	60	28	RVSP, RVH
Guignabert C	2005	szczur	MCT	60	21/42	MABP, mPAP, RVH
Hamidi S	2011	szczur	MCT	60	42	RVSP, RVH
Hampl V	2003	szczur	CH	-	28	CI, MABP, mPAP, RVH
Han DD	2012	szczur	MCT	60	21	mPAP, RVH, WT
Hara Y	2011	mysz	CH	-	35	RVSP, RVH
Harrington L	2010	szczur	CH	-	21	RVSP
He Y	2015	szczur	CH	-	28	MABP, RVSP, RVH, WT
Henriques-Coelho T	2006	szczur	MCT	60	21	RVSP
Herget J	2003	szczur	CH	-	21	CO, CI, MABP, mPAP, RVH
Hironaka E	2006	szczur	MCT	40	21/42	mPAP, RVH, WT
Hongo M	2005	szczur	MCT	50	21/42	MABP, mPAP, RVH, WT
Hosokawa S	2013	szczur	MCT	60	28	RVSP, RVH
Houssaini A	2013	szczur	MCT	60	21/28/42	mPAP, RVH
Hu H	2012	szczur	CH	-	28	mPAP, RVH
Huang X	2014	szczur	CH	-	28	mPAP, RVH
Huang X	2015	mysz	CH	-	28	MABP, RVSP, RVH
Huang Y	2009	szczur	CH	-	21	mPAP, RVH
Huh J	2011	mysz	CH	-	28	RVSP, RVH
Ilgin S	2012	szczur	MCT	60	42	RVP, RVH
Inoue H	2002	szczur	MCT	70	26	RVH
Ishikawa K	1995	szczur	MCT	50	28	MABP, RVP, RVH
Jacquin S	2015	szczur	MCT	60	14	mPAP, RVH
Jasińska-Stroschein M	2014	szczur	MCT	60	28	RVP, RVH
Jasińska-Stroschein M	2015	szczur	MCT	60	28	MABP,RVP, RVH
Jasińska-Stroschein M	2013	szczur	MCT	60	21	MABP,RVP, RVH
Jasińska-Stroschein M	2015	szczur	MCT	60	28	MABP,RVP, RVH
Jasińska-Stroschein M	2014	szczur	MCT	60	21	RVP, RVH
Jeffery T	1999	szczur	CH	-	28	mPAP, WT
Jeffery T	2001	szczur	CH	-	28	mPAP, WT
Jiang B	2007	szczur	CH	-	10	mPAP, RVH, WT
Jiang H	2013	szczur	MCT	50	56	mPAP. RVSP, RVH

Tabela 1. cd

Jiang L	2012	szczur	MCT	60	28	mPAP, RVH, WT
Jin H	2014	szczur	CH	-	28	RVSP, RVH, WT
Kameshima S	2015	szczur	MCT	60	14	mPAP, RVH
Kanai Y	1993	szczur	MCT	60	21	mPAP, RVH
Kanno S	2001	szczur	MCT	40	35	MABP, RVH
Kataoka M	2005	szczur	MCT	60	21	MABP, RVSP, RVH, WT
Kato T	2008	szczur	MCT	50	21	RVSP, RVH
Kazama K	2014	szczur	MCT	60	14	mPAP, RVH
Kim E	2010	szczur	CH	-	28	mPAP, RVH
Kim S	2012	szczur/mysz	MCT/CH	60/-	35	RVSP, RVH, WT
Klein M	2008	szczur	MCT	60	28	CI, MABP, RVSP, RVH
Klinger J	1998	szczur	CH	-	14	CI, MABP, RVH
Klinke A	2014	mysz	CH	-	28	RVSP, RVH
Kojonazarov B	2013	szczur	MCT	60	35	CI, RVSP, RVH, TPR
Kosanovic D	2011	szczur	MCT	60	35	CO, MABP, RVSP, TPR
Koyama M	2014	mysz	CH	-	28	RVSP, RVH
Kwon J	2013	szczur	MCT	60	1/5/7/14/28	RVP, RVH
Lahm T	2012	szczur	CH	-	14	CO, RVSP, RVH
Lai Y	1995	szczur	CH	-	14	mPAP, RVH
Lai Y	1998	szczur	CH	-	14	mPAP, RVH
Lan B	2015	szczur	MCT+CH	60	21/35	MABP, RVSP, RVH, WT
Laudi S	2007	szczur	MCT	60	28	RVSP, RVH
Laursen B	2008	szczur	CH	-	14	MABP, RVH
Lee D	2010	szczur	MCT	60	21	RVSP, RVH
Li G	2012	szczur	LP+MCT	40	7/14/21	mPAP, RVH
Li G	2013	szczur	LP+MCT	40	21	mPAP, RVH
Li H	2014	szczur	MCT	60	28	RVSP, RVH
Li J	2009	szczur	CH	-	14	mPAP, RVP, RVH, WT
Li J	2012	szczur	MCT	50	28	MABP, RVSP, RVH
Li J	2013	szczur	CH	-	14	RVP, RVH, WT
Li XL	2011	szczur	MCT	50	28/56	mPAP, RVH, WT
Li XL	2012	szczur	MCT	50	28/56	mPAP, RVH, WT
Li XQ	2006	szczur	MCT	60	21	MABP, mPAP, RVH
Li XW	2014	szczur	MCT	60	28	mPAP, RVSP, RVH

Tabela 1. cd

Li XW	2015	szczur	CH	-	28	mPAP, RVSP, RVH
Li XW	2015	szczur	MCT	60	28	mPAP, RVSP, RVH
Li XW	2015	szczur	MCT	60	28	mPAP, RVSP, RVH
Li Z	2002	szczur	MCT	60	28	MABP, mPAP, PVR, RVH
Liu B	2008	szczur	LP+MCT	60	28	mPAP, RVH, WT
Liu B	2009	szczur	LP+MCT	60	28	mPAP, RVH, WT
Liu B	2014	szczur	CH	-	28	mPAP, RVSP, RVH, WT
Liu C	2014	szczur	MCT	60	28	mPAP, RVH, WT
Liu M	2014	szczur	MCT/CH	60/-	35/42	MABP, RVSP, RVH, WT
Liu P	2015	szczur	CH	-	28	MABP, mPAP, RVH
Liu Y	2010	szczur	CH	-	21	MABP, RVSP, RVH
Liu Y	2012	szczur	MCT	60	21	RVH, WT
Liu Y	2013	szczur	MCT	60	22	mPAP, RVH
Liu Z	2011	szczur	LP+MCT	60	28	mPAP
Luan Y	2015	szczur	MCT	60	21	RVH, WT
Ma W	2011	szczur	MCT	60	21	RVSP, RVH
Mao S	2009	szczur	CH	-	28	MABP, mPAP, RVH
Marcos E	2003	mysz	CH	-	14	RVSP, RVH
Maron B	2012	szczur	MCT	50	24	CI, MABP, PVR
Matori H	2012	szczur	MCT	60	30	RVP, RVH
Mawatari E	2007	szczur	MCT	40	21	MABP, mPAP, RVH, WT
Maxová H	2010	szczur	CH	-	26	CI, mPAP
Maxová H	2011	szczur	CH	-	21	RVH
McMurtry M	2007	szczur	MCT	60	24	CI, MABP, mPAP, PVR, RVH, WT
Medarametla V	2014	szczur	MCT/LP+MCT	60	35/28	RVSP
Megalou A	2010	szczur	MCT	60	14	RVSP
Megalou A	2012	szczur	MCT	60	56	RVSP
Mei Y	2011	szczur	MCT	50	28/42	MABP, mPAP, RVH
Michelakis E	2002	szczur	CH	-	14	CO, MABP, mPAP, PVR, RVH, WT
Mitani Y	1997	szczur	CH	-	10	mPAP, RVH, WT
Miyata M	2000	szczur	MCT	40	28	RVH
Morales-Cano D	2014	szczur	MCT	60	33	mPAP, RVSP, RVH

Tabela 1. cd

Morecroft I	2010	mysz	CH	-	14/28	RVSP, RVH
Morel O	2003	szczur	CH	-	14	MABP, RVSP
Morin C	2014	szczur	MCT	60	21	RVH
Mouchaers K	2010	szczur	MCT	40	28	CO, mPAP, PVR, RVSP, RVH, WT
Mourelle M	2011	szczur	MCT	60	24	MABP, mPAP
Murata T	2005	szczur	CH	-	21	MABP, RVSP, RVH
Murugesan P	2015	szczur	LP+MCT	60	21	CI, mPAP, RVSP, RVH
Nagata T	1997	szczur	MCT	60	21	RVH, WT
Nagaya N	2003	szczur	MCT	60	21	CI, MABP, RVSP, WT, TPR
Nakamura A	2013	szczur	MCT	60	25	RVSP, WT
Nakata T	2015	szczur	MCT	60	21	RVSP
Nickel N	2015	szczur	Sugen 5416	20	56	CO, RVSP, RVH
Nisbet R	2010	mysz	CH	-	21/35	RVSP, RVH
Nishida M	2009	szczur	MCT	60	28	MABP, RVSP, WT
Nishimura T	2001	szczur	LP+MCT	60	28	mPAP, RVSP, RVH
Nishimura T	2002	szczur	LP+MCT	60	28	mPAP, RVSP, RVH
Nong Z	1996	szczur	CH	-	12	mPAP, RVH
Okada K	1998	szczur	LP+MCT	60	35	mPAP, RVH
Onat A	2013	szczur	MCT	60	21	mPAP, RVH
Ono S	1992	szczur	CH	-	21	CO, mPAP, RVH, WT, TPR
Ono S	1992	szczur	MCT	60	21	mPAP, RVH
Ou Z	2010	szczur	MCT	50	21/35	RVSP
Paffett M	2012	szczur	MCT	50	42	RVSP, RVH
Paffett M	2012	szczur	MCT	50	42	RVSP, RVH
Pankey E	2012	szczur	CH	-	35	mCO, MABP, mPAP, PVR
Pankey E	2013	szczur	MCT	60	21	CO, MABP, mPAP, RVH, WT
Pehlivan Y	2014	szczur	MCT	60	21	mPAP
Pei JM	2006	szczur	CH	-	14	MABP, mPAP, RVP, RVH
Pei Y	2011	szczur	MCT	60	28	RVSP, WT
Pereira S	2013	szczur	MCT	60	28	RVSP, RVH

Tabela 1. cd

Perros F	2015	szczur	MCT	60	21	CO, mPAP, PVR, RVSP, RVH
Pichon A	2012	szczur	CH	-	21	CO, MABP, mPAP, PVR, RVH
Pidgeon G	2004	szczur	CH	-	14	mPAP
Polonio I	2014	szczur	MCT	60	28	mPAP, RVH
Porvasnik S	2010	szczur	MCT	40	35	mPAP, RVH
Preston I	2013	mysz/szczur	CH/MCT	-/60	35/21	CI, MABP, PVR, RVSP, RVH
Price L	2011	szczur	MCT	60	21/28	mPAP, RVSP, RVH, WT
Pullamsetti S	2005	szczur	MCT	60	42	CI, MABP, PVR, RVSP, RVH
Pullamsetti S	2011	szczur	MCT	60	28	MABP, RVSP, RVH
Qi J	2000	szczur	CH	-	14	mPAP
Qi J	2001	szczur	CH	-	14	mPAP
Quinn D	1998	szczur	CH	-	14	CI, mPAP, RVH
Rakotoniaina Z	2006	szczur	MCT	60	28	RVSP, RVH
Rakotoniaina Z	2008	szczur	MCT	60	28	RVSP, RVH, WT
Rocchetti M	2014	szczur	MCT	60	22	RVSP, RVH
Sahara M	2014	szczur	MCT	60	28/35	RVSP, RVH, WT
Samillan V	2013	mysz	CH	-	35	RVP, WT
Satoh M	2009	szczur	MCT	70	28	MABP, RVSP, RVH
Sawada H	2007	szczur	MCT	60	16	mPAP, RVH
Schermuly R	2004	szczur	MCT	60	28/42	CI, MABP, RVSP, RVH
Schwenke D	2008	szczur	CH	-	14	MABP, mPAP, RVH
Shen L	2011	szczur	MCT	60	31	RVSP, RVH
Shi K	2009	szczur	MCT/CH	60/-	28	mPAP, RVH
Sun X	2008	szczur	MCT	60	28	mPAP, RVH, WT
Sun XZ	2014	szczur	CH	-	21	MABP, mPAP, RVH, WT
Sun XZ	2015	szczur	CH	-	21	MABP, mPAP, RVH
Suzuki C	2006	szczur	MCT	60	21	RVSP, RVH, WT
Suzuki R	2012	szczur	MCT	60	28	RVSP, RVH, WT
Takahashi T	1995	szczur	MCT	80	28	RVSP, WT
Takahashi T	1996	szczur	MCT	80	28	RVSP, WT
Tan J	2008	szczur	CH	-	21	mPAP, RVSP, RVH

Tabela 1. cd

Tan J	2012	szczur	CH	-	21	mPAP
Tang B	2014	szczur	MCT	60	29	RVSP, RVH
Thompson J	1994	szczur	CH	-	10	RVH
Thompson J	1994	szczur	CH	-	20	RVH
Tian X	2011	szczur	MCT	60	35	MABP, PVR, RVSP, RVH
Tofovic S	2005	szczur	MCT	60	21/28	RVSP, RVH
Tofovic S	2008	szczur	MCT	60	28	RVSP, RVH, WT
Tofovic S	2010	szczur	MCT	60	28	RVSP, RVH, WT
Tofovic S	2010	szczur	MCT	60	28	RVSP, RVH
Tual L	2006	szczur	CH	-	14	CO, MABP, RVSP, RVH
Umar S	2011	szczur	MCT	60	30	RVSP, RVH
Uzun O	2006	szczur	CH	-	14	RVH
Villegas L	2003	mysz	CH	-	35	RVSP, RVH
Wang A	2015	szczur	CH	-	21	mPAP, RVSP
Wang H	1997	szczur	MCT	60	21	MABP, mPAP, RVH
Wang HM	2012	szczur	MCT	60	21	MABP, mPAP, RVH
Wang J	2012	szczur	MCT/CH	60/-	21	RVSP, RVH
Wang L	2009	szczur	CH+HC	-	28	MABP, mPAP, RVH
Wang S	2013	szczur	MCT	60	21	MABP, mPAP, RVH
Wang W	2011	szczur	MCT	50	23	RVSP, RVH
Wang X	2015	szczur	MCT	50	42	RVSP, RVH
Wang XB	2015	szczur	CH	--	28	MABP, mPAP, RVH, WT
Wang XF	2012	szczur	MCT	60	21	mPAP, RVSP, RVH, WT
Wang Y	2011	szczur	MCT	60	21	mPAP, WT
Wang Y	2011	szczur	MCT	60	21	MABP, mPAP, RVH, WT
Wei L	2007	szczur	LP+MCT	60	28	mPAP, RVH
Weissmann N	2009	mysz	CH	-	35	MABP, RVSP, RVH
Wu J	2015	szczur	CH	-	21	MABP, mPAP
Wu Q	2013	szczur	CH	-	14	mPAP, RVP, RVH
Xia X	2004	szczur	CH	-	21	RVH, WT
Xie L	2010	szczur	MCT	40	28	mPAP, RVH, WT
Xie W	2004	szczur	CH	-	28	MABP, mPAP, RVH
Xie X	2015	szczur	MCT	60	28	RVSP, RVH, WT
Xin Y	2015	szczur	MCT	60	28	mPAP, RVH, WT

Tabela 1. cd

Xu D	2010	szczur	CH	-	28	MABP, RVSP, RVH, WT
Yamada Y	2014	szczur	MCT	60	19	MABP, mPAP, RVH
Yan J	2013	szczur	MCT	60	21	RVSP, RVH
Yang D	2010	szczur	MCT	50	21	RVSP, RVH
Yang H	2000	szczur	CH	-	14	MABP, mPAP, RVH
Yang L	2008	szczur	CH	-	21	mPAP, RVH, WT
Yang P	2014	szczur	MCT	60	28/42	RVSP, RVH, WT
Yavuz T	2013	szczur	MCT	60	28	RVH
Yin Y	2013	szczur	LP+MCT	60	28	mPAP, RVH, WT
Yu J	2010	szczur	CH	-	7	MABP, mPAP, PVR, RVH
Yu L	2015	szczur	LP+MCT	60	35	mPAP
Yuyama H	2005	szczur	CH	-	14	MABP, RVSP, RVH
Zambelli V	2011	szczur	MCT	60	35	RVSP, WT
Zapata-Sudo G	2012	szczur	MCT	60	28	RVSP
Zeng Z	2002	szczur	MCT	60	28	RVSP
Zhai F	2009	szczur	MCT	60	21	MABP, mPAP, RVH, WT
Zhang B	2014	szczur	MCT/CH	60/-	28	RVSP, RVH
Zhang D	2014	szczur	MCT	60	28	RVSP, RVH
Zhang E	2010	szczur	CH	-	14	mPAP, RVH, WT
Zhang E	2015	szczur	CH	-	14	mPAP, RVH, WT
Zhang L	2013	szczur	CH	-	14	mPAP, RVP
Zhang L	2014	szczur	CH	-	35	RVSP, RVH
Zhang LL	2014	szczur	MCT	60	14/28	mPAP
Zhang W	2009	szczur	MCT	80	21	mPAP, RVSP, RVH
Zhang W	2012	szczur	MCT	60	35	MABP, mPAP, RVSP, RVH
Zhang Y	2012	szczur	MCT	60	28	mPAP, RVSP, RVH
Zhang Y	2014	szczur	CH	-	21	mPAP, RVH, WT
Zhang Y	2015	szczur	MCT	60	28	RVSP, RVH, WT
Zhang YF	2015	szczur	MCT	60	21	RVH
Zhao L	1996	szczur	CH	-	7	MABP, mPAP
Zhao L	2009	szczur	CH	-	14/28	MABP, mPAP, RVH
Zhao S	2014	szczur	CH	-	28	MABP, mPAP, RVH
Zheng L	2015	szczur	MCT	60	28	MABP, RVSP, RVH

Tabela 1. cd

Zhong X	2000	szczur	CH	-	28	mPAP, RVH, WT
Zhou K	1993	szczur	MCT	60	21	mPAP, RVH
Zhou S	2015	szczur	MCT	60	14/21	mPAP, RVSP, RVH, WT
Zhu R	2015	szczur	MCT	60	21	mPAP, RVSP
Zhu R	2015	szczur	CH	-	28	mPAP, RVSP, RVH
Zhu S	2009	szczur	MCT	60	42	mPAP, RVH
Zopf D	2011	szczur	MCT	60	21	mPAP, RVSP
Zuo X	2011	szczur	CH	-	28	mPAP, RVH, WT
Zuo XR	2012	szczur	MCT	60	21	RVSP, RVH

Tabela 2. Klasyfikacja testowanych leków/substancji w zakwalifikowanych próbach eksperymentalnych. * – neutralne inhibitory endopeptydazy

Lp.	Grupa terapeutyczna/farmakologiczna	Nazwa leku/substancji
1.	—	Acetazolamid
2.	Agonisty receptorów aktywowanych proliferatorami peroksysomów (PPAR)	GW0742, rozyglitazon
3.	Agonisty receptorów/pochodne estrogenu	Pochodne estrogenu: 17 β -estradiol, 2-etoksyestradiol, 2-hydroksyestradiol, 2-metoksyestradiol
		Agonisty receptorów estrogenu: DPN, PPT, raloksyfen
4.	Aktywatory kanałów potasowych ATP-zależnych	Iptakalim, nikorandyl, pinacydyl
5.	Analogi/agonisty prostacykliny PGI₂	ONO-1301
6.	Antagonisty receptorów adrenergicznych	Bisoprolol, karwedilol, metoprolol, nebiwolol, propranolol, prazosyna, urapidyl
7.	Antagonisty receptorów urotensyny II	Palosuran, urantyd
8.	Antagonisty receptorów/inhibitory endoteliny-1 (ET-1)	Aminafon, TBC3711, YM598 (nebentan)
9.	Antagonisty wapnia	Amlodypina, DCDDP, diltiazem, felodypina, LASSBio-1289, m-nisoldypina, nifedypina, nitrendypina, semotiadyl
10.	Inhibitory cyklooksygenazy (COX)	Kwas acetylosalicylowy, celekoksyb, SC236
11.	Inhibitory deacetylazy histonów (HDAC)	Trichostatyna A, kwas walproinowy
12.	Inhibitory fosfodiesterazy (PDE)	BAY 60-7550, cilostazol, E4021, LASSBio-965, lodenafil, papaweryna, pimobendan, T-1032, tolafentryna, wardenafil
13.	Inhibitory kinaz serynowo-treoninowych (Ser-Thr)/kinaz tyrozynowych (TKI)	Imatynib, PH-797804, PK10453, SB203580, sorafenib, sunitynib, trycyrbina
14.	Inhibitory proteazy HIV	Amprenawir, nelfinawir, ritonawir
15.	Inhibitory reduktazy HMG-CoA (statyny)	Atorwastatyna, fluwastatyna, prawastatyna, rozuwastatyna, simwastatyna
16.	Inhibitory stresu retikulum endoplazmatycznego (ER) i dysfunkcji mitochondriów	Dichlorooctan, kwas 4-fenylobutyrowy, ranolazyna
17.	Inhibitory szlaku przemian serotoniny (5-HT)	Antagonisty receptora 5-HT_{1B}/SERT: LY393558
		Antagonisty receptorów serotoniny: C-122, DV-7028, GR127935, ketanseryna, PRX-08066, RS127445, sarpogrelat, terguryd
		Inhibitory hydroksylazy tryptofanowej (Tph): PCPA, LP533401

Tabela 2. cd

17.	Inhibitory szlaku przemian serotoniny (5-HT) (cd)	Inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny (SSRI): citalopram, fluoksetyna, sertralina
18.	Inhibitory szlaku RhoA/ROCK	Azaindol-1, fasudil, KMUP-1, KMUP-1A
19.	–	kwas γ -aminomasłowy (GABA)
20.	Leki przeciwzakrzepowe/przeciwplytkowe	BN 50739, enoksaparyna, ludzka rekombinowana trombomodulina, ifetroban, OKY-046 (ozagrel), ONO-8809, rywaroksaban, warfaryna, WEB 2170 (bepafant)
21.	–	MK571
22.	Peptydy wazoaktywne	Adrenomedulina, apelina, grelina, peptyd natriuretyczny typu B (BNP), peptyd syntetyczny P1, przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ANP), wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP), chimeryczny ANP/CNP peptyd (<i>vasonatin peptide</i>), ekadotril*, SCH 42495*
23.	Regulatory układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS)	Adenozyna i agonisty receptora A_{2A}: adenozyna, LASSBio-1359, LASSBio-1386
		Agonisty receptora AT₂: C21
		Aktywatory konwertazy angiotensyny 2: NSC-354317, XNT
		Analogi angiotensyny: Ang (1-7), cykliczny analog Ang (1-7)
		Antagonisty aldosteronu: spironolakton
24.	Stymulatory rozpuszczalnej cyklazy guanylanowej (sGC)	Antagonisty receptora AT₁: GR138950C, losartan, olmesartan, telmisartan
		Inhibitory konwertazy angiotensyny (ACEI): enalapryl, peryndopryl, kwinapryl
25.	–	HMR1766 (ataciguat), YC-1
26.	Związki o działaniu antyremodelingowym	U50,488H (agonista receptora κ -opiodowego) A-484954, AICAR, amiloryd, batimastat, bortezomib, DAPT, doksy cyklina, EIPA, elafina, fenamil, LY294002, M249314, MDL28170, metformina, paklitaksel, ATRA, YM155, ZD0892
27.	Związki o działaniu przeciwzapalnym	DHEA, deksametazon, BI113823, etanercept, IMD-0354, interferon alfa-2b, infliksymab, kromoglikan dwusodowy, OA-NO ₂ , melatonina, montelukast, mykofenolan mofetylu, n-3 nienasycone kwasy tłuszczowe (kwas dokozaheksaenowy, kwas dokozaheksaenowy), pirogronian etylu, PDTC, przeciwciężła anty-TGF- β , rapamycyna, RAD, T9429

Tabela 2. cd

28.	Związki pochodzenia roślinnego	Azjatykozyd, bajkalina, brewiskapina, chryzyna, diosgenina, genisteina, ginkgolid B, <i>Ginko biloba</i> glikozydy, glicyryzyna, kapsaicyna, kwas elagowy, kwercetyna, naryngenina, oridonina, oksymatryna, PNS, plumbagina, resweratrol, ruskogenina, rutakarpina, salidrozyd, sezamina, sulfonian sodowy <i>tanshinone IIA</i> (STS), tetrandryna, trimetoksystylben, tryptolid
29.	Związki redukujące stres oksydacyjny	DMTU-1, DMTU-2, erdosteina, fullerenol-1, GKT137831, MnTE-2-PyP, N-acetylcysteina, oltipraz, omentyna, U-83836E
30.	Związki zwiększające poziom tlenku azotu (NO)	D-arginina, LA-419, L-arginina, molsydomina, NaNO ₂ , nitroprusydek sodu

Tabela 3. Wpływ ocenianych związków i grup terapeutycznych/farmakologicznych (wg przyjętej w pracy klasyfikacji) na poprawę parametrów: mPAP, RVSP, RVH, WT. Mierzony efekt łączny wyrażono jako różnicę średnich (D) (model z efektem zmiennym)

Parametr	Związek lub grupa terapeutyczna/farmakologiczna	D	95% PU	p
RVSP [mmHg]	Inhibitory reduktazy HMG-CoA (statyny)	23,02	17,41-28,63	<0,00001
	Inhibitory kinaz serynowo-treoninowych (Ser-Thr)/kinaz tyrozynowych (TKI)	22,43	18,68-26,19	<0,00001
	Peptydy wazoaktywne	22,14	18,78-25,49	<0,00001
	Analogi/agonisty prostacykliny PGI ₂	21,53	18,49-24,56	<0,00001
	Leki przeciwzakrzepowe/przeciwpłytkowe	21,31	18,40-24,23	<0,00001
	Związki o działaniu przeciwzapalnym	20,37	17,88-22,87	<0,00001
	Agonisty receptorów/pochodne estrogeny	19,90	17,58-22,22	<0,00001
	Inhibitory PDE	19,39	17,25-21,53	<0,00001
	Aktywatory kanałów potasowych ATP-zależnych	18,44	16,64-20,23	<0,00001
	GABA	18,23	16,48-19,98	<0,00001
	Antagonisty wapnia	17,59	15,39-19,78	<0,00001
	Agonisty PPAR	16,98	14,90-19,05	<0,00001
	Regulatory RAAS	16,41	14,46-18,36	<0,00001
	Antagonisty receptorów adrenergicznych	16,14	14,28-18,00	<0,00001
	Inhibitory szlaku RhoA/ROCK	15,70	13,94-17,46	<0,00001
	Antagonisty receptorów/inhibitory ET-1	15,42	13,73-17,10	<0,00001
	Inhibitory HDAC	15,24	13,61-16,88	<0,00001
	Związki pochodzenia roślinnego	14,87	13,29-16,46	<0,00001
	Inhibitory COX	14,53	13,02-16,03	<0,00001
	Związki zwiększające poziom NO	14,22	12,79-15,66	<0,00001
	Inhibitory stresu ER i dysfunkcji mitochondriów	14,11	12,71-15,51	<0,00001
	Związki o działaniu antyremodelingowym	13,90	12,53-15,26	<0,00001
	Stymulatory sGC	13,62	12,26-14,99	<0,00001
	Inhibitory szlaku przemian 5-HT	13,36	11,96-14,76	<0,00001
	Związki redukujące stres oksydacyjny	13,05	11,62-14,49	<0,00001
	MK571	12,78	11,14-14,43	<0,00001
mPAP [mmHg]	Inhibitory PDE	13,00	4,73-21,27	=0,0021
	Aktywatory kanałów potasowych ATP-zależnych	12,99	9,95-16,03	<0,00001
	Inhibitory szlaku RhoA/ROCK	12,84	11,21-14,48	<0,00001
	Regulatory RAAS	12,74	11,17-14,31	<0,00001
	Związki o działaniu przeciwzapalnym	12,26	10,93-13,60	<0,00001
	Antagonisty receptorów urotensyny II	11,97	10,79-13,15	<0,00001
	Inhibitory reduktazy HMG-CoA (statyny)	11,38	10,42-12,34	<0,00001
	Związki o działaniu antyremodelingowym	11,12	10,24-12,00	<0,00001
	U50,488H	10,76	9,89-11,63	<0,00001
	Inhibitory szlaku przemian 5-HT	10,62	9,84-11,40	<0,00001
	Inhibitory proteazy HIV	10,48	9,74-11,23	<0,00001
	Agonisty PPAR	10,38	9,66-11,09	<0,00001
	Związki pochodzenia roślinnego	10,21	9,50-10,91	<0,00001

Tabela 3. cd

mPAP [mmHg]	Inhibitory kinaz serynowo-treoninowych (Ser-Thr)/kinaz tyrozynowych (TKI)	10,14	9,45-10,83	<0,00001
	Związki zwiększające poziom NO	10,05	9,38-10,73	<0,00001
	Antagonisty receptorów adrenergicznych	10,04	9,39-10,69	<0,00001
	Inhibitory stresu ER i dysfunkcji mitochondriów	10,00	9,37-10,64	<0,00001
	Leki przeciwzakrzepowe/przeciwpłytkowe	9,88	9,18-10,58	<0,00001
	Antagonisty wapnia	9,56	8,70-10,43	<0,00001
	Peptydy wazoaktywne	9,29	8,33-10,24	<0,00001
	Związki redukujące stres oksydacyjny	8,99	7,88-10,09	<0,00001
	Acetazolamid	8,76	7,64-9,89	<0,00001
RVH	Inhibitory reduktazy HMG-CoA (statyny)	0,17	0,14-0,20	<0,00001
	Aktywatory kanałów potasowych ATP-zależnych	0,15	0,12-0,19	<0,00001
	Inhibitory szlaku RhoA/ROCK	0,15	0,13-0,17	<0,00001
	Antagonisty receptorów urotensyny II	0,15	0,13-0,17	<0,00001
	Inhibitory PDE	0,15	0,13-0,16	<0,00001
	Związki o działaniu antyremodelingowym	0,14	0,13-0,16	<0,00001
	Inhibitory stresu ER i dysfunkcji mitochondriów	0,14	0,13-0,16	<0,00001
	Inhibitory szlaku przemian 5-HT	0,14	0,13-0,15	<0,00001
	Antagonisty receptorów/inhibitory ET-1	0,14	0,12-0,15	<0,00001
	Inhibitory kinaz serynowo-treoninowych (Ser-Thr)/kinaz tyrozynowych (TKI)	0,13	0,12-0,14	<0,00001
	Antagonisty wapnia	0,13	0,12-0,14	<0,00001
	Regulatory RAAS	0,13	0,12-0,14	<0,00001
	Agonisty PPAR	0,13	0,12-0,14	<0,00001
	Inhibitory HDAC	0,13	0,12-0,14	<0,00001
	Związki o działaniu przeciwzapalnym	0,12	0,11-0,13	<0,00001
	GABA	0,12	0,11-0,13	<0,00001
	Związki pochodzenia roślinnego	0,12	0,11-0,13	<0,00001
	Leki przeciwzakrzepowe/przeciwpłytkowe	0,12	0,11-0,13	<0,00001
	Inhibitory proteazy HIV	0,12	0,11-0,12	<0,00001
	Antagonisty receptorów adrenergicznych	0,11	0,11-0,12	<0,00001
	Agonisty receptorów/pochodne estrogenu	0,11	0,10-0,12	<0,00001
	Związki redukujące stres oksydacyjny	0,11	0,10-0,12	<0,00001
	Inhibitory COX	0,11	0,10-0,12	<0,00001
	U50,488H	0,11	0,10-0,12	<0,00001
	Acetazolamid	0,11	0,10-0,12	<0,00001
	Związki zwiększające poziom NO	0,11	0,10-0,12	<0,00001
	Peptydy wazoaktywny	0,11	0,10-0,11	<0,00001
	MK571	0,10	0,10-0,11	<0,00001
	Stymulatory sGC	0,10	0,10-0,11	<0,00001
	Analogi/agonisty prostacykliny PGI ₂	0,10	0,09-0,11	<0,00001
WT [%]	Inhibitory PDE	21,45	10,30-32,60	=0,0002
	Agonisty PPAR	21,04	13,80-28,28	<0,00001
	Inhibitory proteazy HIV	20,43	17,36-23,51	<0,00001
	Inhibitory reduktazy HMG-CoA (statyny)	19,49	17,16-21,81	<0,00001
	Inhibitory stresu ER i dysfunkcji mitochondriów	19,30	17,12-21,47	<0,00001

Tabela 3. cd

WT [%]	Aktywatory kanałów potasowych ATP-zależnych	18,91	16,95-20,88	<0,00001
	Inhibitory COX	18,22	16,65-19,79	<0,00001
	Analogi/agonisty prostacykliny PGI ₂	18,20	16,65-19,76	<0,00001
	Związki o działaniu przeciwzapalnym	18,04	16,57-19,51	<0,00001
	Związki pochodzenia roślinnego	17,34	15,99-18,68	<0,00001
	Inhibitory HDAC	16,71	14,46-18,96	<0,00001
	Inhibitory szlaku przemian 5-HT	16,52	14,34-18,71	<0,00001
	Antagonisty receptorów adrenergicznych	15,92	13,57-18,27	<0,00001
	Inhibitory szlaku RhoA/ROCK	15,35	13,18-17,52	<0,00001
	Antagonisty wapnia	14,89	12,84-16,93	<0,00001
	Związki o działaniu antyremodelingowym	14,50	12,53-16,46	<0,00001
	U50,488H	14,10	12,21-15,98	<0,00001
	Inhibitory kinaz serynowo-treoninowych (Ser-Thr)/kinaz tyrozynowych (TKI)	13,70	11,86-15,54	<0,00001
	GABA	13,10	11,30-14,90	<0,00001
	Antagonisty receptorów/inhibitory ET-1	12,85	11,11-14,60	<0,00001
	Agonisty receptorów/pochodne estrogenu	12,59	10,90-14,28	<0,00001
	Peptydy wazoaktywne	12,34	10,68-13,99	<0,00001
	Związki redukujące stres oksydacyjny	12,01	10,36-13,66	<0,00001
	Regulatory RAAS	11,51	9,75-13,27	<0,00001
	Leki przeciwzakrzepowe/przeciw płytkowe	11,23	9,19-13,28	<0,00001
	Związki zwiększające poziom NO	10,82	8,91-12,72	<0,00001

Tabela 4. Wpływ ocenianych związków i grup terapeutycznych/farmakologicznych (wg przyjętej w pracy klasyfikacji) na poprawę parametrów: mPAP, RVSP, RVH, WT. Mierzony efekt łączny wyrażono jako iloraz różnic średnich (R) (model z efektem zmiennym)

Parametr	Związek lub grupa terapeutyczna/farmakologiczna	R	95% PU	p
RVSP [mmHg]	Inhibitory stresu ER i dysfunkcji mitochondriów	0,84	0,67-1,06	=0,1476
	Peptydy wazoaktywne	0,74	0,60-0,90	=0,0033
	Stymulatory sGC	0,72	0,63-0,81	<0,00001
	Inhibitory kinaz serynowo-treoninowych (Ser-Thr)/kinaz tyrozynowych (TKI)	0,68	0,61-0,76	<0,00001
	Związki o działaniu przeciwzapalnym	0,66	0,60-0,73	<0,00001
	Inhibitory COX	0,64	0,59-0,70	<0,00001
	Regulatory RAAS	0,63	0,58-0,68	<0,00001
	Związki o działaniu antyremodelingowym	0,62	0,58-0,67	<0,00001
	Inhibitory PDE	0,61	0,57-0,66	<0,00001
	GABA	0,60	0,55-0,65	<0,00001
	MK571	0,60	0,55-0,65	<0,00001
	Agonisty PPAR	0,59	0,55-0,64	<0,00001
	Aktywatory kanałów potasowych ATP-zależnych	0,58	0,54-0,63	<0,00001
	Związki zwiększające poziom NO	0,58	0,54-0,62	<0,00001
	Związki pochodzenia roślinnego	0,57	0,53-0,61	<0,00001
	Inhibitory reduktazy HMG-CoA (statyny)	0,56	0,52-0,60	<0,00001
	Agonisty receptorów/pochodne estrogeny	0,55	0,52-0,59	<0,00001
	Antagonisty wapnia	0,54	0,51-0,58	<0,00001
	Analogi/agonisty prostacykliny PGI ₂	0,54	0,51-0,58	<0,00001
	Leki przeciwzakrzepowe/przeciwplatekcyjne	0,54	0,50-0,57	<0,00001
	Inhibitory szlaku przemian 5-HT	0,53	0,50-0,56	<0,00001
	Inhibitory szlaku RhoA/ROCK	0,52	0,49-0,56	<0,00001
	Inhibitory HDAC	0,50	0,47-0,55	<0,00001
	Antagonisty receptorów adrenergicznych	0,49	0,45-0,53	<0,00001
	Antagonisty receptorów/inhibitory ET-1	0,48	0,44-0,52	<0,00001
	Związki redukujące stres oksydacyjny	0,48	0,44-0,52	<0,00001
mPAP [mmHg]	Inhibitory PDE	0,93	0,87-0,99	=0,0207
	U50,488H	0,92	0,87-0,97	=0,0045
	Związki redukujące stres oksydacyjny	0,87	0,80-0,95	=0,0017
	Aktywatory kanałów potasowych ATP-zależnych	0,83	0,75-0,93	=0,0008
	Inhibitory szlaku RhoA/ROCK	0,80	0,72-0,92	=0,0001
	Antagonisty receptorów urotensyny II	0,80	0,72-0,89	<0,00001
	Inhibitory stresu ER i dysfunkcji mitochondriów	0,77	0,68-0,87	<0,00001
	Regulatory RAAS	0,74	0,66-0,84	<0,00001
	Związki o działaniu przeciwzapalnym	0,72	0,64-0,81	<0,00001
	Związki pochodzenia roślinnego	0,70	0,62-0,79	<0,00001
	Związki o działaniu antyremodelingowym	0,68	0,61-0,77	<0,00001
	Inhibitory szlaku przemian 5-HT	0,67	0,60-0,75	<0,00001
	Związki zwiększające poziom NO	0,66	0,59-0,74	<0,00001
	Inhibitory reduktazy HMG-CoA (statyny)	0,64	0,57-0,72	<0,00001
	Antagonisty wapnia	0,63	0,56-0,71	<0,00001

Tabela 4. cd

mPAP [mmHg]	Agonisty PPAR	0,62	0,55-0,70	<0,00001
	Leki przeciwzakrzepowe/przeciwpłytkowe	0,61	0,55-0,68	<0,00001
	Inhibitory proteazy HIV	0,60	0,53-0,67	<0,00001
	Peptydy wazoaktywne	0,59	0,52-0,66	<0,00001
	Antagonisty receptorów adrenergicznych	0,57	0,50-0,65	<0,00001
	Inhibitory kinaz serynowo-treoninowych (Ser-Thr)/kinaz tyrozynowych (TKI)	0,56	0,50-0,63	<0,00001
	Acetazolamid	0,53	0,47-0,61	<0,00001
RVH	Antagonisty receptorów urotensyny II	0,94	0,58-1,52	=0,7912
	U50,488H	0,85	0,72-1,01	=0,0628
	MK571	0,77	0,65-0,90	=0,0012
	Inhibitory COX	0,74	0,66-0,84	<0,00001
	Antagonisty receptorów/inhibitory ET-1	0,70	0,66-0,74	<0,00001
	Agonisty/analogi prostacykliny PGI ₂	0,69	0,66-0,73	<0,00001
	Antagonisty wapnia	0,69	0,66-0,72	<0,00001
	GABA	0,67	0,63-0,72	<0,00001
	Aktywatory kanałów potasowych ATP-zależnych	0,66	0,62-0,71	<0,00001
	Związki zwiększające poziom NO	0,65	0,60-0,69	<0,00001
	Inhibitory reduktazy HMG-CoA (statyny)	0,63	0,59-0,68	<0,00001
	Inhibitory szlaku RhoA/ROCK	0,63	0,58-0,67	<0,00001
	Związki redukujące stres oksydacyjny	0,62	0,58-0,66	<0,00001
	Związki pochodzenia roślinnego	0,61	0,57-0,65	<0,00001
	Leki przeciwzakrzepowe/przeciwpłytkowe	0,60	0,57-0,65	<0,00001
	Związki o działaniu przeciwzapalnym	0,60	0,56-0,64	<0,00001
	Związki o działaniu antyremodelingowym	0,59	0,56-0,63	<0,00001
	Inhibitory szlaku przemian 5-HT	0,59	0,55-0,62	<0,00001
	Inhibitory kinaz serynowo-treoninowych (Ser-Thr)/kinaz tyrozynowych (TKI)	0,58	0,55-0,62	<0,00001
	Inhibitory PDE	0,58	0,54-0,61	<0,00001
	Agonisty PPAR	0,57	0,54-0,61	<0,00001
	Inhibitory stresu ER i dysfunkcji mitochondriów	0,57	0,54-0,61	<0,00001
	Inhibitory proteazy HIV	0,57	0,53-0,60	<0,00001
	Stymulatory sGC	0,56	0,53-0,60	<0,00001
	Regulatory RAAS	0,55	0,52-0,59	<0,00001
	Peptydy wazoaktywne	0,54	0,51-0,58	<0,00001
	Inhibitory HDAC	0,54	0,51-0,58	<0,00001
	Agonisty receptorów/pochodne estrogeny	0,53	0,50-0,57	<0,00001
	Antagonisty receptorów adrenergicznych	0,52	0,48-0,56	<0,00001
	Acetazolamid	0,52	0,48-0,55	<0,00001
WT [%]	Inhibitory COX	0,94	0,94-0,94	<0,00001
	Antagonisty receptorów adrenergicznych	0,93	0,90-0,96	<0,00001
	Leki przeciwzakrzepowe/przeciwpłytkowe	0,92	0,89-0,95	<0,00001
	U50,488H	0,86	0,77-0,96	=0,0054
	Związki redukujące stres oksydacyjny	0,83	0,75-0,93	=0,0012
	Inhibitory proteazy HIV	0,82	0,74-0,90	=0,0001
	Regulatory RAAS	0,80	0,73-0,89	<0,00001
	Agonisty PPAR	0,79	0,72-0,87	<0,00001
	Związki zwiększające poziom NO	0,79	0,72-0,87	<0,00001

Tabela 4. cd

WT [%]	Inhibitory stresu ER i dysfunkcji mitochondriów	0,78	0,70-0,86	<0,00001
	Analogi/agonisty prostacykliny PGI ₂	0,77	0,70-0,84	<0,00001
	Inhibitory HDAC	0,76	0,69-0,83	<0,00001
	Aktywatory kanałów potasowych ATP-zależnych	0,75	0,68-0,82	<0,00001
	Związki pochodzenia roślinnego	0,73	0,67-0,80	<0,00001
	Inhibitory kinaz serynowo-treoninowych (Ser-Thr)/kinaz tyrozynowych (TKI)	0,73	0,66-0,79	<0,00001
	Inhibitory przemian szlaku 5-HT	0,72	0,66-0,78	<0,00001
	Związki o działaniu przeciwzapalnym	0,71	0,65-0,77	<0,00001
	Agonisty receptorów/pochodne estrogenu	0,70	0,65-0,76	<0,00001
	Związki o działaniu antyremodelingowym	0,69	0,64-0,75	<0,00001
	Peptydy wazoaktywne	0,69	0,64-0,75	<0,00001
	Inhibitory reduktazy HMG-CoA (statyny)	0,68	0,63-0,74	<0,00001
	GABA	0,67	0,61-0,73	<0,00001
	Inhibitory PDE	0,66	0,60-0,73	<0,00001
	Inhibitory szlaku RhoA/ROCK	0,65	0,60-0,72	<0,00001
	Antagonisty wapnia	0,65	0,59-0,71	<0,00001
	Antagonisty receptorów/inhibitory ET-1	0,64	0,58-0,70	<0,00001