

Received: 10.10.2017
Accepted: 17.04.2018
Published: 22.07.2018

Zastosowanie modeli zwierzęcych w badaniach z zakresu medycyny doświadczalnej na przykładzie nadciśnienia płucnego*

Application of animal models in experimental medicine on the basis of pulmonary hypertension

Katarzyna Sztuka, Daria Orszulak-Michalak, Magdalena Jasińska-Stroschein

Zakład Biofarmacji, Katedra Biofarmacji, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie

Nadciśnienie płucne (PH) jest chorobą rzadką o ciężkim przebiegu, mimo dużego postępu w diagnostyce i terapii, pozostaje chorobą nieuleczalną i jest obciążone dużą śmiertelnością. Stosowana farmakoterapia poprawia jakość życia pacjentów i wydłuża czas przeżycia, ale nie powoduje całkowitego odwrócenia zmian patomorfologicznych i hemodynamicznych. Przyczyną może być wieloczynnikowy patomechanizm choroby, który obejmuje wiele szlaków sygnałowych. Dlatego poszukuje się nowych możliwości terapeutycznych. Służą temu badania przedkliniczne prowadzone m.in. na modelach zwierzęcych. O trafności identyfikacji potencjalnie skutecznych substancji do dalszej oceny w próbach klinicznych decyduje wiele czynników, w tym dobór właściwego modelu badawczego. Obecnie nie jest znany idealny model zwierzęcy, który w pełni odzwierciedla „ludzką” postać nadciśnienia płucnego. Badania są najczęściej prowadzone na modelach klasycznych, do których zalicza się model przewlekłej ekspozycji na niedotlenienie (CH) oraz model monokrotaliny (MCT). W artykule omówiono wybrane modele zwierzęce nadciśnienia płucnego, które są wykorzystywane w badaniach nad skutecznością potencjalnych substancji terapeutycznych. Przedstawiono mechanizm działania poszczególnych czynników indukujących PH oraz zakres wywoływanych zmian hemodynamicznych i histopatologicznych charakteryzujących poszczególne modele. Omówiono technikę i warunki indukcji nadciśnienia płucnego wybranych metod. Zwrócono uwagę na różnice międzygatunkowe zwierząt doświadczalnych. Podsumowano potencjalne korzyści i ograniczenia omawianych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego w badaniach przedklinicznych, ze zwróceniem szczególnej uwagi na powtarzalność otrzymywanych wyników, toksyczność czynników indukujących oraz zakres zmian wywoływanych u zwierząt w porównaniu do zmian w obrazie klinicznym nadciśnienia płucnego u ludzi czy koszty eksperymentów.

Słowa kluczowe: nadciśnienie płucne • badania przedkliniczne • modele zwierzęce • farmakologia eksperymentalna

Summary

Pulmonary hypertension (PH) is a rare disorder with a severe course. Despite significant progress in diagnosis and therapy, PH is an incurable disease with a high mortality rate. Current pharmacotherapy improves the patient's quality of life and prolongs his/her longevity, but it

*Praca finansowana: 503/3-011-02/503-31-002; 502-03/3-011-02/502-34-105

does not completely reverse pathological and haemodynamic changes. This might result from the multifactorial pathomechanism of the disease, which includes multiple signaling pathways. There is a need to develop novel therapies. In order to achieve this purpose, preclinical experiments are made, for instance, on animal models. Identification of potentially effective substances for further evaluation in clinical trials is determined by a variety of factors, including the selection of an appropriate test model. An ideal animal model that fully reflects the human form of pulmonary hypertension has not been identified, as yet. Generally, studies are conducted on classical models, including the chronic hypoxia model (CH) and monocrotaline model (MCT). This study presents selected animal models of pulmonary hypertension, which are used in efficiency tests on potentially new drugs as well as a mechanism of action of PH inducers and both haemodynamic and histopathological changes, characteristic for each model. The technique and conditions for the induction of pulmonary hypertension are discussed for selected methods. The authors emphasized interspecific differences in experimental animals. The article also summarizes potential benefits and limitations of animal models of pulmonary hypertension in preclinical studies, with consideration given to the repeatability and predictability of results, the cost of experiments, the toxicity of PH inducers and the comparability between haemodynamic and histopathological changes, induced in animals, and changes in the clinical picture of pulmonary hypertension in humans.

Keywords: pulmonary hypertension • preclinical trials • animal models • experimental pharmacology

GICID: 01.3001.0012.2057
DOI: 10.5604/01.3001.0012.2057
Word count: 5373
Tables: 2
Figures: –
References: 94

Adres autorki: dr hab. Magdalena Jasińska-Stroschein, Zakład Biofarmacji, Katedra Biofarmacji, Wydział Farmaceutyczny UM, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź; e-mail: magdalena.jasinska-stroschein@umed.lodz.pl

Wykaz skrótów: **5-HT_{1A}** – receptor 1A serotoniny, 5-hydrokсыtryptaminy (serotonin receptor 1A, 5-hydroxytryptamine receptor 1A), **5-HT_{1B}** – receptor 1B serotoniny, 5-hydrokсыtryptaminy, (serotonin receptor 1B, 5-hydroxytryptamine receptor 1B), **Ang-1** – angiotensyna-1 (angiotensin-1), **ANP** – przedsiorkowy peptyd natriuretyczny (atrial natriuretic peptide), **APN** – adiponektyna (adiponectin), **ApoE** – apolipoproteina E (apolipoprotein E), **BMP** – białko morfogenetyczne kości (bone morphogenetic protein), **BMPR2** – receptor białka morfogenetycznego kości typu 2 (bone morphogenetic protein receptor 2), **CAV1** – kaweolina-1 (caveolin-1), **CH** – przewlekłe niedotlenienie (chronic hypoxia), **CTEPH** – przewlekłe zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne (chronic thromboembolic pulmonary hypertension), **EGF** – czynnik wzrostu naskórki (epidermal growth factor), **EMA** – Europejska Agencja Leków, **ET-1** – endotelina-1 (endothelin 1), **ET-A** – receptor typu A endoteliny (endothelin receptor A), **ET-B** – receptor typu B endoteliny (endothelin receptor B), **FDA** – Amerykańska Agencja Żywności i Leków (Food and Drug Administration), **FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor), **FH** – szczury szczepu Fawn-Hooded (Fawn-Hooded rats), **HIF-1 α** – czynnik indukowany hipoksją 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α), **HMG-CoA** – 3-hydrokсы-3-metyloglutarylo-koenzym A (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA), **IL-1 β** – interleukina-1 β (interleukin 1 β), **IL-6** – interleukina 6 (interleukin 6), **i.p.** – dootrzewnowo (intraperitoneally), **LP** – usunięcie lewego płuca (left pneumonectomy), **m.c.** – masa ciała, **MCT** – monokrotalina (monocrotaline), **MCTP** – dehydromonokrotalina (dehydromonocrotaline), **mPAP** – średnie ciśnienie w tętnicy płucnej (mean pulmonary arterial pressure), **NEP** – neprylizyna (neprilisin), **NO** – tlenek azotu (nitric oxide), **NT-proBNP** – N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B, **PAB** – banding tętnicy płucnej (pulmonary artery banding), **PAH** – tętnicze nadciśnienie płucne (pulmonary arterial hypertension), **PAP** – ciśnienie w tętnicy płucnej (pulmonary arterial pressure), **PASMCs** – komórki mięśni gładkich tętnicy płucnej (pulmonary artery smooth muscle cells), **PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor), **PGI2** – prostacyklina, **PH** – nadciśnienie płucne (pulmonary hypertension), **PPAR** – receptory aktywowane proliferatorami peroksyosomów (peroxisome proliferator-activated receptors), **PVR** – naczyniowy płucny opór (pulmonary vascular resistance), **RAAS** – układ renina-angiotensyna-aldosteron (renin-angiotensin-aldosterone system), **RV** – prawa

komora serca (right ventricle), **RVH** – przerost prawej komory serca (right ventricular hypertrophy), **RVP** – ciśnienie w prawej komorze serca (right ventricular pressure), **RVSP** – ciśnienie skurczowe w prawej komorze serca (right ventricular systolic pressure), **s.c.** – podskórnie (subcutaneously), **SERT** – transporter serotoniny (serotonin transporter), **SHR** – szczury spontanicznie rozwijające nadciśnienie (spontaneously hypertensive rats), **SMC** – komórka mięśni gładkich (smooth muscle cell), **Su** – sugen (SU-5416), **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (vascular endothelial growth factor), **VEGF-R2** – receptor typu 2 czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (vascular endothelial growth factor receptor), **VIP** – wazoaktywny peptyd jelitowy (vasoactive intestinal peptide).

WSTĘP

Badania przedkliniczne są istotnym etapem rozwoju każdego leku. Są podstawowym sposobem oceny efektywności i bezpieczeństwa nowych substancji o potencjalnym działaniu terapeutycznym. W zależności od uzyskanych wyników podejmuje się decyzję o dalszych próbach klinicznych. Próby przedkliniczne pozwalają m.in. na określenie właściwości farmakologicznych, farmakokinetycznych oraz toksyczności badanych związków. Takie eksperymenty są prowadzone w warunkach *in vitro* na modelach komórkowych lub *in vivo* na modelach zwierzęcych. Badania z zakresu farmakologii eksperymentalnej oparte na wykorzystaniu zwierząt doświadczalnych służą ocenie skuteczności terapeutycznej substancji. Są także użytecznym narzędziem w poszukiwaniu nowych szlaków sygnałowych, co przyczynia się do zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw rozwoju chorób. Pozwala to na określenie nowych punktów uchwytu dla potencjalnych leków. Modele zwierzęce cieszą się dużym zainteresowaniem wśród badaczy; niejednokrotnie oparte na inwazyjnych procedurach pozwalają na prowadzenie badań w sposób, który byłby niemożliwy u ludzi. Wśród nich wymienia się modele genetycznie modyfikowane jak i modele niegenetyczne. W tych ostatnich fenotyp przypominający badany proces chorobowy rozwija się po ingerencji chirurgicznej (np. zwężenie/zamknięcie naczynia krwionośnego), wdrożenia odpowiedniego sposobu żywienia (np. pokarm z dużą zawartością cholesterolu) czy warunków utrzymywania (np. przewlekłe niedotlenienie). W przypadku tzw. modeli spontanicznych do rozwoju danej choroby u wybranych szczepów zwierząt dochodzi samoistnie w wyniku określonych mutacji. Na przykład w badaniach przedklinicznych dotyczących cukrzycy i otyłości stosuje się myszy z upośledzonym wydzieleniem leptyny (ob/ob) lub brakiem czynnych receptorów leptyny (db/db), do programowania zespołu metabolicznego – myszy Agouti, a w nadciśnieniu tętniczym szczury SHR (spontaneously hypertensive rat) bądź Dahl SS (salt-sensitive). Ogólnie, od modeli zwierzęcych oczekuje się aby przyczyna i objawy (fenotyp) choroby były odwzorowaniem jej „ludzkiego” obrazu. Złożoność patomechanizmów i brak pełnego zrozumienia przebiegu wielu schorzeń sprzyja wyborom bardziej uproszczonych systemów, w których dochodzi do wywołania jedynie pewnych składowych procesu patologicznego [63]. Kierowanie się w wyborze modelu łatwością jego uży-

cia, a nie stopniem odzwierciedlenia procesu patofizjologicznego, podobnie jak brak standaryzacji czy też wykorzystywanie różnych modeli zwierzęcych do badania patogenezy, zapobiegania lub leczenia tej samej choroby może przesądzać o trudnościach interpretacyjnych otrzymanych wyników. Do chorób cieszących się rosnącym zainteresowaniem badaczy, prowadzących poszukiwania z zakresu farmakologii eksperymentalnej jak i klinicyzacji, zalicza się nadciśnienie płucne (PH, pulmonary hypertension). Definiuje się je jako podwyższenie średniego ciśnienia w tętnicy płucnej (mPAP) ≥ 25 mmHg w spoczynku, oznaczone za pomocą cewnikowania prawego serca [29]. Pierwsze leki działające swoiście na tętniczkę płucną w ramach tzw. farmakoterapii celowanej zarejestrowano w 1995 r. (FDA). Od tego czasu przeprowadzono ponad 600 badań interwencyjnych na modelach zwierzęcych [76]. Służyły zarówno poszukiwaniu nowych możliwości terapeutycznych, jak i wyjaśnieniu mechanizmów rozwoju tego schorzenia obejmujących liczne szlaki biochemiczne. Przyczyniał się do tego ciężki przebieg, wieloczynnikowy patomechanizm oraz - jak dotąd - brak możliwości pełnego wyleczenia. O trafności identyfikacji potencjalnie skutecznych substancji do dalszej oceny w próbach klinicznych decyduje wiele czynników, w tym dobór właściwego modelu badawczego. Obecnie nie jest znany model, który w pełni odzwierciedlałby obraz kliniczny „ludzkiej” postaci choroby. Od modelu zwierzęcego oczekuje się powtarzalności uzyskiwanych wyników, braku działań niepożądanych, niewielkiej inwazyjności oraz stosunkowo niskich kosztów prowadzonych eksperymentów. Przykładowy zakres zmian hemodynamicznych i histopatologicznych, które powinien obrazować eksperymentalny model tętniczego nadciśnienia płucnego w „ludzkiej” postaci choroby podsumowano w tabeli 1.

Modele zwierzęce PH są zróżnicowane, różnice dotyczą zarówno metodyki wywołania schorzenia (modele genetyczne i niegenetyczne), jak i mechanizmu działania poszczególnych czynników indukujących i wynikających z niego zakresu zmian hemodynamicznych i histopatologicznych w obrębie krążenia płucnego (serce i naczynia płucne). Znajomość indukowanych zmian, przy jednoczesnym krytycznym porównaniu ich podobieństwa do zmian jakie rozwijają się u ludzi w przebiegu choroby, zwiększa szansę na przełożenie wyników poszukiwań przedklinicznych na badania kliniczne. Brak takiego przełożenia może spowodować

Tabela 1. Przykładowy zakres zmian hemodynamicznych i histopatologicznych, które powinien obrazować eksperymentalny model tętniczego nadciśnienia płucnego „ludzkiej” postaci choroby [19, 74]

Zmiany hemodynamiczne
Podwyższenie średniego ciśnienia w tętnicy płucnej (mPAP) oraz ciśnienia skurczowego w prawej komorze serca (RVSP)
Obniżenie pojemności minutowej serca (CO)
Zmiany histopatologiczne
Przerost mięśnia prawej komory serca
Przebudowa tętnic płucnych
Faza wczesna
Przerost błony środkowej oraz wewnętrznej tętnic płucnych
Faza późna
Koncentryczne warstwowe włóknienie błony wewnętrznej tętnic płucnych
Zmiany spłotowate
Poszerzenie tętnic płucnych
Zakrzepica miejscowa (<i>in situ</i>)
Rozwój zapalenia okołonaczyniowego

wać to, że potencjalne korzyści terapeutyczne, jakie w ciągu ponad 20 lat wykazano w badaniach zwierzęcych dla wielu testowanych substancji w PH, nie znalazły potwierdzenia w próbach klinicznych. Na przykład w badaniach eksperymentalnych wykazano wpływ inhibitorów reduktazy HMG-CoA (statyn) na odwrócenie/prewencję schorzenia przez: obniżenie parametrów hemodynamicznych (ciśnienie w tętnicy płucnej – PAP i prawej komorze serca – RVP), a także ograniczenie przerostu RV, remodelingu naczyń płucnych i pogrubienia mięśniówki gładkiej przez zmniejszenie procesów proliferacji, a nasilenie apoptozy komórek mięśni gładkich (SMC) [79]. Wyniki nie znalazły pełnego potwierdzenia w próbach klinicznych, a odnotowane korzyści obejmowały wprawdzie redukcję przerostu prawej komory mięśnia sercowego i obniżenie poziomu markerów związanych z PAH (NTproBNP, P-selektyna), ale miały charakter przemijający [33, 93, 94].

W artykule opisano najczęściej wykorzystywane i najlepiej poznane modele zwierzęce w PH. Przedstawiona analiza ma na celu ocenę ich przydatności w poszukiwaniu nowych leków w nadciśnieniu płucnym oraz w badaniu patomechanizmu choroby. Po krótkim omówieniu postaci klinicznych oraz patomechanizmu nadciśnienia płucnego w artykule opisano: modele klasyczne, ich modyfikacje (modele alternatywne), model Sugenu w połączeniu z ekspozycją na przewlekłe niedotlenienie, modele indukcji PH związanego z wrodzonymi chorobami serca oraz modele genetyczne. Przedstawiono mechanizm działania poszczególnych czynników indukujących PH oraz zakres wywołanych zmian charakteryzujący poszczególne modele. Odniesiono się do związanego z rozwojem PH stopnia pogorszenia wybranych parametrów hemo-

dynamicznych (ciśnienie w prawej komorze serca i w tętnicy płucnej), jak i przerostu prawej komory mięśnia sercowego oraz przebudowy tętnic płucnych. Omówiono technikę i warunki indukcji nadciśnienia płucnego dla wybranych metod. Zwrócono uwagę na różnice międzygatunkowe wykorzystywanych zwierząt doświadczalnych. Podsumowano potencjalne korzyści i ograniczenia omawianych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego w badaniach przedklinicznych.

KLASYFIKACJA KLINICZNA I ZARYS PATOMECHANIZMU NADCIŚNIENIA PŁUCNEGO

Klasyfikacja kliniczna PH (V Światowe Sympozjum Nadciśnienia Płucnego, Nicea, 2013) różnicuje pięć głównych grup schorzenia: 1 – tętnicze nadciśnienie płucne (PAH), 2 – PH spowodowane chorobami lewej części serca, 3 – PH w przebiegu chorób płuc i/lub hipoksji, 4 – przewlekłe PH zakrzepowo-zatorowe (CTEPH), 5 – PH o niewyjaśnionym i/lub wieloczynnikowym patomechanizmie [18, 70]. Grupy te różnią się etiologią, epidemiologią, histopatologią, rokowaniem oraz podejściem terapeutycznym. Szczególnie ciężką i postępującą postacią jest tętnicze nadciśnienie płucne, nazywane również „złośliwym”, w którym może dojść do rozwoju płucnej pleksogennej arteriopatii [61, 74]. Zróznicowanie kliniczne nadciśnienia płucnego utrudnia właściwy dobór modelu zwierzęcego w badaniach przedklinicznych. Obecnie większość wykorzystywanych modeli zwierzęcych odzwierciedla zmiany charakterystyczne dla tętniczego nadciśnienia płucnego. Zastosowanie opisanych modeli zwierzęcych w badaniach przedklinicznych PH w klasyfikacji klinicznej schorzenia podsumowano w tabeli 2.

Tabela 2. Zastosowanie modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego w badaniach przedklinicznych do klasyfikacji klinicznej PH [57, 74]

Model zwierzęcy	Gatunek/szczep	Postać kliniczna PH
Modele klasyczne		
Ekspozycja na przewłokłe niedotlenienie (hipoksję) (CH)	myszy*, szczury*, cielęta, owce, świnię	grupa 1/3
Ekspozycja na przewłokłe niedotlenienie szczurów Fawn-hooded (FH)	szczury FH	grupa 1/3
Model monokrotaliny (MCT)	szczury*, owce, psy, świnię	grupa 1
Modele alternatywne		
Ekspozycja na MCT w połączeniu z usunięciem lewego płuca (LP)	szczury	grupa 1
Ekspozycja na MCT w połączeniu z przewłokłym niedotlenieniem (CH)	szczury	grupa 1/3
Sugen w połączeniu z ekspozycją na przewłokłe niedotlenienie		
Sugen w połączeniu z ekspozycją na przewłokłe niedotlenienie (CH)	myszy, szczury	grupa 1/3
Modele indukcji PH związanego z wrodzonymi chorobami serca		
Banding tętnicy płucnej (PAB)	myszy*, szczury*, kozy	grupa 1/2
Wytworzenie przecieku pomiędzy krążeniem systemowym i płucnym (left-to-right shunt)	szczury*, owce, psy, świnię	grupa 1
Modele genetyczne		
Delecja genu BMPR2	myszy	grupa 1
Delecja genu receptora ET-B	szczury	
Delecja genu VIP	myszy	
Delecja genu NEP	myszy	
Delecja genu ApoE	myszy	
Nadekspresja genu Ang-1	szczury	
Nadekspresja genu IL-6	myszy	
Nadekspresja genu białka S100A4/Mst1	myszy	
Nadekspresja genu SERT	myszy	

* – gatunki najczęściej wykorzystywane w badaniach przedklinicznych nadciśnienia płucnego; Ang-1 – angiopoetyna-1; ApoE – apolipoproteina E; BMPR2 – receptor białka morfogenetycznego kości typu 2; CH – przewłokłe niedotlenienie; ET-B – receptor typu B dla endoteliny 1; FH – szczury szczepu Fawn-hooded; IL-6 – interleukina 6; LP – usunięcie lewego płuca; MCT – monokrotalina; NEP – neprylizyna; PAB – banding tętnicy płucnej; PH – nadciśnienie płucne; SERT – transporter serotoniny; VIP – wazoaktywny peptyd jelitowy.

Mimo dużego postępu w diagnostyce, farmakoterapii oraz rozwoju leczenia operacyjnego, nadciśnienie płucne nadal pozostaje chorobą nieuleczalną i jest obarczone dużą śmiertelnością. Obecnie stosowane leki łagodzą objawy kliniczne PH, poprawiają jakość życia

pacjentów i wydłużają czas przeżycia, ale nie powodują całkowitego wyleczenia [17, 33]. Przyczyną może być wieloczynnikowy patomechanizm choroby, który obejmuje wiele szlaków biochemicznych oraz różne typy komórek i geny. Dotychczas wykazano, że w przebiegu

nadciśnienia płucnego dochodzi do dysfunkcji śródbłonna tętnic płucnych z zaburzeniem równowagi między szlakami sygnałowymi z udziałem substancji o działaniu wazodylatacyjnym, antymitotycznym i antyproliferacyjnym (tlenku azotu, prostacykliny – PGI₂) a substancjami o działaniu prozapalnym, mitogennym i wazokonstrykcyjnym (endotelina-1, tromboksan A₂). Zaburzenia powodują przebudowę tętnic płucnych oraz wzrost płucnego oporu naczyniowego (PVR). Dochodzi do obciążenia następczego prawej komory serca i przerostu jej ścian. Zmiany powodują rozwój niewydolności prawokomorowej serca. Tym niemniej wciąż poszukuje się nowych mechanizmów zaangażowanych w patogenezę nadciśnienia płucnego, które pozwolą na optymalizację obecnej farmakoterapii i odkrycie nowych punktów uchwytu leków. W tym celu wykorzystuje się modele zwierzęce. Wśród obecnie badanych ścieżek sygnałowych znajduje się szlak płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF), czynnika wzrostu fibroblastów (FGF), czynnika wzrostu naskórka (EGF) oraz szlak RhoA i jej kinaz. Zainteresowanie badaczy wzbudzą również szlaki związane z przekazywaniem serotonergicznym, beta-adrenergicznym, układem renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS), szlaki pobudzenia receptorów aktywowanych proliferatorami peroksydomów (PPAR) oraz szlak aktywacji kanałów potasowych [33].

MODELE KLASYCZNE

Model ekspozycji na przewłękłe niedotlenienie (hipoksję, CH)

Przewłękłe niedotlenienie (CH, chronic hypoxia) jest jedną z najczęściej wykorzystywanych metod indukcji nadciśnienia płucnego u zwierząt doświadczalnych. Badania wykorzystujące tę metodę zapoczątkowano w latach 70 XX w. [48]. Sugeruje się zastosowanie tego modelu w badaniach dotyczących nadciśnienia płucnego, które rozwija się w przebiegu chorób układu oddechowego i/lub hipoksji (grupa 3). Zalicza się do nich m.in. przewłękłą obturacyjną chorobę płuc, obturacyjny bezdech senny oraz śródmiąższową chorobę płuc. Natomiast, jak podkreślają eksperci, zastosowanie modelu CH do badań innych postaci schorzenia, w tym tętniczego nadciśnienia płucnego, może być obarczone błędem [65].

W omawianym modelu przewłękła hipoksja powoduje przebudowę naczyń płucnych. Dochodzi do maskularyzacji małych tętniczek płucnych przy jednoczesnym wzroście ekspresji α -aktyny komórek mięśni gładkich (SMC) oraz maskularyzacji tętnic mięśniowych przedwłośniczkowych. Przewłękłe niedotlenienie powoduje przerost i zeszywnienie tętnic proksymalnych [74]. Opisane zmiany zachodzą głównie w warstwie błony zewnętrznej oraz błony środkowej tętnic płucnych. Są spowodowane migracją i proliferacją komórek mięśni gładkich, akumulacją fibroblastów, miofibroblastów oraz akumulacją składowych macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak: kolagen, elastyna, fibronektyna

i tenascyna. W wyniku przebudowy tętnic płucnych dochodzi do wzrostu płucnego oporu naczyniowego (PVR), średniego ciśnienia w tętnicy płucnej (mPAP), a także do wzrostu ciśnienia skurczowego w prawej komorze serca (RVSP) oraz jej przerostu. Mało jest jednak doniesień potwierdzających rozwój niewydolności prawokomorowej serca w tym modelu [47, 69, 73, 83].

Ten powszechnie wykorzystywany w badaniach przedklinicznych model, opiera się na wywołaniu przewłękłego niedotlenienia przez umieszczenie zwierząt laboratoryjnych (myszy lub szczury) w komorze normobarycznej w warunkach hipoksji (stężenie tlenu około 10%) lub w komorze hipobarycznej na 2-5 tygodni [30, 60, 80, 81]. Wskazuje się na pewne różnice międzygatunkowe oraz różnice między szczepami w odpowiedzi na przewłękłe niedotlenienie. Przykładowo, u myszy może dochodzić do mniejszej przebudowy naczyń płucnych, co wynika z ograniczonej proliferacji komórek mięśni gładkich tętnic płucnych (PASMCS). Najbardziej podatnym szczepem na indukcję PH w tym modelu są myszy C57BL6 [69]. Natomiast ekspozycja nowo narodzonych cieląt na przewłękłe niedotlenienie powoduje rozwój cięższej postaci nadciśnienia płucnego w porównaniu do myszy i szczurów. Inne gatunki zwierząt, takie jak: owce, świnię, cielęta są rzadziej wykorzystywane do badań nad PH, ze względu na ich rozmiar, większe koszty prowadzonych eksperymentów i względy etyczne. Odpowiedź na przewłękłe niedotlenienie może być również uwarunkowana wiekiem i płcią zwierząt. Wykazano, że młodsze osobniki są bardziej podatne na działanie przewłękłej hipoksji. Natomiast u wszystkich gatunków zwierząt obserwuje się stopniową redukcję i normalizację powstałych zmian hemodynamicznych oraz histopatologicznych w wyniku przerwania ekspozycji na przewłękłe niedotlenienie [48, 65, 74]. Opisane różnice międzygatunkowe w odpowiedzi na przewłękłą hipoksję, ograniczają wykorzystanie tego modelu w badaniach przedklinicznych [57, 65].

Model przewłękłego niedotlenienia charakteryzuje się powtarzalnością oraz przewidywalnością wyników otrzymanych z użyciem wybranego szczepu zwierząt. Jest to zaletą modelu, podobnie jak prosta technika wywołania nadciśnienia płucnego oraz relatywnie niskie koszty [8]. Ograniczeniem jest to, że przewłękłe niedotlenienie powoduje rozwój nadciśnienia płucnego o umiarkowanym stopniu ciężkości. W dotychczasowych badaniach eksperymentalnych nie udało się wywołać postaci przetrwałego PH; przerwanie ekspozycji na niedotlenienie zwykle normalizuje zaindukowane zmiany hemodynamiczne i histopatologiczne [2]. W próbach przedklinicznych nie zaobserwowano również charakterystycznych dla tętniczego nadciśnienia płucnego zmian, takich jak: hiperplazja warstwy wewnętrznej tętnic płucnych, jej zwłóknienie oraz rozwój zmian spłotowatych. Wyjątkiem jest model przewłękłej hipoksji stosowany u szczurów Fawn-hooded-FH (Fawn-hooded rat pulmonary hypertension).

Model przewlekłego niedotlenienia szczurów Fawn-hooded (FH)

Szczep 'Fawn-hooded' uzyskano w wyniku połączenia szczepów 'German brown', szczurów 'Albino' oraz 'Long Evan's' [65]. Poddanie tego szczepu warunkom przewlekłego niedotlenienia pozwala na wywołanie najcięższej postaci nadciśnienia płucnego spośród wszystkich gatunków gryzoni wykorzystywanych w tym modelu [74]. Jest to, jak na razie, jedyny model PH, w którym w wyniku niedotlenienia spontanicznie rozwija się postać tętniczego nadciśnienia płucnego.

Spontaniczny rozwój nadciśnienia płucnego u szczurów FH może wynikać z wrodzonego upośledzenia wychwytu serotoniny w płytkach krwi oraz zmniejszonej liczby pęcherzyków płucnych [74]. W mechanizmie indukcji PH wskazuje się również na udział czynnika HIF-1 α , odpowiedzialnego za proliferację komórek mięśni gładkich, jak i kanałów potasowych oraz mitochondrialnych reaktywnych form tlenu [5]. Ekspozycja szczurów FH na umiarkowaną hipoksję przyspiesza rozwój nadciśnienia płucnego, co może spowodować rozwój ciężkiej postaci choroby. Obserwuje się wzrost średniego ciśnienia w tętnicy płucnej, ciśnienia skurczowego w prawej komorze serca i jej przerost oraz przebudowę naczyń płucnych. To ostatnie wynika z przerostu warstwy środkowej oraz hiperplazji warstwy wewnętrznej tętnic płucnych. Jednocześnie dochodzi do rozwoju nadciśnienia tętniczego systemowego, co jest ograniczeniem tego modelu [65, 68]. Opisany model jest wykorzystywany głównie w badaniach nad czynnikami genetycznymi, które predisponują do rozwoju tętniczego nadciśnienia płucnego.

Model monokrotaliny (MCT)

Metoda indukcji nadciśnienia płucnego z użyciem **monokrotaliny (MCT)** została opisana po raz pierwszy w 1967 r. [37]. Obecnie modele oparte na iniekcji monokrotaliny należą, oprócz przewlekłej hipoksji, do najczęściej wykorzystywanych w badaniach eksperymentalnych nad PH. Na przykład, w ostatnich 15 latach ponad 60% modeli doświadczalnych tego schorzenia, użytych w poszukiwaniach nowych związków o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym w nadciśnieniu płucnym, opierało się na przewlekłej ekspozycji na MCT [76]. Na modelu MCT prowadzono również próby eksperymentalne, poprzedzające zakończone sukcesem badania kliniczne, oceniające skuteczność substancji później zarejestrowanych w terapii swoistej tętniczego nadciśnienia płucnego, takich jak: antagoniści receptora endoteliny, inhibitory fosfodiesterazy-5, analogi prostacykliny oraz najnowszy lek – seleksypag (EMA, 2016) [40, 55, 58].

Monokrotalina (MCT) jest toksycznym alkaloidem pirolizydynowym, otrzymywanym z nasion rośliny z gatunku *Crotalaria spectabilis*. Za toksyczne działanie MCT odpowiada jej aktywny metabolit – dehydromonokrotalina (MCTP), który powstaje w wątrobie w wyniku dehy-

dratacji MCT z udziałem izoenzymu cytochromu P-450 (CYP 3A4) [20]. Dokładny mechanizm indukcji nadciśnienia płucnego nie jest w pełni poznany. Wiadomo, że dehydromonokrotalina uszkadza śródbłonek naczyń płucnych. Mechanizm działania MCTP jest również związany z rozwojem stanu zapalnego w wyniku akumulacji komórek tłuszczowych, makrofagów w naczyniach płucnych oraz prozapalnych cytokin (m.in. IL-1 β , IL-6) w obrębie płuc [71, 74, 77]. W modelu MCT obserwuje się wzmożoną proliferację komórek mięśni gładkich w ścianach tętnic płucnych, przy wzroście ich oporności na apoptozę oraz nasilenie apoptozy komórek śródbłonna. Następnym wyżej opisanych procesów jest przebudowa naczyń płucnych; dochodzi do maskularyzacji ścian tętnic płucnych, zwłaszcza małych naczyń. Obserwuje się także przerost i hiperplazję warstwy środkowej oraz przerost tkanki łącznej w warstwie zewnętrznej i wewnętrznej tętnic płucnych. Zmiany patomorfologiczne w tętnicach płucnych prowadzą do podwyższenia średniego ciśnienia w tętnicy płucnej, ciśnienia skurczowego w prawej komorze mięśnia sercowego i jej przerostu, a w konsekwencji do rozwoju niewydolności prawokomorowej serca [20, 58].

Technika wywołania nadciśnienia płucnego w tym modelu polega na pojedynczym, podskórnym (s.c.) lub dootrzewnowym (*i.p.*) wstrzyknięciu monokrotaliny w dawkach 40-80 mg/kg masy ciała (m.c.). Najczęściej stosowaną jest dawka 60 mg/kg m.c., czas wywołania PH wynosi zwykle 3-4 tygodnie [13, 27]. Zarówno wielkość zastosowanej dawki MCT, jak i czas indukcji, może wpływać na intensywność wywołanych zmian [58]. Gatunkiem preferowanym w modelu monokrotaliny jest szczur. Pozostałe gatunki wykorzystywane w badaniach nad PH, takie jak myszy lub psy, nie metabolizują MCT do jej aktywnej postaci ze względu na odmienne szlaki zaangażowane w metabolizm wątrobowy związku. W takim przypadku, w celu wywołania PH sugeruje się podanie aktywnej MCTP [69, 74]. Wywołane nadciśnienie płucne charakteryzuje jednak mniejszy przerost mięśnia prawej komory serca oraz przebudowa naczyń płucnych w porównaniu do szczurów. Większe ssaki, np. psy czy świnię, są rzadziej wykorzystywane w modelu MCT [57, 58].

Modelowi MCT przypisuje się przewidywalność i powtarzalność otrzymywanych wyników w odniesieniu do wybranego szczepu zwierząt oraz prostą technikę indukcji w połączeniu z relatywnie niskimi kosztami. Podanie monokrotaliny umożliwia wywołanie wielu zmian odzwierciedlających obraz kliniczny schorzenia u ludzi. W przeciwieństwie do modelu przewlekłego niedotlenienia, MCT indukuje ciężką postać nadciśnienia płucnego. Ograniczenia zastosowania tego modelu w badaniach przedklinicznych wynikają z różnic międzygatunkowych zwierząt doświadczalnych oraz braku rozwoju zmian splotowatych. Nie bez znaczenia pozostaje znaczna toksyczność monokrotaliny i związana z tym duża śmiertelność zwierząt. Dotyczy to zwłaszcza zastosowania wysokich dawek związku czy długiego, tj. powyżej 35

dni czasu indukcji. Monokrotalina może powodować niekorzystne uszkodzenie wątroby, nerek oraz serca. Zmiany opisywane w literaturze jako „syndrom MCT”, nie występują w przebiegu rozwoju nadciśnienia płucnego u ludzi [20, 58].

MODYFIKACJE MODELI KLASYCZNYCH (MODELE ALTERNATYWNE) – MODELE ŁĄCZĄCE EKSPOZYCJĘ NA MONOKROTALINĘ (MCT) Z USUNIĘCIEM LEWEGO PŁUCA (LP) LUB PRZEWLEKŁĄ HIPOKSJĄ (CH)

Brak idealnego modelu zwierzęcego, który odzwierciedlałby nadciśnienie płucne w ciężkości i obrazie klinicznym odpowiadającym „ludzkiej” postaci tego schorzenia, skłonił badaczy do dalszych prac nad metodami wywołania PH. Zaproponowano wiele modyfikacji modeli klasycznych i określono je wspólnym mianem modeli alternatywnych. Dotychczasowe doświadczenia z modelami alternatywnymi potwierdzają zakładane korzyści związane z wywołaniem cięższej i nieodwracalnej postaci nadciśnienia płucnego. Obserwuje się przebudowę naczyń płucnych z charakterystycznymi zmianami spłotowatymi oraz warstwą neointima, co stanowi o przewadze powyższych modeli nad metodami klasycznymi [74].

Modyfikacje modelu monokrotaliny przez usunięcie lewego płuca (LP, left pneumonectomy) (LP+MCT) lub przewlekłej ekspozycji na niedotlenienie (MCT+CH) wywołują ciężką postać nadciśnienia płucnego. W porównaniu do metod klasycznych uzyskano dalsze pogorszenie parametrów hemodynamicznych (mPAP, RVSP) oraz większy przerost prawej komory serca, co prowadzi do rozwoju niewydolności prawokomorowej serca. Opisany w modelach alternatywnych obraz patomorfologiczny tętnic płucnych, w tym: koncentryczne zwłóknienia warstwy neointima, zmiany spłotowate oraz okluzja naczyń z obecnymi skrzepinami fibryny [54, 89] nie był obserwowany w modelach CH i MCT [57, 59].

Metoda eksperymentalna łącząca monokrotalinę z usunięciem lewego płuca została po raz pierwszy zastosowana w latach 90. ub.w. Dowiedziono, że usunięcie lewego płuca wywołuje zaburzenia hemodynamiczne, w tym podwyższenie ciśnienia tętniczego krwi oraz płucnego przepływu krwi, co w połączeniu z toksycznym działaniem monokrotaliny indukuje ciężką postać PH. MCT (60 mg/kg m.c., s.c. lub i.p.) podaje się 7 dni po usunięciu lewego płuca. Okres wywołania PH wynosi zwykle 4 tygodnie od podania monokrotaliny. Gatunkiem z wyboru jest szczur [15, 44, 45]. W modelach łączących MCT z przewlekłą ekspozycją na hipoksję, zwierzęta umieszcza się w komorze normobarycznej lub hipobarycznej, a następnie poddaje jednorazowej iniekcji monokrotaliny (60 mg/kg m.c., s.c. lub i.p.). Okres wywołania wynosi zwykle 2-4 tygodnie od podania monokrotaliny, gatunkiem z wyboru jest szczur [41].

Jak wynika z przeglądu literatury [48], opisane wyżej metody, choć lepiej odzwierciedlają patomorfologię naczyń płucnych, nie są tak powszechnie wykorzystywane w badaniach przedklinicznych nad nowymi

lekami w PH jak modele klasyczne. W ostatnich 15 latach w mniej niż 5% eksperymentach na zwierzętach zastosowano modyfikacje metody monokrotalinowej [76]. Prawdopodobnie może to być związane z pozostającym na razie znacznym ryzykiem toksyczności i śmiertelnością zwierząt. Nie bez znaczenia pozostają także wyższe koszty prowadzonych badań [57, 68].

Po raz pierwszy model oparty na połączeniu Sugenu z ekspozycją na przewlekłe niedotlenienie został opisany przez Taraseviciene-Stewart i wsp. w 2001 r. Badanie przeprowadzono na szczurach [78].

Sugen (SU-5416, semaxinib) początkowo badano pod kątem jego potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej. Jako inhibitor receptora typu 2 (VEGF-R2) czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF), należącego do rodziny receptorów kinazy tyrozynowej, SU-5416 powoduje apoptozę komórek śródbłonka naczyń krwionośnych [65, 67]. W wyniku ekspozycji na Sugen w połączeniu z przewlekłym niedotlenieniem dochodzi do proliferacji komórek śródbłonka odpornych na proces apoptozy. Obserwuje się również rozrost warstwy śródbłonkowej wraz z okluzją naczyń przedłożniczkowych i rozwój zmian spłotowatych [35, 57, 74]. Dochodzi do zmian o charakterze przerostowym w obrębie warstwy środkowej tętniczek płucnych, spowodowanych proliferacją komórek mięśni gładkich, ich maskularyzacją, a także rozwoju warstwy neointimy. Na przykład zmiany spłotowate w małych tętnicach płucnych pojawiają się u szczurów w późnym etapie rozwoju nadciśnienia płucnego, tj. ≥ 10 tygodni po zakończonej ekspozycji na przewlekłe niedotlenienie [1, 9, 19, 68].

Technika indukcji nadciśnienia płucnego polega na pojedynczym podaniu Sugenu (20 mg/kg m.c., s.c.), a następnie umieszczeniu zwierząt w komorze normo- lub hipobarycznej na 3-4 tygodnie. Opcjonalnie po zakończonej ekspozycji na przewlekłe niedotlenienie, zwierzęta laboratoryjne utrzymuje się w warunkach normoksji przez kilka tygodni [56]. Brak redukcji bądź normalizacji wywołanych wcześniej zmian, świadczą o przetrwałym i nieodwracalnym charakterze PH. Metodę indukcji PH w tym modelu przedstawiono na ryc. 1; do badań wybrano szczura. Wykazano pewne różnice w odpowiedzi na wywołanie schorzenia w wykorzystywanych szczepach zwierząt. Jak dotąd, szczep Sprague-Dawley okazał się najbardziej podatny na rozwój zmian związanych z PH w opisywanym modelu doświadczalnym [34].

Ciuclan i wsp. w 2011 r. zaproponowali modyfikację modelu z przeznaczeniem dla myszy. W tym przypadku, Sugen (20 mg/kg m.c., s.c.) podaje się co 7 dni przez 3-4 tygodnie. W tym czasie myszy są umieszczone w komorze normo- lub hipobarycznej. Okazało się jednak, że u myszy rozwija się „łżejsza” postać choroby; przebudowa naczyń płucnych jest mniejsza, bez charakterystycznych zmian spłotowatych, a parametry hemodynamiczne (RVSP, mPAP) osiągają mniejsze

wartości. W wyniku przerwania ekspozycji na hipoksję, dochodzi do poprawy hemodynamiki prawej komory mięśnia sercowego wraz z ograniczeniem jej zmian przerostowych. Dlatego też w dalszym ciągu prowadzi się badania nad uzyskaniem „mysiej” nieodwracalnej postaci nadciśnienia płucnego z wykorzystaniem Sugenu jako czynnika indukującego [5, 69, 82, 85].

Model Su+CH jest coraz częściej wykorzystywany w badaniach przedklinicznych nadciśnienia płucnego, a zwłaszcza tętniczego nadciśnienia płucnego. Przypisuje mu się duże znaczenie praktyczne ze względu na indukcję ciężkiej postaci nadciśnienia płucnego oraz odzwierciedlenie pleksogennej arteriopatii płucnej charakterystycznej dla PAH. Wskazuje się również na mniejszą toksyczność oraz większą przeżywalność zwierząt laboratoryjnych w porównaniu do obecnie najczęściej wykorzystywanego modelu MCT [65]. Potencjalne ograniczenia modelu Su+CH wynikają z braku rozwoju zapalenia okołonaczyniowego oraz różnic w obrazie histopatologicznym zmian spłotowatych u zwierząt doświadczalnych i ludzi [7, 57, 74].

Ekspozycja na przewlekłe niedotlenienie nie jest konieczna do wywołania ciężkiej postaci nadciśnienia płucnego. Podobny zakres zmian hemodynamicznych i histopatologicznych uzyskuje się wskutek połączenia SU-5416 z usunięciem lewego płuca lub z podaniem albuminy jaja kurzego (ovalbumin) [25, 52].

ZWIERZĘCE MODELE INDUKCJI PH ZWIĄZANEGO Z WRODZONYMI CHOROBYMI SERCA

Jak wynika z przedstawionej wcześniej klasyfikacji, nadciśnienie płucne może być następstwem wrodzonych wad serca, w przebiegu których dochodzi do przeciążenia prawej komory serca (RV), jej przebudowy oraz dysfunkcji [18]. Dla odzwierciedlenia patomorfologii i dysfunkcji RV zaprojektowano modele bazujące na zwężeniu tętnicy płucnej, tzw. bandingu (PAB, pulmonary artery banding) [46, 84] oraz wytworzeniu przecieku między krążeniem systemowym i płucnym (left-to-right shunt) [65]. Modele te są także wykorzystywane w badaniach nad nowymi cząsteczkami mającymi odwracać lub zapobiegać zmianom związanym z przebudową i dysfunkcją RV [4, 42].

Model indukcji PH oparty na technice bandingu tętnicy płucnej lub wytworzeniu przecieku left-to-right shunt powoduje obciążenie prawej komory serca, co skutkuje jej dalszym włóknieniem oraz przerostem. Zaobserwowano także przebudowę i zwłóknienie tętnic płucnych, w tym zmiany spłotowate [4, 57, 68].

Metodę opartą na bandingu tętnicy płucnej proponowano dla celów farmakologii doświadczalnej na początku XXI w. [12, 48]. W badaniach wykorzystuje się głównie szczury i myszy. Początkowo zwierzęta poddawano lewej torakotomii, a następnie przez umieszczenie igły wzdłuż tętnicy płucnej, uzyskiwano zwężenie świa-

tła tętnicy płucnej do średnicy odpowiadającej średnicy igły [14, 28]. Obecnie opracowano nową metodę polegającą na wykorzystaniu specjalnych półzamkniętych klipsów, które umieszcza się wokół tętnicy płucnej, powodując zwężenie jej światła. Zmodyfikowana technika jest mniej skomplikowana i lepiej odzwierciedla dysfunkcję prawej komory serca. Zapewnia także lepszą przeżywalność okołoperacyjną zwierząt [26, 51, 57].

Model PH oparty na wytworzeniu przecieku między krążeniem systemowym i płucnym polega najczęściej na połączeniu aorty oraz żyły głównej górnej. W badaniach eksperymentalnych wykorzystuje się zwierzęta doświadczalne, takie jak psy, świnię, owce, szczury, cielęta [43, 64].

Wskazuje się na przydatność opisanych modeli w badaniach nad tętnicznym nadciśnieniem płucnym, którego rozwój jest spowodowany wrodzonymi chorobami serca oraz nadciśnieniem płucnym spowodowanym chorobami lewej części serca. Potencjalne ograniczenia wynikają z wysokiej śmiertelności zwierząt doświadczalnych oraz techniki indukcji PH opartej na ingerencji chirurgicznej, która wymaga dodatkowych umiejętności [57].

MODELE GENETYCZNE

W ostatnich latach wraz z rozwojem możliwości inżynierii genetycznej obserwuje się rosnące zainteresowanie modelami zwierzęcymi genetycznie modyfikowanymi. Dotyczy to także badań nadciśnienia płucnego; w patogenezie tego schorzenia duże znaczenie przypisuje się mutacjom genów kodujących cząsteczki lub białka receptorów uczestniczących w szlakach sygnałowych związanych z rozwojem PH. U niektórych osób chorych na tętnicze nadciśnienie płucne dochodzi do mutacji genu kodującego receptor typu 2 dla **białka morfogenetycznego kości (BMPR2)** oraz mutacji i genów kodujących kinazę podobną do receptora **aktywiny-1 i endogliny**. Wykazano także rzadkie mutacje heterozygotyczne w genach kodujących białka, takie jak **kawolina-1 (CAV1)** i białka kanału potasowego kodowanego przez gen **KCNK3** [18]. Dotychczasowe badania eksperymentalne nad patogenezą PH wskazują na udział w rozwoju schorzenia mutacji genów kodujących takie białka jak: **endotelina-1 (ET-1)**, **neprylizyna (NEP)**, serotonina czy **wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP)**. Było to punktem wyjścia do opracowania nowych modeli modyfikowanych genetycznie. Są obecnie częstą alternatywą dla klasycznych modeli opartych na iniekcji monokrotaliny lub wywołaniu przewlekłej hipoksji. Proponowane modyfikacje genetyczne mają zapewnić wywołanie pewnej cechy lub choroby przez wstawienie do genomu fragmentu DNA lub jego usunięcie (knock-out). W przypadku nadciśnienia płucnego dotyczą one genów kodujących białka uczestniczących w szlakach sygnałowych związanych z patomechanizmem PH. Modelom genetycznym przypisuje się dużą rolę w badaniach nad

etiologią oraz molekularnym i fizjologicznym podłożem tego schorzenia. Ze względu na stosunkowo łatwą ingerencję genetyczną, gatunkiem najczęściej wykorzystywanym są myszy, a ograniczeniem tego typu modeli – wysokie koszty eksperymentów [57].

W jednym z najczęściej stosowanych modeli genetycznych nadciśnienia płucnego wykorzystuje się mutację genu *BMPR2*. Gen ten koduje receptor typu 2 **białka morfogenetycznego kości (BMP)**, który odpowiada za prawidłową proliferację komórek naczyń krwionośnych. Heterozygotyczne mutacje genu *BMPR2* wykryto u około 75% chorych na dziedziczne PAH i u 25% chorych na postać idiopatyczną schorzenia. Do mutacji dochodzi w śródbłonku i mięśniówce gładkiej tętnic płucnych [17, 48]. W badaniach przedklinicznych wykorzystuje się modele na myszach. Model oparty na delecji eksonów 4 i 5 genu *BMPR2* okazał się niewystarczający. Homozygoty cechowała wysoka śmiertelność już w fazie rozwoju zarodkowego. Heterozygoty rozwijały łagodną postać PH pozbawioną wielu zmian związanych z rozwojem PH u ludzi, w tym przerostu prawej komory mięśnia sercowego [3, 57, 87]. Rozwiązaniem okazał się model związany z mutacją dominującą negatywną genu *BMPR2* w komórkach mięśni gładkich tętnic płucnych. Mutacja powoduje rozwój nadciśnienia płucnego z pogorszeniem parametrów hemodynamicznych (RVSP, mPAP), przerost prawej komory serca oraz maskularyzację małych tętniczek. W badaniach obserwowano także rozwój zmian spłotowatych [87, 92].

Wiedzą o udziale **endoteliny-1 (ET-1)** w patomechanizmie nadciśnienia płucnego wykorzystano zarówno w badaniach nad zastosowaniem terapeutycznym jej inhibitorów, jak i opracowaniem zwierzęcych modeli doświadczalnych. Endotelina-1 działa poprzez dwa typy receptorów: **ET-A** oraz **ET-B**, które należą do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G. Receptory typu ET-A i ET-B występują głównie w komórkach mięśni gładkich tętnic płucnych, a receptory typu ET-B są także liczne w komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych. Aktywacja receptorów ET-A i ET-B w komórkach mięśni gładkich prowadzi do skurczu tętnic płucnych i może powodować nadmierną proliferację oraz przebudowę naczyń krwionośnych. Aktywacja receptorów ET-B w komórkach śródbłonka powoduje rozkurcz tętnic płucnych, w wyniku uwalniania tlenku azotu (NO) oraz prostaglandyn. U osób cierpiących na nadciśnienie płucne dochodzi do podwyższenia poziomów endoteliny-1 wynikających prawdopodobnie z zaburzenia równowagi między aktywnością receptorów ET-A oraz ET-B [68]. W badaniach przedklinicznych wykorzystuje się modyfikowane genetycznie szczury z niedoborem receptorów ET-B, które poddaje się dodatkowo działaniu MCT lub przewlekłej hipoksji. Dodatkowa ekspozycja szczurów na monokrotalinę przyczynia się do wywołania ciężkiej postaci nadciśnienia płucnego, z rozwojem warstwy neointima i zapaleniem okołonaczyniowym w płucach [31, 32]. Jednak szlak sygnałowy związany z ET-1 stał się jednym z trzech głównych punktów uchwytu dla zareje-

strowanych leków – selektywnych (ambrisentan) bądź nieselektywnych (bozentan, macytentan) antagonistów receptorów endoteliny ET-A i ET-B stosowanych w celu odwrócenia niekorzystnych zmian w nadciśnieniu płucnym.

Inna modyfikacja genetyczna wykorzystywana do badań nad PH ukierunkowana jest na **wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP)**. Punktem uchwytu jest ograniczenie ekspresji genu tego neuropeptydu o działaniu przeciwpalnym i antyproliferacyjnym na komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych oraz wazodylatacyjnym na mięśnie gładkie dróg oddechowych [10, 91]. U osób cierpiących na nadciśnienie płucne może dochodzić do zmniejszenia ekspresji VIP w płucach. Wykorzystano to do opracowania modelu eksperymentalnego, w którym poprzez delecję genu VIP u myszy, wywołuje się umiarkowaną lub ciężką postać nadciśnienia płucnego. Dochodzi wówczas do wzrostu ciśnienia skurczowego w prawej komorze serca i jej przerostu. Tętnice płucne ulegają przebudowie wraz z przerostem mięśniówki gładkiej tętnic i małych tętniczek, a także rozwojem zapalenia okołonaczyniowego w płucach. Model charakteryzuje jednak wysoka śmiertelność wśród zwierząt doświadczalnych [66].

Neprylizyna (NEP) to transbłonowa metaloendopeptydaza, która katalizuje rozkład wielu peptydów, rozpowszechnionych w fibroblastach, komórkach śródbłonka oraz mięśni gładkich tętnic płucnych, takich jak: **przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ANP)**, **bradykinina**, **endotelina-1** czy **angiotensyna II**. Jak wykazano, ograniczenie ekspresji NEP może wzmacniać migrację i proliferację tych komórek, co prowadzi do przebudowy tętnic płucnych i rozwoju nadciśnienia płucnego [36, 90]. Takie ograniczenie syntezy białka NEP stwierdza się u osób z PH. Stało się to punktem wyjścia do opracowania modelu, w którym przez delecję genu *NEP* u myszy, poddanych dodatkowo hipoksji przez kilka tygodni, dochodzi do rozwoju ciężkiej postaci schorzenia z pogorszeniem parametrów hemodynamicznych, przerostem prawej komory serca oraz maskularyzacją tętnic płucnych [57].

Powszechnie wiadomo, że **apolipoproteina E (ApoE)** bierze udział w redukcji utlenowanych lipidów o niskiej gęstości i tym samym zapobiega rozwojowi miażdżycy tętnic [21]. Tę właściwość wykorzystano do opracowania innego zwierzęcego modelu nadciśnienia płucnego. U transgenicznych myszy z deficytem genu ApoE, otrzymujących dietę wysoko tłuszczową, rozwija się spontanicznie nadciśnienie płucne z opisywanymi wcześniej charakterystycznymi zmianami w hemodynamice i przebudową w obrębie krążenia płucnego [24]. Jak się okazało, zmianom tym towarzyszy obniżona ekspresja **adiponektyny (APN)**, hormonu polipeptydowego o działaniu przeciwpalnym, który reguluje wrażliwość tkanek na insulinę. Hipoteza o udziale samej adiponektyny w patomechanizmie PH znalazła potwierdzenie w zaproponowanym modelu zwierzę-

cym, opartym na braku genu adiponektyny APN. Opisane tu skrótoowo modele są obecnie wykorzystywane m.in. w badaniach nad powiązaniem rozwoju nadciśnienia płucnego z insulinoopornością i otyłością [48, 62, 75, 86].

W patomechanizmie rozwoju PH niewątpliwie istotną rolę odgrywa proces zapalny. W przebiegu tego schorzenia dochodzi do podwyższenia poziomu wielu czynników prozapalnych, a jednym z nich jest **interleukina-6 (IL-6)**. Ta prozapalna cytokina, jest wytwarzana głównie przez limfocyty T i makrofagi, komórki mięśni gładkich oraz w zewnętrznej błonie naczyń krwionośnych. Jej poziom w surowicy u osób chorych na tętnicze nadciśnienie płucne może korelować z ciężkością choroby i przeżywalnością pacjentów [16, 23]. Do celów farmakologii eksperymentalnej wykorzystuje się myszy, u których przez modyfikację genetyczną uzyskano nadekspresję IL-6 i w następstwie – rozwój nadciśnienia płucnego. Dodatkowa ekspozycja zwierząt na przewlekłe niedotlenienie indukuje cięższą postać PH. Model charakteryzuje się podwyższeniem ciśnienia skurczowego w prawej komorze serca, przerostem mięśnia prawej komory serca, maskularyzacją tętnic płucnych, rozwojem pleksogennej arteriopatii płucnej oraz zapaleniem okołonaczyniowym. Jak zaobserwowano w opisywanym modelu, nadekspresji IL-6 towarzyszy zwiększenie aktywności czynników proangiogennych, proliferacyjnych i antyapoptycznych, co tłumaczy mechanizm wywołania przebudowy naczyń krwionośnych, a zarazem podkreśla rolę samej **IL-6** w rozwoju nadciśnienia płucnego [72, 74].

W modelu genetycznym, wykorzystywanym w badaniach nad patomechanizmem PH, wywołuje się nadekspresję **angiopoetyny-1 (Ang-1)**. Angiopoetyna-1 to ligand glikoproteinowy wydzielany przez komórki mięśni gładkich, który działa przez receptor **TIE-2** związany z **kinazą tyrozynową**. Będąc agonistą TIE-2, Ang-1 bierze udział w procesach angiogenezy i stabilizuje sieć naczyń krwionośnych, działając synergistycznie z **VEGF**. Wykazano, że w wyniku wzmoczonej ekspresji Ang-1 może dochodzić do rozwoju nadciśnienia płucnego. W badaniach na szczurach obserwowano podwyższenie ciśnienia skurczowego w prawej komorze serca oraz maskularyzację małych tętniczek płucnych, ale bez towarzyszącego zapalenia okołonaczyniowego. Dalsze zastosowanie tego modelu do badań przedklinicznych wymaga jednak potwierdzenia ze względu na jeszcze niewyjaśniony związek między podwyższeniem Ang-1 a rozwojem PH u ludzi [39, 65].

Innym czynnikiem mającym uczestniczyć w rozwoju choroby jest **serotonina** [38]. Hipotezę tę potwierdzają podwyższone poziomy serotoniny we krwi oraz w tkankach płuc pobranych od osób z idiopatycznym PAH oraz zwiększona ekspresja błonowego **transportera serotoniny (SERT)**. Serotonina bierze udział w przebudowie płucnych naczyń krwionośnych przez indukcję proliferacji i migracji komórek mięśni gładkich tętnic płuc-

nych i fibroblastów [13, 50, 53]. Działając przez receptory **5-HT1B** oraz **5-HT2A** powoduje skurcz naczyń krwionośnych. Obecnie w badaniach przedklinicznych wykorzystuje się model myszy, u których za pośrednictwem modyfikacji genetycznych uzyskano nadekspresję błonowego SERT. Powyższe zabiegi pozwoliły na podwyższenie poziomu ciśnienia skurczowego w prawej komorze serca, wywołanie jej zmian przerostowych oraz na maskularyzację małych tętnic płucnych. Jak obserwowano, dodatkowa, kilkutygodniowa ekspozycja zwierząt na przewlekłe niedotlenienie potęguje opisane zmiany hemodynamiczne i patomorfologiczne [49, 69, 88].

Białko **S100A4/Mst1** należy do rodziny białek wiążących wapń, które są zaangażowane w procesy proliferacji, różnicowania i apoptozy komórek [57]. U około 5% myszy z nadekspresją białka S100A4/Mst1 dochodzi do przebudowy naczyń płucnych z charakterystycznymi dla „ludzkiej” postaci PAH zmianami splotowatymi i rozwojem warstwy neointima, rzadko obserwowanymi w modelach zwierzęcych. Oprócz przebudowy tętnic płucnych, obserwuje się także u zwierząt doświadczalnych pogorszenie parametrów hemodynamicznych (RVSP, mPAP). Dodatkowa ekspozycja myszy na przewlekłe niedotlenienie powoduje rozwój cięższej postaci PH z towarzyszącym rozwojem zapalenia okołonaczyniowego. Opisane zmiany obserwuje się głównie u samic myszy, co umożliwia dodatkowe zastosowanie tego modelu w badaniach nad wpływem płci w patogenezie nadciśnienia płucnego [11, 22, 48].

PODSUMOWANIE

Wieloczynnikowa etiologia nadciśnienia płucnego oraz nieuleczalność choroby skłaniają do poszukiwań nowych punktów uchwytu dla potencjalnych leków o działaniu terapeutycznym. Próba analizy dotychczas opracowanych modeli zwierzęcych nadciśnienia płucnego potwierdza ich duże znaczenie w badaniach przedklinicznych. Prowadzone szeroko badania z udziałem zwierząt doświadczalnych poszerzają dotychczasową wiedzę o szlakach sygnałowych zaangażowanych w patomechanizm nadciśnienia płucnego. Ma to ułatwić pełne wyjaśnienie molekularnego podłoża schorzenia i zapewnić optymalizację dotychczasowej terapii. Modele zwierzęce są także wykorzystywane w badaniach nad zastosowaniem nowych cząsteczek działających swoiście na PH. W przeciagu ostatnich kilku lat przebadano ponad 200 takich substancji. Można je zaklasyfikować do wielu grup terapeutycznych, takich jak: inhibitory reduktazy HMG-CoA (np. simwastatyna, rozuwastatyna, atorwastatyna); inhibitory kinazy tyrozynowej (imatynib), inhibitory kinazy RhoA (fasudil, Y-27632), leki działające na układ RAAS (adenozylna, enalapril, losartan), na przekaznictwo serotoninergiczne (fluoksetyna, tergurid, citalopram), dichloroocetan czy też wiele związków o działaniu przeciwzapalnym (infleximab, deksametazon, rapamycyna), antyoksydacyjnym (erdosteina, N-acetylocysteina) i antyproliferacyjnym (metformina, batimastat). W kręgu zainteresowań badaczy znalazły się też związki

pochodzenia roślinnego (np. resweratrol, kwercetyna, ruskogenina). Jak wcześniej wspomniano, mimo obiecujących wyników uzyskanych na zwierzętach dla większości z wyżej wymienionych substancji, badania kliniczne nie potwierdzają spodziewanych korzyści. Wielokrotnie podkreślano, że przy wielu próbach nie opracowano dotychczas idealnego modelu zwierzęcego nadciśnienia płucnego. Obecnie wykorzystywane, cechuje duża różnorodność w odniesieniu do czynników indukujących PH i mechanizmów ich działania

oraz zakresu wywołanych zmian hemodynamicznych i histopatologicznych, a także kosztów eksperymentów, powtarzalności i przewidywalności otrzymywanych wyników. Tym niemniej, wiedza o korzyściach i potencjalnych ograniczeniach modeli PH, a zwłaszcza o stopniu porównywalności indukowanych zmian u zwierząt do zmian w obrazie klinicznym nadciśnienia płucnego u ludzi, może być pomocna w doborze właściwej metodyki badawczej i zwiększa trafność identyfikacji potencjalnie nowych leków w PH.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abe K., Shinoda M., Tanaka M., Kuwabara Y., Yoshida K., Hirooka Y., McMurtry I.F., Oka M., Sunagawa K.: Haemodynamic unloading reverses occlusive vascular lesions in severe pulmonary hypertension. *Cardiovasc. Res.*, 2016; 111: 16-25
- [2] Baron R.M., Choi A.J., Owen C.A., Choi A.M.: Genetically manipulated mouse models of lung disease: potential and pitfalls. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2012; 302: L485-L497
- [3] Beppu H., Ichinose F., Kawai N., Jones R.C., Yu P.B., Zapol W.M., Miyazono K., Li E., Bloch K.D.: BMPR-II heterozygous mice have mild pulmonary hypertension and an impaired pulmonary vascular remodeling response to prolonged hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2004; 287: L1241-L1247
- [4] Bogaard H.J., Mizuno S., Hussaini A.A., Toldo S., Abbate A., Kraskauskas D., Kasper M., Natarajan R., Voelkel N.F.: Suppression of histone deacetylases worsens right ventricular dysfunction after pulmonary artery banding in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2011; 183: 1402-1410
- [5] Bonnet S., Michelakis E.D., Porter C.J., Andrade-Navarro M.A., Thébaud B., Bonnet S., Haromy A., Harry G., Moudgil R., McMurtry M.S., Weir E.K., Archer S.L.: An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor- 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
- [6] Ciucan L., Bonneau O., Hussey M., Duggan N., Holmes A.M., Good R., Stringer R., Jones P., Morrell N.W., Jarai G., Walker C., Westwick J., Thomas M.: A novel murine model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2011; 184: 1171-1182
- [7] Colvin K.L., Yeager M.E.: Animal models of pulmonary hypertension: matching disease mechanisms to etiology of the human disease. *J. Pulm. Respir. Med.*, 2014; 4: 198
- [8] Das M., Fessel J., Tang H., West J.: A process-based review of mouse models of pulmonary hypertension. *Pulm. Circ.*, 2012; 2: 415-433
- [9] De Raaf M.A., Hussaini A.A., Gomez-Arroyo J., Kraskauskas D., Farkas D., Happé C., Voelkel N.F., Bogaard H.J.: Histone deacetylase inhibition with trichostatin A does not reverse severe angioproliferative pulmonary hypertension in rats (2013 Grover Conference series). *Pulm. Circ.*, 2014; 4: 237-243
- [10] Delgado M., Genea D.: Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions. *Amino Acids*, 2013; 45: 25-39
- [11] Dempsie Y., Nilsen M., White K., Mair K.M., Loughlin L., Ambartsumian N., Rabinovitch M., MacLean M.R.: Development of pulmonary arterial hypertension in mice overexpressing S100A4/Mts1 is specific to females. *Respir. Res.*, 2011; 12: 159
- [12] Dias C.A., Assad R.S., Caneo L.F., Abduch M.C., Aiello V.D., Dias A.R., Marcial M.B., Oliveira S.A.: Reversible pulmonary trunk banding. II. An experimental model for rapid pulmonary ventricular hypertrophy. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2002; 124: 999-1006
- [13] Dumitrascu R., Kulcke C., Königshoff M., Kouri F., Yang X., Morrell N., Ghofrani H.A., Weissmann N., Reiter R., Seeger W., Grimminger F., Eickelberg O., Schermuly R.T., Pullamsetti S.S.: Terguride ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Eur. Respir. J.*, 2011; 37: 1104-1118
- [14] Faber M.J., Dalinghaus M., Lankhuizen I.M., Steendijk P., Hop W.C., Schoemaker R.G., Duncker D.J., Lamers J.M., Helbing W.A.: Right and left ventricular function after chronic pulmonary artery banding in rats assessed with biventricular pressure-volume loops. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2006; 291: H1580-H1586
- [15] Faul J.L., Nishimura T., Berry G.J., Benson G.V., Pearl R.G., Kao P.N.: Triptolide attenuates pulmonary arterial hypertension and neointimal formation in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000; 162: 2252-2258
- [16] Furuya Y., Satoh T., Kuwana M.: Interleukin-6 as a potential therapeutic target for pulmonary arterial hypertension. *Int. J. Rheumatol.*, 2010; 2010: 720305
- [17] Galìè N., Hoepfer M.M., Humbert M., Torbicki A., Vachiery J.L., Barbera J.A., Beghetti M., Corris P., Gaine S., Gibbs J.S., Gomez-Sanchez M.A., Jondeau G., Klepetko W., Opitz C., Peacock A. i wsp.: Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.*, 2009; 34: 1219-1263
- [18] Galìè N., Humbert M., Vachiery J.L., Gibbs S., Lang I., Torbicki A., Simonneau G., Peacock A., Vonk Noordegraaf A., Beghetti M., Ghofrani A., Gomez Sanchez M.A., Hansmann G., Klepetko W., Lancellotti P. i wsp.: 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur. Heart J.*, 2016; 37: 67-119
- [19] Gomez-Arroyo J., Saleem S.J., Mizuno S., Syed A.A., Bogaard H.J., Abbate A., Taraseviciene-Stewart L., Sung Y., Kraskauskas D., Farkas D., Conrad D.H., Nicolls M.R., Voelkel N.F.: A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2012; 302: L977-L991
- [20] Gomez-Arroyo J.G., Farkas L., Alhussaini A.A., Farkas D., Kraskauskas D., Voelkel N.F., Bogaard H.J.: The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2012; 302: L363-L369
- [21] Greenow K., Pearce N.J., Ramji D.P.: The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *J. Mol. Med.*, 2005; 83: 329-342
- [22] Greenway S., van Suylen R.J., Du Marchie Sarvaas G., Kwan E., Ambartsumian N., Lukanidin E., Rabinovitch M.: S100A4/Mts1 produces murine pulmonary artery changes resembling plexogenic arteriopathy and is increased in human plexogenic arteriopathy. *Am. J. Pathol.*, 2004; 164: 253-262
- [23] Groth A., Vrugt B., Brock M., Speich R., Ulrich S., Huber L.C.: Inflammatory cytokines in pulmonary hypertension. *Respir. Res.*, 2014; 15: 47

- [24] Hansmann G., Wagner R.A., Schellong S., Perez V.A., Urashima T., Wang L., Sheikh A.Y., Suen R.S., Stewart D.J., Rabinovitch M.: Pulmonary arterial hypertension is linked to insulin resistance and reversed by peroxisome proliferator-activated receptor- α activation. *Circulation*, 2007; 115: 1275-1284
- [25] Happé C.M., de Raaf M.A., Rol N., Schaliij I., Vonk-Noordegraaf A., Westerhof N., Voelkel N.F., de Man F.S., Bogaard H.J.: Pneumonectomy combined with SU5416 induces severe pulmonary hypertension in rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2016; 310: L1088-L1097
- [26] Hirata M., Ousaka D., Arai S., Okuyama M., Tarui S., Kobayashi J., Kasahara S., Sano S.: Novel model of pulmonary artery banding leading to right heart failure in rats. *Biomed. Res. Int.*, 2015; 2015: 753210
- [27] 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
- [28] Hoashi T., Matsumiya G., Miyagawa S., Ichikawa H., Ueno T., Ono M., Saito A., Shimizu T., Okano T., Kawaguchi N., Matsuura N., Sawa Y.: Skeletal myoblast sheet transplantation improves the diastolic function of a pressure-overloaded right heart. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2009; 138: 460-467
- [29] Hoepfer M.M., Bogaard H.J., Condliffe R., Frantz R., Khanna D., Kurzyna M., Langleben D., Manes A., Satoh T., Torres F., Wilkins M.R., Badesch D.B.: Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2013; 62: D42-D50
- [30] Huh J.W., Kim S.Y., Lee J.H., Lee Y.S.: YC-1 attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in mice. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2011; 24: 638-646
- [31] Ivy D.D., McMurtry I.F., Colvin K., Imamura M., Oka M., Lee D.S., Gebb S., Jones P.L.: Development of occlusive neointimal lesions in distal pulmonary arteries of endothelin B receptor deficient rats. A new model of severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 2005; 111: 2988-2996
- [32] Ivy D.D., Yanagisawa M., Garipey C.E., Gebb S.A., Colvin K.L., McMurtry I.F.: Exaggerated hypoxic pulmonary hypertension in endothelin B receptor-deficient rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2002; 282: L703-L712
- [33] Jasińska-Stroschein M., Orszulak-Michalak D.: Nowe strategie w farmakoterapii tętniczego nadciśnienia płucnego. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2017; 71: 577-588
- [34] Jiang B., Deng Y., Suen C., Taha M., Chaudhary K.R., Courtman D.W., Stewart D.J.: Marked strain-specific differences in the SU5416 rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2016; 54: 461-468
- [35] Jurasz P., Courtman D., Babaie S., Stewart D.J.: Role of apoptosis in pulmonary hypertension: from experimental models to clinical trials. *Pharmacol. Ther.*, 2010; 126: 1-8
- [36] Karoor V., Oka M., Walchak S.J., Hersh L.B., Miller Y.E., Dempsey E.C.: Nprilysin regulates pulmonary artery smooth muscle cell phenotype through a platelet-derived growth factor receptor-dependent mechanism. *Hypertension*, 2013; 61: 921-930
- [37] Kay J.M., Harris P., Heath D.: Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax*, 1967; 22: 176-179
- [38] Kloza M., Baranowska-Kuczko M., Pędzińska-Betiuk A., Jacakowski K., Kozłowska H.: Teoria serotoninowa a tętnicze nadciśnienie płucne. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 738-748
- [39] Kugathasan L., Dutly A.E., Zhao Y.D., Deng Y., Robb M.J., Keshavjee S., Stewart D.J.: Role of angiotensin II in experimental and human pulmonary arterial hypertension. *Chest*, 2005; 128: 633S-642S
- [40] 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-diphenylpyrazin-2-yl)(isopropyl)amino]butoxy)acetic acid (MRE-269), on rat pulmonary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2008; 326: 691-699
- [41] 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
- [42] Li F., Xia W., Li A., Zhao C., Sun R.: Long-term inhibition of Rho kinase with fasudil attenuates high flow induced pulmonary artery remodeling in rats. *Pharmacol. Res.*, 2007; 55: 64-71
- [43] Linardi D., Rungtatscher A., Morjan M., Marino P., Luciani G.B., Mazzucco A., Faggian G.: Ventricular and pulmonary vascular remodeling induced by pulmonary overflow in a chronic model of pretricuspid shunt. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2014; 148: 2609-2617
- [44] Liu B., Wang X.Q., Yu L., Zhou T.F., Wang X.M., Liu H.M.: Simvastatin restores down-regulated GATA-6 expression in pulmonary hypertensive rats. *Exp. Lung Res.*, 2009; 35: 411-426
- [45] Liu Z.Q., Liu B., Yu L., Wang X.Q., Wang J., Liu H.M.: Simvastatin has beneficial effect on pulmonary artery hypertension by inhibiting NF- κ B expression. *Mol. Cell. Biochem.*, 2011; 354: 77-82
- [46] Luitel H., Sydykov A., Schymura Y., Mamazhakypov A., Janssen W., Pradhan K., Wietelmann A., Kosanovic D., Dahal B.K., Weissmann N., Seeger W., Grimminger F., Ghofrani H.A., Schermuly R.T.: Pressure overload leads to an increased accumulation and activity of mast cells in the right ventricle. *Physiol. Rep.*, 2017; 5: e13146
- [47] Ma T.T., Wang Y., Zhou X.L., Jiang H., Guo R., Jia L.N., Chang H., Gao Y., Yao X.Y., Gao Z.M., Pan L.: Research on rat models of hypobaric hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2015; 19: 3723-3730
- [48] 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
- [49] Maclean M.R., Deuchar G.A., Hicks M.N., Morecroft I., Shen S., Sheward J., Colston J., Loughlin L., Nilsen M., Dempsey Y., Harmar A.: Overexpression of the 5-hydroxytryptamine transporter gene: effect on pulmonary hemodynamics and hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, 2004; 109: 2150-2155
- [50] Marcos E., Fadel E., Sanchez O., Humbert M., Dartevelle P., Simonneau G., Hamon M., Adnot S., Eddahibi S.: Serotonin-induced smooth muscle hyperplasia in various forms of human pulmonary hypertension. *Circ. Res.*, 2004; 94: 1263-1270
- [51] Mendes-Ferreira P., Santos-Ribeiro D., Adão R., Maia-Rocha C., Mendes-Ferreira M., Sousa-Mendes C., Leite-Moreira A.F., Brás-Silva C.: Distinct right ventricle remodeling in response to pressure overload in the rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2016; 311: H85-H95
- [52] Mizuno S., Farkas L., Al Hussein A., Farkas D., Gomez-Arroyo J., Kraskauskas D., Nicolls M.R., Cool C.D., Bogaard H.J., Voelkel N.F.: Severe pulmonary arterial hypertension induced by SU5416 and ovalbumin immunization. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2012; 47: 679-687
- [53] Morecroft I., Pang L., Baranowska M., Nilsen M., Loughlin L., Dempsey Y., Millet C., MacLean M.R.: In vivo effects of a combined 5-HT_{1B} receptor/SERT antagonist in experimental pulmonary hypertension. *Cardiovasc. Res.*, 2010; 85: 593-603
- [54] Morimatsu Y., Sakashita N., Komohara Y., Ohnishi K., Masuda H., Dahan D., Takeya M., Guibert C., Marthan R.: Development and characterization of an animal model of severe pulmonary arterial hypertension. *J. Vasc. Res.*, 2012; 49: 33-42
- [55] Morrison K., Studer R., Ernst R., Haag F., Kauser K., Clozel M.: Differential effects of Selexipag [corrected] and prostacyclin analogs

- in rat pulmonary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2012; 343: 547-555
- [56] Nickel N.P., Spiekerkoetter E., Gu M., Li C.G., Li H., Kaschwich M., Diebold I., Hennigs J.K., Kim K.Y., Miyagawa K., Wang L., Cao A., Sa S., Jiang X., Stockstill R.W. i wsp.: Elafin reverses pulmonary hypertension via caveolin-1-dependent bone morphogenetic protein signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2015; 191: 1273-1286
- [57] Nogueira-Ferreira R., Faria-Costa G., Ferreira R., Henriques-Coelho T.: Animal models for the study of pulmonary hypertension: potential and limitations. *Cardiol. Cardiovascmed.*, 2016; 1: 1-22
- [58] 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
- [59] Okada K., Tanaka Y., Bernstein M., Zhang W., Patterson G.A., Botney M.D.: Pulmonary hemodynamics modify the rat pulmonary artery response to injury: a neointimal model of pulmonary hypertension. *Am. J. Pathol.*, 1997; 151: 1019-1025
- [60] Pichon A., Connes P., Quidu P., Marchant D., Brunet J., Levy B.I., Vilar J., Safeukui I., Cymbalista F., Maignan M., Richalet J.P., Favret F.: Acetazolamide and chronic hypoxia: effects on haemorrhology and pulmonary haemodynamics. *Eur. Respir. J.*, 2012; 40: 1401-1409
- [61] Prins K.W., Thenappan T.: World Health Organization group I pulmonary hypertension: epidemiology and pathophysiology. *Cardiol. Clin.*, 2016; 34: 363-374
- [62] Pugh M.E., Hemnes A.R.: Metabolic and hormonal derangements in pulmonary hypertension: from mouse to man. *Int. J. Clin. Pract. Suppl.*, 2010; 168: 5-13
- [63] Rand M.S.: Selection of biomedical animal models. W: *Sourcebook of Models for Biomedical Research*, red.: P.M. Conn, Humana Press, New Jersey 2007, 9-15
- [64] Rungatscher A., Linardi D., Milani E., Ucci G., Nicolato E., Merigo F., Salvetti B., Mazzucco A., Luciani G.B., Faggian G.: Chronic over-circulation-induced pulmonary arterial hypertension in aorto-caval shunt. *Microvasc. Res.*, 2014; 94: 73-79
- [65] Ryan J., Bloch K., Archer S.L.: 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
- [66] Said S.I., Hamidi S.A., Dickman K.G., Szema A.M., Lyubsky S., Lin R.Z., Jiang Y., Chen J.J., Waschek J.A., Kort S.: Moderate pulmonary arterial hypertension in male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene. *Circulation*, 2007; 115: 1260-1268
- [67] Sakao S., Tatsumi K.: The effects of antiangiogenic compound SU5416 in a rat model of pulmonary arterial hypertension. *Respiration*, 2011; 81: 253-261
- [68] Santos-Ribeiro D., Mendes-Ferreira P., Maia-Rocha C., Adão R., Leite-Moreira A.F., Brás-Silva C.: Pulmonary arterial hypertension: Basic knowledge for clinicians. *Arch. Cardiovasc. Dis.*, 2016; 109: 550-561
- [69] Shimoda L.A., Laurie S.S.: Vascular remodeling in pulmonary hypertension. *J. Mol. Med.*, 2013; 91: 297-309
- [70] Simonneau G., Gatzoulis M.A., Adatia I., Celermajer D., Denton C., Ghofrani A., Gomez Sanchez M.A., Krishna Kumar R., Landzberg M., Machado R.F., Olshewski H., Robbins I.M., Souza R.: Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2013; 62: D34-D41
- [71] Sirmagul B., Ilgin S., Atli O., Usanmaz S.E., Demirel-Yilmaz E.: Assessment of the endothelial functions in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.*, 2013; 35: 220-227
- [72] Steiner M.K., Syrkin O.L., Kolliputi N., Mark E.J., Hales C.A., Waxman A.B.: Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ. Res.*, 2009; 104: 236-244
- [73] Stenmark K.R., Fagan K.A., Frid M.G.: Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ. Res.*, 2006; 99: 675-691
- [74] Stenmark K.R., Meyrick B., Galie N., Mooi W.J., McMurtry I.F.: 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
- [75] Summer R., Fiack C.A., Ikeda Y., Sato K., Dwyer D., Ouchi N., Fine A., Farber H.W., Walsh K.: Adiponectin deficiency: a model of pulmonary hypertension associated with pulmonary vascular disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2009; 297: L432-L438
- [76] Sztuka K., Jasińska-Stroschein M.: Animal models of pulmonary arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis of data from 6,126 animals. *Pharmacol. Res.*, 2017; 125: 201-214
- [77] Tanaka Y., Schuster D.P., Davis E.C., Patterson G.A., Botney M.D.: The role of vascular injury and hemodynamics in rat pulmonary artery remodeling. *J. Clin. Invest.*, 1996; 98: 434-442
- [78] Taraseviciene-Stewart L., Kasahara Y., Alger L., Hirth P., McMahon G., Waltenberger J., Voelkel N.F., Tuder R.M.: Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J.*, 2001; 15: 427-438
- [79] Taraseviciene-Stewart L., Scerbavicius R., Choe K.H., Cool C., Wood K., Tuder R.M., Burns N., Kasper M., Voelkel N.F.: Simvastatin causes endothelial cell apoptosis and attenuates severe pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2006; 291: L668-L676
- [80] Tual L., Morel O.E., Favret F., Fouillit M., Guernier C., Buvry A., Germain L., Dhonneur G., Bernaudin J.F., Richalet J.P.: Carvedilol inhibits right ventricular hypertrophy induced by chronic hypobaric hypoxia. *Pflugers Arch.*, 2006; 452: 371-379
- [81] Villegas L.R., Kluck D., Field C., Oberley-Deegan R.E., Woods C., Yeager M.E., El Kasmi K.C., Savani R.C., Bowler R.P., 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
- [82] Vitali S.H., Hansmann G., Rose C., Fernandez-Gonzalez A., Scheid A., Mitsialis S.A., Kourembanas S.: The Sugen 5416/hypoxia mouse model of pulmonary hypertension revisited: long-term follow-up. *Pulm. Circ.*, 2014; 4: 619-629
- [83] Voelkel N.F., Tuder R.M.: Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? *J. Clin. Invest.*, 2000; 106: 733-738
- [84] 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
- [85] Weissmann N.: VEGF receptor inhibition as a model of pulmonary hypertension in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 184: 1103-1105
- [86] Weng M., Raheer M.J., Leyton P., Combs T.P., Scherer P.E., Bloch K.D., Medoff B.D.: Adiponectin decreases pulmonary arterial remodeling in murine models of pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2011; 45: 340-347
- [87] West J., Fagan K., Steudel W., Fouty B., Lane K., Harral J., Hoedt-Miller M., Tada Y., Ozimek J., Tuder R., Rodman D.M.: Pulmonary hypertension in transgenic mice expressing a dominant-negative BMPRII gene in smooth muscle. *Circ. Res.*, 2004; 94: 1109-1114
- [88] White K., Dempsie Y., Nilsen M., Wright A.F., Loughlin L., MacLean M.R.: The serotonin transporter, gender, and 17 β oestradiol in the development of pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc. Res.*, 2011; 90: 373-382
- [89] White R.J., Meoli D.F., Swarthout R.F., Kallop D.Y., Galaria I.I., Harvey J.L., Miller C.M., Blaxall B.C., Hall C.M., Pierce R.A., Cool C.D.,

Taubman M.B.: Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2007; 293: L583- L590

[90] Wick M.J., Buesing E.J., Wehling C.A., Loomis Z.L., Cool C.D., Zamora M.R., Miller Y.E., Colgan S.P., Hersh L.B., Voelkel N.F., Dempsey E.C.: Decreased neprilysin and pulmonary vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2011; 183: 330-340

[91] Wu D., Lee D., Sung Y.K.: Prospect of vasoactive intestinal peptide therapy for COPD/PAH and asthma: a review. *Respir. Res.*, 2011; 12: 45

[92] 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

[93] Zeng W.J., Xiong C.M., Zhao L., Shan G.L., Liu Z.H., Xue F., Gu Q., Ni X.H., Zhao Z.H., Cheng X.S., Wilkins M.R., He J.G.: Atorvastatin in pulmonary arterial hypertension (APATH) study. *Eur. Respir. J.*, 2012; 40: 67-74

[94] Zhang Y., Zeng W., Cheng S., Chen Z., Xue J., Wang Q., Ou M., Cheng K.: Efficacy and safety of statins for pulmonary hypertension: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Heart Lung Circ.*, 2017; 26: 425-432

Autorki deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.