

Animal models of pulmonary hypertension

Animálne modely pľúcnej hypertenzie

Trubačová S¹, Kováčová D¹, Klimas J², Paulis L^{1,3}

¹Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Slovenská republika

Trubacova S, Kovacova D, Klimas J, Paulis L. **Animal models of pulmonary hypertension.** Cardiology Lett. 2020;29(3):183–194

Abstract. Pulmonary hypertension is a disease characterized by an increase in mean arterial pressure in the pulmonary artery and a primary or secondary pulmonary arterial remodeling, particularly narrowing and obstruction of small pulmonary arteries. With the progressive increase in afterload, right ventricular hypertrophy, subsequent dilatation and right heart failure develop. The etiological and pathophysiological heterogeneity of this disease, as well as unsatisfactory treatment options, call for adequate animal models of each type of pulmonary hypertension. A relatively wide range of animal models is available, but they do not always completely simulate the development of clinical disease and its aspects. For example, pulmonary hypertension induced in rodents is not manifested by a marked change in hemodynamic parameters, hypertrophy or right ventricular failure. Several classical models do not lead to the development of pulmonary arterial hypertension characterized by plexogenic arteriopathy, and the success rate of therapeutic intervention in these models does not always reflect their clinical efficacy. Nevertheless, the range of models available may contribute to the study of the initial stages of pulmonary hypertension, which are more difficult to follow in clinical situation due to late diagnosis. The development of new and refining of existing models is a useful tool for elucidating the pathophysiological mechanisms of pulmonary hypertension, as well as a platform for preclinical testing of innovative therapeutic interventions. Therefore, our manuscript provides an overview of the evolution of the most commonly used animal models and their contribution to the field of pulmonary hypertension study. Tab. 2, Ref. 133, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk

Key words: pulmonary hypertension – animal model – right ventricle failure – remodeling of pulmonary arteries

Trubačová S, Kováčová D, Klimas J, Paulis L. **Animálne modely pľúcnej hypertenzie.** Cardiology Lett. 2020;29(3):183–194

Abstrakt. Pľúcna hypertenzia je ochorenie, charakterizované nárastom stredného artériového tlaku v pľúcni a primárnou alebo sekundárnou prestavbou pľúcneho riečiska, najmä zúžením a obštrukciou malých pľúcnych artérií. S progresívnym nárastom afterloadu sa indukujú procesy, ktoré vedú k hypertrofii, následnej dilatácii a zlyhávaniu pravej komory. Etiologická a patofyziologická heterogenita tohto ochorenia, ako aj neuspokojivé možnosti liečby podmieňujú potrebu dostupnosti zodpovedajúcich animálnych modelov jednotlivých typov pľúcnej hypertenzie. K dispozícii je pomerne široké spektrum animálnych modelov, ktoré však nie vždy kompletne simulujú rozvoj klinického ochorenia a jeho aspektov. Pľúcna hypertenzia indukovaná u hlodavcov sa napríklad neprejavuje výraznou zmenou hemodynamických parametrov, hypertrofiou alebo zlyháváním pravej komory. Viaceré klasické modely nevedú k rozvoju pre pľúcnu artériovú hypertenziu charakteristickej plexogénnej arteriopatie a miera úspešnosti terapeutickú intervenciu u týchto modelov nie vždy odráža klinickú úspešnosť liečiva. Napriek tomu však spektrum dostupných modelov môže prispievať k štúdiu inštalných štádií pľúcnej hypertenzie, ktoré sú vzhľadom na neskorú diagnostiku u ľudí menej zreteľné. Vývoj

Z ¹Ústavu patologickej fyziológie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, ²Katedry farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského v Bratislave a ³Ústavu normálnej a patologickej fyziológie, Centrum experimentálnej medicíny SAV, Bratislava, Slovenská republika
Do redakcie došlo dňa 14. novembra 2019; prijaté dňa 2. januára 2020

Adresa pre korešpondenciu: Mgr. Simona Trubačová, Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: simona.trubacova@gmail.com

nových a zdokonaľovanie existujúcich modelov pľúcnej hypertenzie predstavuje užitočný nástroj na objasňovanie jej patofyziologických mechanizmov a zároveň aj platformu na predklinické testovanie inovatívnych terapeutických postupov. Preto v predkladanej práci uvádzame prehľad evolúcie najčastejšie využívaných animálnych modelov a ich prínos pri štúdiu pľúcnej hypertenzie. Tab. 2, Lit. 133, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk

Kľúčové slová: pľúcna hypertenzia – animálny model – zlyhanie pravej komory – remodeling pľúcnych artérií

Zriedkavé no závažné ochorenie, pľúcna hypertenzia (PH) predstavuje hemodynamický a patofyziologický stav so zvýšeným stredným tlakom v pľúcnej artérii nad hodnotu 25 mmHg, hodnotený pravostrannou srdcovou katetrizáciou v pokoji (1 – 3). Na základe rozdielov v etiopatogenéze, klinických prejavoch, hemodynamických znakov a možnostiach liečby rozlišujeme päť typov PH (prehľad rozdelenia typov PH v **tabuľke 1**) (1, 2).

Ich spoločným znakom je okrem vzostupu krvného tlaku v pľúcnej cirkulácii tlakové preťaženie pravej komory, jej remodelácia až zlyhávanie. Napriek pokrokom v manažmente a zvyšovaní dĺžky a kvality života pacientov zostáva PH

vo väčšine prípadov nevyliciteľným ochorením (4). Práve heterogenita tohto ochorenia a limitované možnosti liečby zdôrazňujú potrebu odhalenia presnej patofyziológie a hľadania inovatívnych terapeutických intervencií.

Absencia účinnej terapie a limitované úspechy dnes dostupnej liečby sú z veľkej časti dôsledkom nedostatočne objasnenej patogenézy PH. Predklinické animálne modely poskytujú nenahraditeľnú platformu pre výskum patofyziologických mechanizmov tohto multifaktoriálneho a komplexného ochorenia. Rovnako majú animálne modely nezastupiteľné uplatnenie v procese testovania nových experimentálnych liečiv (5).

Tabuľka 1 Komplexná klinická klasifikácia pľúcnej hypertenzie (upravené podľa 1a 2)

1. Pľúcna artériová hypertenzia (PAH)	1.1	Idiopatická PAH
	1.2	Hereditárna PAH
	1.2.1	<i>BMP2</i>
	1.2.2	<i>ALK1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3</i>
	1.2.3	iné gény
1.3	Indukovaná liekmi a toxínmi	
	1.4	Asociovaná s
	1.4.1	chorobami spojivového tkaniva
	1.4.2	HIV infekciou
	1.4.3	portálnou hypertenziou
	1.4.4	vrodenými srdcovými chybami
	1.4.5	schistosomiázou
1 [†] . Pľúcna venookluzívna choroba a/alebo pľúcna kapilárna hemangiomatóza		
1 ^{††} . Perzistujúca PH novorodencov		
2. Pľúcna hypertenzia spôsobená chorobami ľavého srdca	2.1	systolická dysfunkcia
	2.2	diastolická dysfunkcia
	2.3	chlopňové chyby
	2.4	vrodené/získané ľavostranné obštrukcie vtokovej/výtokovej časti a vrodené kardiomyopatie
	2.5	vrodená/získaná stenóza pľúcnych vén
3. Pľúcna hypertenzia spôsobená respiračnými ochoreniami a/alebo hypoxiou	3.1	chronická obštrukčná choroba pľúc
	3.2	intersticiálne pľúcne choroby
	3.3	iné pľúcne choroby so zmiešanou reštrikciou a obštrukciou
	3.4	obštrukčné spánkové apnoe
	3.5	alveolárne hypoventilačné poruchy
	3.6	chronická výšková hypoxia
	3.7	vývojové abnormality pľúc
4. Chronická tromboembolická pľúcna hypertenzia (CTEPH)		
5. Pľúcna hypertenzia s nejasným/ multifaktoriálnym mechanizmom vzniku	5.1	hematologické choroby: chronická hemolytická anémia, splenektómia, myeloproliferácia
	5.2	systémové choroby: sarkoidóza, neurofibromatóza, vaskulitída
	5.3	metabolické poruchy: Gaucherova choroba, choroby štítnej žľazy
	5.4	ostatné: segmentálna PH, nádorové obštrukcie, chronické obličkové zlyhanie, fibrotizujúca mediastinitída

Experimentálny model by mal čo najvernejšie napodobovať klinický priebeh ochorenia, byť replikovateľný a umožniť stanovenie relevantných klinických, biochemických, hemodynamických a histopatologických parametrov (6). S rozmachom vo výskume na poli pľúcnych vaskulárnych chorôb v ostatných rokoch sa zlepšuje i pochopenie epidemiológie, patogenézy a patofyziológie PH, najmä pľúcnej artériovej hypertenzie (PAH). Napriek tomu, že žiaden zo známych modelov PH nerekapituluje presne všetky aspekty rozvoja PH u ľudí, je možné modulovať jednotlivé spúšťače súvisiace s rozvojom PH s následnými štrukturálnymi zmenami pľúcnej vaskulatúry (7, 8). Zo súboru dostupných animálnych modelov sú preto najlepšie charakterizované a v súčasnosti najčastejšie využívané monokrotalínový model a model chronickej hypoxie (9).

Monokrotalínový model

Monokrotalínový model predstavuje jeden z najjednoduchších a najfrekvencovanejších využívaných spôsobov štúdia PAH. Hoci pre všetky formy PH je typický rozvoj remodelácie pľúcnej vaskulatúry so zhrubnutím intimálnych, mediálnych i adventiciálnych vrstiev, s proliferáciou a hypertrofiou hladkosvalových buniek a fibroblastov v cievnych stenách pľúcnych artérií, typickým znakom PAH je práve závažná pľúcna plexiformná arteriopatia. Vazokonstrikcia a vznikajúce komplexné neointimálne a plexiformné lézie obštruuujú a zužujú lúmen malých pľúcnych artérií, čím je limitovaný tok krvi a celkový priesvit pľúcnej vaskulatúry. Na udržanie dostatočného srdcového výdaja proti stúpajúcemu krvného tlaku a odporu v pľúcnej cirkulácii prechádza pravá komora adaptívnou hypertrofiou. Progresívne, s pretrvávajúcim zvýšením afterloadu stráca komora schopnosť udržiavať svoju normálnu funkciu, čo vedie k jej dilatácii a pravostrannému srdcovému zlyhávaniu. PAH môže byť idiopatické alebo heritabilné ochorenie, môže byť indukované po vystavení toxínom alebo farmakám, avšak môže sa rozvíjať aj v spojení s iným ochorením, ako sú napríklad choroby spojivového tkaniva, portálna hypertenzia, HIV infekcia, vrodené srdcové chyby alebo schistosomiáza (2). Komplexná terapia PAH zahŕňa farmakologické postupy využívajúce antikoagulanciá, diuretiká, suplementáciu kyslíka, použitie vazodilatátorov ako blokátory kalciových kanálov, antagonistov endotelínových receptorov, inhibítorov fosfodiesterázy typu 5, analógov prostacyklínu a stimulátorov rozpustnej guanylylcyklázy, ako aj nemedikamentózne intervenčné a chirurgické postupy (10, 11). Napriek pokrokom v manažmente ochorenia síce zostáva PAH stále nevyliečiteľným ochorením, ale zároveň dostupné terapeutické postupy a ich kombinácie umožňujú priaznivo ovplyvňovať kvalitu a dĺžku života pacientov (12).

Monokrotalín (MCT) je pyrolizidinový alkaloid prítomný v stonkách, listoch a semenách rastliny *Crotalaria spectabilis* a v nižšej koncentrácii i v ostatných zástupcoch rodu *Crotala-*

ria, ktoré sú zložkou bylinného čaju používaného pôvodnými obyvateľmi oblasti Západoidického súostrovia (13, 14). MCT model bol po prvýkrát popísaný pred 50 rokmi podávaním semien *C. spectabilis* potkanom (15) a injekčnou aplikáciou suspenzie MCT primátom (16, 17).

Aktivácie MCT alkoholoidu na reaktívny pyrolový metabolit, dehydromonokrotalín (MCTP), prebieha v pečeni reakciou závislou od cytochrómu P-450 (18, 19). V experimentálnej praxi možno indukovať PAH jednorazovou subkutánnou alebo intraperitoneálnou injekciou MCT v dávke 60 – 80 mg/kg (20), čo predstavuje technicky veľmi jednoduchý model. Preferovaným druhom využívaným pri MCT indukovanej PAH je potkan, pretože v rámci iných druhov sa pozoruje pomerne variabilná odpoveď, vzhľadom na metabolické rozdiely pečene, formáciu a degradáciu MCTP a jeho vylučovanie (9). Napriek skutočnosti, že MCTP je vo vodnom roztoku, ako napríklad krvná plazma, prudko degradovaný (polčas rozpadu MCTP je 3 – 4 sekundy), predpokladá sa, že sa akumuluje v erytrocytoch (21, 19), prostredníctvom čoho môže pretrvávajúť jeho schopnosť interagovať s pľúcny tkanivom v rozmedzí niekoľkých týždňov (20). Klinické príznaky nie sú zvyčajne zjavné ihneď po expozícii potkana jednorazovou dávkou MCT, no v priebehu 3 – 7 dní začínajú zvieratá prejavovať znaky anorexie, apatie, stagnáciu alebo stratu telesnej hmotnosti a tachypnoe. S progresom poškodenia pľúcneho riečiska sa začína s variabilnou intenzitou rozvíjať dyspnoe, slabosť, hnačka a periférna cyanóza (22, 23).

MCT indukuje bunkové a molekulárne zmeny vo všetkých vrstvách pľúcnych ciev, čo následne vedie k zmenám na úrovni srdca. Hoci presný mechanizmus, prostredníctvom ktorého MCT navodzuje PAH nie je známy, predpokladá sa, že prvým cieľom MCT(P) toxicity je pľúcny endotel na základe jeho polohy v blízkosti pečene (24). V endotelových bunkách pľúcnych artérií dochádza k rozvoju hypertrofie a zvýšenej syntéze DNA (25) a narušeniu transportu proteínov v rámci bunkovej membrány (26). MCT vyvolaná strata niektorých membránových proteínov vyúsťuje do aktivácie proliferatívnych a antiapoptických faktorov, dochádza k zvýšenej apoptóze endotelových buniek a proliferácii hladkosvalových buniek (27, 5). V bunkách intimy sa zvyšuje expresia endotelínu-1 (28) a znižuje expresia endotelínového receptora B (ET_B) a endotelovej NO syntázy (29). Po alterácii intimy sa objavujú zmeny v oblasti média. Tie sú charakterizované zvýšenou syntézou DNA, hypertrofiou a hyperpláziou hladkej svaloviny (30), nadexpresiou transportéru serotonínu (31) a zníženou expresiou napätím riadených K^+ kanálov (32). Využitie MCT modelu preukázalo zníženie expresie receptora transformačného rastového faktora β (TGF- β), kinázy podobnej receptoru pre aktivín-A, proteínov Smad 3, 4 a receptora typu 2 kostného morfogenetického proteínu (BMPR2) v pľúcnom tkanive potkanov, čo naznačuje poškodenie signálnych dráh TGF- β a BMPR2, ktoré je zaznamenané i u pacientov s PAH (33, 34).

Iné štúdie využívajúce MCT model zdôrazňujú významnú úlohu zápalových buniek (makrofágov, dendritických buniek

a žírnych buniek) a cytokínov (interleukín-6, interleukín-1) v prvých štádiách PAH (35, 36). Predpokladá sa, že makrofágy a dendritické bunky, ako antigén prezentujúce bunky, napomáhajú vyvolaniu zápalu (37). Žirné bunky prostredníctvom priameho vazoaktívneho efektu stimulujú remodeling zvýšenou produkciou metaloproteináz (38, 39).

V MCT modeli PAH boli dokázané aj zmeny renín-angiotenzín-aldosterónového systému. V tkanive pravej a ľavej srdcovej komory sa pozorovali zvýšené hladiny mRNA pre angiotenzín konvertujúci enzým (ACE), v pravej komore vyššia expresia angiotenzínového receptora AT_1 , bez zmeny expresie AT_2 . V pľúcach experimentálnych potkanov bolo možné pozorovať zníženie expresie mRNA pre ACE, kým v obličke došlo k zvýšeniu expresie mRNA pre renín a ACE. Uvedené naznačuje prítomnosť multiorgánových interakcií v patogeneze PAH (40).

Gomez-Arroyo et al. poukázali na to, že MCT model spája v tzv. MCT syndróme okrem pľúcnej prestavby i myokarditídu a venookluzívnu chorobu pečene, ktoré nie sú charakteristické pre ľudskú formu PAH (20). Ďalším nedostatkom tohto modelu je existencia širokej škály liečiv, ktorými možno u experimentálnych zvierat zabrániť rozvoju alebo zvrátiť MCT indukovanú PAH, napríklad inhibitor serínovej elastázy (41), inhibitor doštičkového rastového faktora (42), inhibitor Rho-kinázy (43 – 45), antagonista endotelínových receptorov (46, 47), inhibitor fosfodiesterázy typu 5 (48), pričom tieto výsledky nie vždy korelujú s výsledkami klinických štúdií. MCT model, v ktorom nedochádza k vytváraniu obštrukčných lézií intimy v periférnych pľúcnych artériách, sa považuje za model akútneho alebo subakútneho poškodenia periférneho pľúcneho riečiska v kombinácii s poškodením ďalších orgánov a presne nenapodobňuje rozvoj PAH u človeka (9, 20). Tento problém sa snažia čiastočne riešiť modely indukujúce PAH kombináciou viacerých patologických atakov.

Monokrotalínový model a pneumonektómia

V roku 1996 si Tanaka et al. kládli otázku, aký efekt má podanie MCT u jedincov so zmenenými hemodynamickými vlastnosťami pľúcnej cirkulácie. Potkanom týždeň po podaní MCT chirurgicky vytvorili anastomózu medzi ľavou subklaviálnou artériou a ľavou pulmonálnou artériou s hodnotami stredného tlaku krvi v pľúcni (*mean arterial pulmonary pressure*, mPAP) blížiacimi sa k hodnotám tlaku krvi v systémovej cirkulácii. Histologická analýza preukázala prítomnosť neointimálnych zmien vo veľkých elastických pľúcnych artériách. V neprítomnosti primárneho porušenia funkcie endotelu podaním MCT ani pri samotnej elevácii mPAP po vytvorení anastomózy nebol indukovaný signifikantný remodeling pľúcneho riečiska (49).

Na základe získaných poznatkov pokračovalo úsilie vytvoriť efektívnejší model PAH zmenou hemodynamiky pľúcnej

cirkulácie. No vytvorenie anastomózy medzi subklaviálnou a pulmonálnou artériou je zákrok, ktorý si vyžaduje znalosti vaskulárnych chirurgických postupov. Technicky jednoduchší spôsob dosiahnutia vzostupu tlaku v pľúcnej cirkulácii predstavuje pneumonektómia, ktorú pomerne dobre tolerujú i ľudia, v prípade zachovaných vlastností kontralaterálnych pľúcnych lalokov. Pri unilaterálnej pneumonektómii sa u potkanov preferenčne odstraňuje ľavý pľúcny lalok, pretože v prípade odobratia štyroch lalokov z pravej strany pľúcneho tkaniva strácajú zvieratá schopnosť kompenzovať respiračnú insuficienciu (50). Zdvojnásobenie objemu toku krvi a jej turbulentné prúdenie v anatomicky zmenšenom pľúcnom riečisku v kombinácii s podávaním MCT (51, 50) alebo inhibítora receptora 2 pre vaskulárny endotelový rastový faktor (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) (SU-5416 - Sugena 5416) (52) vedie k hypertrofii pľúcnych artérií a proliferatívnym perivaskulárnym plexiformným léziám, vzostupu pľúcnej vaskulárnej rezistencie a mPAP, hypertrofii a progresívnej dysfunkcii pravej komory.

Model PH spôsobenej chorobami ľavého srdca

Choroby ľavého srdca predstavujú v rozvinutých krajinách najpočetnejšiu príčinu PH, ktorá je charakterizovaná prítomnosťou primárnej postkapilárnej obštrukcie pľúcnej cirkulácie, označovanej ako pľúcna venózna hypertenzia (2). PH sa v dôsledku chorôb ľavého srdca rozvíja ako odpoveď na spätný prenos zvýšeného ľavostranného plniaceho tlaku, spôsobený systolickou a/alebo diastolickou dysfunkciou ľavej komory, veľmi často mitrálnou stenózou, ako aj regurgitáciou, zníženou poddajnosťou ľavej predsieni a zvýšeným afterloadom, následkom poruchy aortálnej chlopne (53). S postupujúcou stenózou mitrálnych chlopne sa zvyšujúci tlak krvi v pľúcnej cirkulácii prenáša do pravej komory, čím dochádza až k poruche funkcie trikuspidálnej chlopne a rozvoju symptómov zlyhávania pravej komory (54).

Pri štúdiu tejto formy PH sa využíva model podviazania vzostupnej aorty (55), alebo jeho kombinácia s indukciou metabolického syndrómu (56) a model priečnej konstriktie aorty u hlodavcov (57), ktoré napodobňujú rozvoj aortálnej stenózy a koarktácie s rozvojom miernej formy PH (58). Fujimoto et al. predstavili nový model PH v dôsledku choroby ľavého srdca čiastočným podviazaním ľavej predsieni kovovou svorkou u potkanov vo veku päť týždňov. Takáto stenóza vedie k vzostupu tlaku krvi v ľavej predsieni a v pľúcnych žilách s rozvojom závažnej hypertrofie (59).

Model chronickej hypoxie

V 70. rokoch minulého storočia sa preukázalo, že vystavenie rôznych živočíšnych druhov zníženej koncentrácii atmosfé-

rického kyslíka vedie k alveolárnej hypoxii, spôsobujúcej chronickú PH a morfológické zmeny prekapilárnej časti pľúcneho riečiska (60 – 62). V rámci jednotlivých druhov a vývinových štádií existuje variabilita v odpovedi na chronickú hypoxiu (CHP), s vyššou citlivosťou u mladších jedincov s rýchlo sa vyvíjajúcimi pľúcami (63). CHP, pozorovaná pri chronickej obštrukčnej chorobe pľúc, intersticiálnej chorobe pľúc, spánkovom apnoe a expozícii vysokým nadmorským výškam, má rozhodujúcu úlohu v rozvoji PH. Model CHP preto reprezentuje 3. WHO skupinu, PH spôsobenú respiračnými ochoreniami alebo hypoxiou (9).

V typickom modeli CHP sa PH indukuje u potkanov alebo myší ich umiestnením v normobarickej komore s 10 % inspiračnou frakciou O_2 (64 – 67). Po dvoch týždňoch sa u experimentálnych zvierat rozvíja stredne závažná PH so zdvojnásobením hodnôt mPAP a objavuje sa hypertrofia pravej komory, ktorá však len zriedkavo vedie k jej zlyhaniu (9). Návratom zvierat do prostredia normoxie klesajú hodnoty krvného tlaku v pľúcnej artérii a dochádza k zvráteniu histologických zmien v pľúcnom riečisku (68).

Podobne, ako v prípade MCT modelu sa i hypoxiou indukovaná PH spája s množstvom štrukturálnych zmien. Pomerne rýchlo dochádza k muskularizácii malých arteriol v alveolárnej stene so zvýšeným výskytom buniek exprimujúcich α -aktín hladkej svaloviny, v procese označenom ako distálna expanzia hladkej svaloviny (63). Následne sa rozvíja zhrubnutie a fibróza veľkých proximálnych pľúcnych artérií (69). Vystavenie potkanov CHP zvyšuje expresiu génov zapojených do proliferácie endotelových buniek a potláča expresiu génov spojených s apoptózou a vazodilatáciou (70). V modeli CHP sa preukázala upregulácia exprese indukibilnej NO syntázy a down regulácia exprese rozpustnej guanylylcyklázy, čo prispieva k narušeniu signálnej dráhy indukujúcej vazodilatáciu (71). Významnú úlohu v procese prestavby pľúcneho riečiska pri hypoxiou indukovanej PH má pretrvávajúca zápalová reakcia (72). Pugliese et al. predpokladajú, že kombinácia hypoxie a lokálnych tkanivových faktorov (cytokínov) vedie k akémusi „uzamknutiu“ mezenchymálnych buniek (fibroblastoch a hladkosvalových bunkách) a makrofágov do prozápalového, proremodelujúceho a promotogénneho fenotypu (73).

Limitom modelu CHP je to, že úplne nerekapituluje pľúcne vaskulárne poškodenie pozorované u ľudí s PH (74). Model CHP nevykazuje obštrukčné lézie intimy v periférnych pľúcnych artériách (74, 75). Morimatsu et al. sa pokúsili o zdokonalenie modelu PH. Kombináciou intraperitoneálnej injekcie MCT a následným vystavením zvierat hypoxii počas troch týždňov navodili PH a hypertrofiu pravej komory s koncentrickým zhrubnutím intimy, abnormálnou proliferáciou endotelových buniek, plexiformnými léziami, vaskulárnou oklúziou a tvorbou fibrínových trombov (76). Ďalšou nevýhodou modelu CHP je i nekonzistentná reprodukovateľnosť v rámci rôznych druhov. U novorodených teliat vystavených CHP sa vyvíja PH s hodnotami krvného

tlaku v pľúcnej artérii približujúcimi sa hodnotám systémovej cirkulácie a závažnejším vaskulárnym remodelingom. (62, 77, 63). V modeli CHP indukovanej u myší dochádza k zvýšeniu tlaku krvi v pľúcnej cirkulácii, no v porovnaní s potkanmi len k minimálnej prestavbe pľúcneho riečiska (70).

Fawn-hooded potkany (FH; zlato oranžové sfarbenie hlavy, ramien s pruhom pokračujúcim na chrbte) predstavujú outbredný kmeň s najväčšou senzitivitou na hypoxiu v porovnaní s inými hlodavcami. Vo veku štyroch týždňov sa u nich rozvíja PH, s možnosťou akcelerácie jej vývoja hypoxiou (78 – 80). FH potkany umožňujú štúdium niektorých genetických faktorov, ktoré sa podieľajú na patogenéze PH. V tomto kmeni sa dokázala prítomnosť dedičnej poruchy krvných doštičiek, charakterizovaná nedostatočným ukladaním serotonínu do trombocytov (78) a nezrelosť pľúc so zníženým množstvom alveol, pretrvávajúca do dospelosti (81). Hladkosvalové bunky pľúcnych artérií FH potkanov vykazujú zvýšenú produkciu endotelínu, čo môže viesť k vzostupu tlaku a remodelácii pľúcnej vaskulatúry (82).

Model chronickej hypoxie a Sugen 5416

Limitáciu využitia hlodavcov ako modelových organizmov závažnej PAH, s nedostatočným rozvojom hyperproliferácie endotelových buniek vyriešila kombinácia CHP a inhibítora receptora 2 pre VEGF (SU-5416 – Sugen 5416) (83, 84). VEGF je dôležitým faktorom udržiavania a proliferácie endotelových buniek. U normoxických potkanov vedie inhibícia VEGH receptora k rozvoju len miernej remodelácie pľúcneho riečiska, kým u chronicky hypoxických potkanov sa pozorovala ireverzibilná PAH asociovaná s proliferáciou na apoptózu rezistentných endotelových buniek s tvorbou plexiformných lézií. PAH indukovaná CHP + Sugen 5416 pretrváva a progreduje i po ukončení hypoxického stimulu a ovplyvňuje iba pľúcne tkanivo (83). Experimenty s využitím terapeutických agensov preukázali možnosť zastavenia progresie takto navodenej PAH, no nebola pozorovaná jej reverzia, čo môže naznačovať väčšiu analógiu s ľudskou formou ochorenia (5).

Bleomycínom indukovaný model pľúcnej fibrózy

Bleomycín predstavuje zmes cytotoxických glykopeptidových antibiotík izolovaných zo *Streptomyces verticillus*. Štiepením reťazcov DNA indukuje apoptózu, a preto sa využíva ako chemoterapeutikum pri liečbe malígnych ochorení (85). Pri jeho terapeutickom využívaní sa zaznamenali nepriaznivé účinky na pľúcne tkanivo. Vzhľadom na nízku pulmonálnu hladinu bleomycínu inaktivujúceho enzýmu (86) dochádza u časti pacientov k rozvoju pľúcnej fibrózy (87, 88). Pozorovanie týchto vedľajších účinkov, asociovaných s bleomycínovou

terapiou viedlo k rýchlemu vytvoreniu animálneho modelu idiopatickej pľúcnej fibrózy (IPF) (89, 90).

Pre indukciu IPF u hlodavcov možno využiť rôzne spôsoby a režimy dávkovania bleomycínu, no najčastejším je jednorazové intratracheálne podanie. V priebehu prvých dní dochádza u experimentálnych zvierat k zápalovej reakcii (91) a zvýšenej apoptóze endotelových buniek (92). Po odznení akútnej reakcie sa rozvíja štádium charakterizované nadmerným ukladaním extracelulárnej matrix s rozvojom fibrózy, ktoré pretrváva približne tri až štyri týždne po podaní bleomycínu. Fibrotizácia pľúc sa spája s hypertrofiou pľúcnej artérie a pravej komory a vzostupom mPAP (93 – 95), čo umožňuje využívanie tohto modelu IPF i k štúdiu PH spôsobenej respiračnými ochoreniami alebo hypoxiou. Slabinou experimentálneho, bleomycínom indukovaného poškodenia pľúc je zaznamenaná spontánna rezolúcia fibrózy až do takmer fyziologického stavu (96) a vysoká variabilita v citlivosti rôznych druhov hlodavcov. Kým u CBA alebo C57B1/6 druhov myši dochádza k výraznej fibróze, Balb/c myši sa zdajú byť relatívne rezistentné (97).

Model chronickej tromboembolickej pľúcnej hypertenzie

Chronická tromboembolická pľúcna hypertenzia (CTEPH) sa rozvíja v súvislosti s predchádzajúcim venóznym tromboembolizmom. U 0,1 – 9,1 % všetkých pacientov po prekonaní akútnej pľúcnej embólie dochádza v rozmedzí dvoch rokov k rozvoju CTEPH (98). Faktorom úzko spätým s rozvojom CTEPH sú opakované embolizácie, po ktorých nedôjde k úplnému rozpusteniu embolu a cez jeho následnú fibrózu takýto stav prechádza do obštrukcie pľúcnych artérií, s postupným rozvojom vaskulopatie malých ciev v neobštruovanej časti pľúcneho riečiska (99, 100). Hoci sa CTEPH najčastejšie rozvíja po predchádzajúcej embólii, alebo hlbokkej žilovej trombóze, pri významnom počte prípadov však nebola zaznamenaná história akútnej pľúcnej embólie (101, 102).

Mechanizmy, ktoré sa podieľajú na rozvoji CTEPH, nie sú úplne objasnené, no predpokladá sa prepojenie predisponujúceho genotypu a fenotypu, vyúsťujúceho do stavu zápalu v oblasti pľúcnej vaskulatury (98). Závažná CTEPH je asociovaná s protrombotickým stavom a výskytom abnormalít trombocytov, ako ich znížený počet so zvýšeným priemerným objemom a spontánnou agregáciou (103), perzistujúcou hyperkoaguláciou (104), prítomnosťou nerozpustného fibrínového variantu (105), ktoré spoločne prispievajú k nerovnováhe medzi tvorbou trombu a jeho rezolúciou (106). Redukcia plochy vnútorného prierezu pľúcneho riečiska, zvýšená cievna rezistencia a remodeling pľúcnych artérií spôsobujú nárast krvného tlaku v pľúcnej artérii, ktorý môže postupne viesť k hypertrofii a zlyhaniu pravej komory (107).

V minulosti bolo štúdium CTEPH brzdené práve neexistenciou definitívneho animálneho modelu. Od 80. rokov minulého storočia pokračuje snaha o vytvorenie nových postupov na podklade existujúcich modelov reproduktívnych formácií a rezolúcie trombov, obštrukciu pľúcneho riečiska, distálnu pulmonálnu vaskulopatiu a remodeling pravej komory (108) najmä s využitím veľkých zvierat, u ktorých bolo možné lepšie napodobniť patofyziológiu ochorenia, napríklad psov (109 – 111), oviec (112) a ošípaných (113). Limitom takýchto modelov je okrem vyšších ekonomických nákladov aj skutočnosť, že často nereprezentujú všetky znaky CTEPH u ľudí (najmä distálnu pulmonálnu vaskulopatiu a progresiu k zlyhávaniu pravej komory) a vyžadujú komplexné postupy ako chirurgickú ligáciu pľúcnej artérie, mechanické poškodenie pľúcneho endotelu, injekčnú administráciu autológnych trombov, keramických guľôčok alebo tkanivového adhezíva do pľúcnej artérie (108).

Až v roku 2016 bol popísaný prvý animálny model CTEPH využívajúci hlodavce (114). Technicky jednoduchou a reprodukovateľnou injekčnou aplikáciou inertných polystyrénových mikrosfér, pokrytých zmesou fibrinogénu a kolagénu, do chvostovej žily potkanov Arias-Loza et al. indukovali sériu pľúcnych embólií. Aplikácia trombotického materiálu, ktorý kombinuje nedegradovateľné polystyrénové mikrosféry s biologicky aktívnym roztokom, umožňuje interakcie embolov s miestnym bunkovým prostredím. Po 3. aplikácii mikrosfér sa u potkanov rozvíjajú charakteristické znaky CTEPH, vrátane perzistencie embolu, zvýšeného pravokomorového tlaku, hypertrofie pravej komory a distálnych pľúcnych artérií, perivaskulárneho zápalu a výskytu fibrotických lézií.

Ďalšie hlodavce využívajúce model s podobným princípom uviedli Neto-Neves et al. Tento model navodzuje pľúcnu embóliu injekčnou aplikáciou polystyrénových mikrosfér do chvostovej vény potkanov v kombinácii s inhibíciou endotelovej funkcie, subkutánnou aplikáciou inhibítora receptora 2 pre VEGF (SU-5416 – Sugen 5416). Po takomto zásahu u experimentálnych zvierat dochádza k výraznému zvýšeniu systolického tlaku krvi v pľúcnej artérii a významnej dysfunkcii pravej komory s jej hypertrofiou a fibrózou. V pľúcnom tkanive možno pozorovať hypertrofiu malých pľúcnych artérií, no bez formácie plexiformných lézií, rovnako ako u pacientov s CTEPH. Pri tomto modeli sa zároveň pozorovala zvýšená zápalová odpoveď s aktiváciou krvných doštičiek (115).

Obidva uvedené modely navodzujú CTEPH administráciou nerozpustných častíc a nedostatkom takejto metódy môže byť práve absencia čiastočnej rezolúcie trombov v pľúcnej cirkulácii hlodavcov. Tento nedostatok má odstrániť nedávno predstavený model CTEPH u potkanov využívajúci embolizáciu subsegmentálnych pľúcnych artérií biodegradovateľnými mikrosférami alginátu sodného. Po opakovanej intravenózne administrácii takýchto čiastočiek možno pozorovať prítomnosť embolov v lúmene a významnú hypertrofiu pľúcnych artérií, zníženú toleranciu fyzickej námahy, zvýšený systolický tlak

pravej komory a hladiny endotelínu-1 (116). Práve takéto relatívne nové animálne modely môžu byť vhodným prostriedkom pre štúdium patofyziológie, ako aj predklinického testovania nových terapeutických agensov cielených na CTEPH.

Genetické modely

Knock-out modely

Vzhľadom na úlohu BMPR2 signálnej dráhy v patogenéze PAH bol v roku 2004 vyvinutý model využívajúci myši nesúce mutantné alelu génu *BMPR2*. Heterozygotné myši (*BMPR2*^{+/−}) prežívajú a rozmnožujú sa normálne, no v izolovaných hladkosvalových bunkách pľúcnych artérií sa dokázalo zníženie hladiny mRNA pre BMPR2 na 50 %, čo sa spájalo s rozvojom miernej PH. Vystavením takýchto zvierat hypoxii dochádza k vazokonstrikcii, muskularizácii malých pľúcnych artérií a zvýšeniu mPAP (117). Nedostatkou tohto modelu je prítomnosť len miernej formy PH a absencia hypertrofie pravej komory, ktoré však boli prekonané genetickou modifikáciou myši na expresiu dominantne negatívnej alely *BMPR2* génu v hladkosvalových bunkách pľúcnych artérií (118).

V roku 2001 bol vytvorený model transgénnych potkanov s deficienciou ET_B receptora, u ktorých sa pod vplyvom hypoxie vyvíja závažná forma PH so zvýšenou rezistenciou tlakom krvi v pľúcnom riečisku (119).

Na základe predpokladu, že vazoaktívny intestinálny peptid (VIP) plní úlohu pri relaxácii hladkého svalstva pľúcneho riečiska, neutralizuje alebo zoslabuje účinok vazokonstriktorov a je downregulovaný u pacientov s PH, bol deléciou génu pre VIP vytvorený ďalší knock-out model myši (120). U *VIP*^{−/−} myši sa rozvíja stredne závažná až závažná PH s remodeláciou pľúcnych artérií a hypertrofiou pravej komory.

Transmembránová metaloendopeptidáza, neprilyzín (NEP), degraduje neutrálne peptidy nevyhnutné pre rast a kontrakciu hladkosvalových buniek. Na úrovni regulácie krvného tlaku je NEP enzýmom, ktorý katalyzuje vznik angiotenzínu 1-7 z angiotenzínu I (121). Dempsey et al. vytvorili model myši s mutáciou génu pre NEP so stratou funkcie v kombinácii s chronickou hypoxiou a demonštrovali rozvoj závažnej PH s výraznou muskularizáciou distálnych pľúcnych artérií a hypertrofiou pravej komory (122).

Modely génovej nadexpresie

V roku 1998 Ambartsumian et al. vytvorili myši nadexprimujúce gén *S100A4/Mts1*. Tento model bol pôvodne vyvinutý za účelom štúdia úlohy uvedeného génu v rozvoji karcinómu prsníka (123, 124), vzhľadom na jeho variabilnú expresiu v myších bunkách vysoko metastatického adenokarcinómu prsných žliaz (125). Pri štúdiu nádorovej biológie tohto génu sa zistilo, že u podskupiny (~ 5 %) transgénnych myši nadmerne exprimujúcich *S100A4/Mts1* vo všetkých tkanivách sa vyvinuli pľúcne arteriálne zmeny podobné plexiformným

léziám pozorovaným u pacientov s PH (123, 126). U samíc myši, nadexprimujúcich *S100A4/Mts1*, sa na rozdiel od samcov rozvíja remodeling pľúcneho riečiska a zvyšuje tlak v pravej komore (127). Význam takýchto pozorovaní tkvie v možnosti ozrejmenia rozdielov vo výskyte PAH u oboch pohlaví. U myši nadexprimujúcich *S100A4/Mts1* vystavených chronickej hypoxii bola zaznamenaná aj zmenená expresia génu pre fibulín-5, matrixový proteín nevyhnutný pre normálnu štruktúru elastínových vlákien (128).

Vytvorením transgénnych myši nadexprimujúcich serotonínový transportér Maclean et al. prezentovali model využiteľný pri štúdiu patogenézy PH a možných liečebných stratégií (129). V hladkosvalových bunkách pľúcnej vaskulatury, izolovaných z pľúcneho tkaniva pacientov s PH, je expresia serotonínového transportéra zvýšená (130). U myši so zvýšenou expresiou serotonínového transportéra vystavených hypoxii sa rozvíja hyperterofia pravej komory a remodeling pľúcneho riečiska.

V sére a pľúcnom tkanive pacientov s PAH, ako aj v animálnych modeloch sa pozorovala zvýšená hladina interleukínu-6 (IL-6), ktorá súvisí so závažnosťou a mortalitou tohto ochorenia (131). IL-6, pleiotropný a prozápalový cytokín, je produkovaný najmä T bunkami a makrofágmi, ale i hladkosvalovými bunkami média a adventície cievnej steny (132). Steiner et al. preto pre štúdium úlohy IL-6 v patogenéze ochorenia pľúcnej vaskulatury vytvorili model transgénnych myši nadexprimujúcich pre pľúca špecifický IL-6 v normoxických a hypoxických podmienkach. U takýchto myši pozorovali zvýšený systolický tlak v pravej komore a jej hypertrofiu, ktoré boli ešte zvýraznené pôsobením chronickej hypoxie. V distálnych pľúcnych artériách hypoxii vystavených transgénnych myši zaznamenali proliferatívnu arteriopatiu so zápalom, čo môže súvisieť s úlohou IL-6 v rozvoji a progresii prestavby pľúcneho riečiska (133).

Záver

Už od prvotných experimentov poskytujú modely PH významné informácie, napomáhajúce vysvetliť patofyziológiu tohto závažného ochorenia. A práve koncept animálneho modelu by mal čo možno najpresnejšie reprodukovať charakteristiky ochorenia u človeka a tak umožňovať zlepšovanie nášho chápania mechanizmov podieľajúcich sa na jeho rozvoji, ako i možných terapeutických stratégií. Dnes existuje niekoľko animálnych modelov (prehľad vybraných, frekventovane využívaných modelov PH uvedený v **tabuľke 2**), najčastejšie výskumne využívanými sú aplikácia MCT alebo vystavenie hlodavcov chronickej hypoxii. Treba však priznať, že ani jeden z týchto modelov nerekapituluje kompletné klinický priebeh ochorenia u ľudí. Už veľmi skoro sa pozoroval napríklad výrazne variabilný priebeh u rôznych živočíšnych druhov, možnosť zvrátenia PH obnovením

Tabuľka 2 Prehľad najfrekvencovanejšie využívaných animálnych modelov pre štúdium pľúcnej hypertenzie, podľa špecifikácie pre jednotlivé typy pľúcnej hypertenzie

Typ pľúcnej hypertenzie podľa klasifikácie Svetovej zdravotníckej organizácie	Model pľúcnej hypertenzie (jeden patologický zásah)	Model pľúcnej hypertenzie (kombinácia patologických zásahov)
1. Pľúcna artériová hypertenzia (PAH)	monokrotalínový model monokrotalín monokrotalín monokrotalín chronická hypoxia knockout model – <i>BMPR2</i> +/- alebo <i>BMPR2</i> -/- mutantné myši	anastomóza – ľavá subklaviálna a ľavá pulmonálna artéria chronická hypoxia pneumonektómia Sugen 5416 chronická hypoxia
2. Pľúcna hypertenzia spôsobená chorobami ľavého srdca	podviazanie vzostupnej aorty podviazanie vzostupnej aorty priečna konstriktoria aorty podviazanie ľavej predsene	metabolický syndróm
3. Pľúcna hypertenzia spôsobená respiračnými ochoreniami a/alebo hypoxiou	chronická hypoxia monokrotalín <i>fawn-hooded</i> potkany bleomycínom indukovaná pľúcna fibróza	chronická hypoxia chronická hypoxia
4. Chronická tromboembolická pľúcna hypertenzia (CTEPH)	aplikácia inertných polystyrénových mikrosfér pokrytých zmesou fibrinogénu a kolagénu aplikácia inertných polystyrénových mikrosfér aplikácia biodegradovateľných mikrosfér alginátu sodného	Sugen 5416
Modely využívané pri štúdiách, bez presne definovaného typu pľúcnej hypertenzie	knock-out modely transgénne myši nadexprimujúce <i>S100A4/Mts1</i> pre pľúca špecifický IL-6 <i>S100A4/Mts1</i> serotonínový transportér pre pľúca špecifický IL-6	<i>VIP</i> (-/-) u myši deficiencia ET _B receptora u potkanov <i>NEP</i> (-/-) u myši chronická hypoxia chronická hypoxia

normooxických podmienok alebo zastavenie progresie a regresia zmien na úrovni pľúcnej vaskulatury terapiou pomerne širokou škálou farmák, ktorých účinnosť v populácii pacientov je významne limitovaná. Novšie modely, vyvinuté modifikáciou klasických postupov, ako napríklad kombinácia unilaterálnej pneumonektómie s vystavením hlodavcov pôsobeniu MCT, preukazujú vyššiu presnosť v reprodukovani charakteristických patologických zmien v procese rozvoja PH, akými sú najmä neointimálna proliferácia a oklúzia malých pľúcnych artérií.

Veľká heterogenita s existenciou rôznej etiopatogenézy, klinického príznaku a náročnosti liečby, zdôrazňujú komplexnosť PH. Preto možno očakávať náležitú variabilitu aj v prípade jednotlivých predklinických modelov PH. Napriek tomu však spektrum dostupných modelov môže prispievať k štúdiu iníciačných štádií PH, ktoré sú vzhľadom na neskorú diagnostiku u ľudí menej zreteľné. Vývoj nových a zdokonaľovanie existujúcich modelov PH predstavuje užitočný nástroj na objasňovanie jeho patofyziologických mechanizmov a zá-

roveň aj platformu na predklinické testovanie inovatívnych terapeutických postupov.

Conclusion

Since the initial experiments, models of PH have provided significant information and helped to understand the hepatothophysiology of this serious disease. An animal model should reproduce the characteristics of the disease in humans as precisely as possible, thus enabling us to improve our understanding of the mechanisms involved in its development, as well as possible therapeutic strategies. Today, there are several animal models (an overview of selected, frequently used models of PH are presented in **table 2**). The most used models are MCT-induced pulmonary hypertension or rodent exposure to chronic hypoxia. However, neither of these models captures the complete clinical presentation of this disease in humans. For example, the course of the disease is different

among animal species, there is a possibility of reversing PH by restoring normoxic conditions and several medications have shown to be able to prevent or treat pulmonary hypertension in rodent models, while their clinical efficacy has not been proven. More recent models that are based on the modification of classical procedures (such as the combination of unilateral pneumonectomy with MCT exposure in rodents) show greater accuracy in reproducing characteristic pathological changes in the process of PH development, such as neointimal proliferation and the occlusion of small lung arteries. The high heterogeneity in etiopathogenesis, clinical manifestation and treatment needs emphasize the complexity of PH. Therefore, an appropriate variability in individual preclinical models of PH is to be expected. Nevertheless, the range of available models may contribute to the study of the initial, pre-symptomatic, stages of PH, which are more difficult to follow in clinical situation. The development of new, and the refinement of the existing, models of PH is a useful tool for elucidating its pathophysiological mechanisms, as well as a platform for preclinical testing of novel means for therapeutic interventions.

Literatúra

1. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:D34-D41.
2. Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, et al. ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J* 2015;37:ehv317.
3. Hoeper MM, Humbert M, Souza R, et al. A global view of pulmonary hypertension. *Lancet Respir Med* 2016;4: 306-322.
4. Sztrymf B, Souza R, Bertoletti L, et al. Prognostic factors of acute heart failure in patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J* 2010;35:1286-1293.
5. Maarman G, Lecour S, Butrous G, et al. A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? *Pulm. Circ* 2013;3:739-756.
6. Doggrell SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc. Res* 1998;39:89-105.
7. Tuder RM, Archer SL, Dorfmueller P, et al. Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013;62: D4-D12.
8. Colvin KL, Yeager ME. Animal models of pulmonary hypertension: matching disease mechanisms to etiology of the human disease. *J. Pulm. Respir. Med* 2014;4:4.
9. Stenmark KR, Meyrick B, Galiè N, et al. 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.
10. Šimková I. Nové formy liečby pľúcnej hypertenzie. *Via pract.* 2008;5:252-255.
11. Luknár M, Lesný P, Varga I, et al. Princípy modernej liečby pľúcnej artériovej hypertenzie. *Cardiology Lett.* 2012;1:192-200.
12. Luknár M, Lesný P, Gonçalvesová E. Risk stratification in pulmonary artery hypertension: the way to better outcomes. *Cardiology Lett.* 2019;28:26-32.
13. Kay JM, Heath D, Smith P, et al. Fulvine and the pulmonary circulation. *Thorax* 1971;26:249-261.
14. Kay JM. Dietary pulmonary hypertension. *Thorax* 1994;49:S33-S38.
15. Kay JM, Harris P, Heath D. Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax* 1967;22:176-179.
16. Chesney CF, Allen JR. Monocrotaline induced pulmonary vascular lesions in non-human primates. *Cardiovasc Res* 1973;7:508-518.
17. Chesney CF, Allen JR. Endocardial fibrosis associated with monocrotaline-induced pulmonary hypertension in nonhuman primates (*Macaca arctoides*). *Am J Vet Res* 1973;34:1577-1581.
18. Reid MJ, Lamé MW, Morin D, et al. Involvement of cytochrome P450 3A in the metabolism and covalent binding of 14 C monocrotaline in rat liver microsomes. *J Biochem Mol Toxicol* 1998;12:157-166.
19. Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, et al. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary Toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1992;22:307-325.
20. Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;302: L363-L369.
21. Pan LC, Lamé MW, Morin D, et al. Redblood cells augment transport of reactive metabolites of monocrotaline from liver to lung in isolated and tandem liver and lung preparations. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991;110:336-346.
22. Schoental R, Head MA. Pathological changes in rats as a result of treatment with monocrotaline. *Br. J. Cancer* 1955;9:229-237.
23. Nogueira-Ferreira R, Vitorino R, Ferreira R, et al. Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2015;35:8-16.
24. Thomas HC, Lamé MW, Dunston SK, et al. Monocrotaline pyrrole induces apoptosis in pulmonary artery endothelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 1998;151:236-244.
25. Lappin PB, Ross KL, King LE, et al. The response of pulmonary vascular endothelial cells to monocrotaline pyrrole: cell proliferation and DNA synthesis in vitro and in vivo. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 1998;150:37-48.
26. Sehgal PB, Mukhopadhyay S. Dysfunctional intracellular trafficking in the pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;37:31-37.
27. Huang J, Wolk JH, Gewitz MH, et al. Progressive endothelial cell damage in an inflammatory model of pulmonary hypertension. *Exp Lung Res* 2010;36:57-66.
28. Frasch HF, Marshall C, Marshall BE. Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 1999;276:L304-L310.
29. Tyler RC, Muramatsu M, Abman SH, et al. Variable expression of endothelial NO synthase in three forms of rat pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 1999;276:L297-L303.
30. Lappin PB, Roth RA. Hypertrophy and prolonged DNA synthesis in smooth muscle cells characterize pulmonary arterial wall

- thickening after monocrotaline pyrrole administration to rats. *Toxicol. Pathol* 1997;25: 372-380.
31. Guignabert C, Raffestin B, Benferhat R, et al. Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation* 2005;111:2812-2819.
32. McMurtry MS, Bonnet S, Wu X. Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circ. Res* 2004;95:830-840.
33. Zakrzewicz A, Kouri FM, Nejman B, et al. The transforming growth factor- β /Smad 2,3 signalling axis is impaired in experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2007;29:1094-1104.
34. Ramos MF, Lamé MW, Segalland HJ, et al. Smad signaling in the rat model of monocrotaline pulmonary hypertension. *Toxicol. Pathol* 2008;36:311-320.
35. Dahal KB, Kosanovic D, Kaulen C, et al. Involvement of mast cells in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Respir. Res.* 2011;12:60.
36. Savai R, Pullamsetti SS, Kolbe J, et al. Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012;186:897-908.
37. Price LC, Wort SJ, Perros F, et al. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2012;141:210-221.
38. Heath D, Yacoub M. Lung mast cells in plexogenic pulmonary arteriopathy. *J Clin Pathol* 1991;44:1003-1006.
39. Vajner L, Vytásek R, Lachmanová V, et al. Acute and chronic hypoxia as well as 7-day recovery from chronic hypoxia affects the distribution of pulmonary mast cells and their MMP-13 expression in rats. *Int J Exp Pathol* 2006;87:83-391.
40. Malikova E, Galkova K, Vavrínek P, et al. Local and systemic renin-angiotensin system participates in cardiopulmonary-renal interactions in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the rat. *Mol Cell Biochem.* 2016;418:147-157.
41. Cowan KN, Heilbut A, Humpl T, et al. Complete reversal of fatal pulmonary hypertension in rats by a serine elastase inhibitor. *Nat Med* 2000;6:698-702.
42. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, et al. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J. Clin. Investig* 2005;115:2811-2821.
43. Nagaoka T, Fagan KA, Gebb SA, et al. Inhaled Rho kinase inhibitors are potent and selective vasodilators in rat pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:494-499.
44. Jiang BH, Tawara S, Abe K, et al. Acute vasodilator effect of fasudil, a Rho kinase inhibitor, in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;49:85-89.
45. Tawara S, Fukumoto Y, Shimokawa H. Effects of combined therapy with a Rho-kinase inhibitor and prostacyclin on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;50:195-200.
46. Clozel M, Hess P, Rey M, et al. Bosentan, sildenafil, and their combination in the monocrotaline model of pulmonary hypertension in rats. *Exp Biol Med* 2006;231:967-973.
47. Cui B, Cheng YS, Dai DZ, et al. CPU0213, a non-selective ET_A/ET_B receptor antagonist, improves pulmonary arteriolar remodeling of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009;36:169-175.
48. Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, et al. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:39-45.
49. Tanaka Y, Schuster DP, Davis EC, et al. The role of vascular injury and hemodynamics in rat a. pulmonary artery remodeling. *J. Clin. Investig* 1996;98:434-442.
50. Katz MG, Fargnoli AS, Gubara SM, et al. The left pneumonectomy combined with monocrotaline or sugen as a model of pulmonary hypertension in rats. *JoVE* 2019;145:e59050.
51. White RJ, Meoli DF, Swarthout RF, et al. 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.
52. Happé CM, de Raaf MA, Rol N, et al. Pneumonectomy combined with SU5416 induces severe pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016;310:L1088-L1097.
53. Vachieri JL, Adir Y, Barbera JA, et al. Pulmonary hypertension due to left heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:D100-D108.
54. Simkova I, Urbanova J. Pulmonary function alterations after correction of mitral stenosis. *Bratisl Lek Listy* 2001;102: 78-281.
55. Dai ZK, Wu BN, Chen IC, et al. Attenuation of pulmonary hypertension secondary to left ventricular dysfunction in the rat by Rho-kinase inhibitor fasudil. *Pediatr Pulmonol.* 2011;46:45-59.
56. Ranchoux B, Nadeau V, Bourgeois A, et al. Metabolic syndrome exacerbates pulmonary hypertension due to left heart disease. *Circ. Res* 2019;125:449-466.
57. Chen Y, Guo H, Xu D, et al. Left ventricular failure produces profound lung remodeling and pulmonary hypertension in mice: heart failure causes severe lung disease. *Hypertension* 2012;59:1170-1178.
58. Xiong PY, Potus F, Chan W, et al. Models and molecular mechanisms of World Health Organization Group 2 to 4 pulmonary hypertension. *Hypertension*, 2018;71:34-55.
59. Fujimoto Y, Urashima T, Kawachi F, et al. Pulmonary hypertension due to left heart disease causes intrapulmonary venous arterialization in rats. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2017;154:1742.e8-1753.
60. Hislop A, Reid L. New findings in pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Br J Exp-Pathol* 1976;57:542-554.
61. Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, et al. Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1979;236:H818-H827.
62. Stenmark KR, Fasules J, Hyde DM, et al. Severe pulmonary hypertension and arterial adventitial changes in newborn calves at 4,300 m. *J. Appl. Physiol* 1987;62:821-830.
63. Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling. *Circ. Res* 2006;99:675-691.
64. Muramatsu M, Tyler RC, Gutkowska J, et al. Atrial natriuretic peptide accounts for increased cGMP in hypoxia-induced hypertensive rat lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1997; 272:L1126-L1132.
65. Ooi H, Cadogan E, Sweeney M, et al. Chronic hypercapnia inhibits hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H331-H338.

66. Howell K, Preston RJ, McLoughlin P. Chronic hypoxia causes angiogenesis in addition to remodelling in the adult rat pulmonary circulation. *J Physiol* 2003;547: 33-145.
67. Choudhary G, Troncales F, Martin D, et al. Bosentan attenuates right ventricular hypertrophy and fibrosis in normobaric hypoxia model of pulmonary hypertension. *J Heart Lung Transplant* 2011;30:827-833.
68. 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;65:15-34.
69. Drexler E, Bischoff J, Slifka A, et al. Stiffening of the extrapulmonary arteries from rats in chronic hypoxic pulmonary hypertension. *J Res Nat Inst Stand Technol* 2008;113:239-249.
70. Hoshikawa Y, Nana-Sinkam P, Moore MD, et al. Hypoxia induces different genes in the lungs of rats compared with mice. *Physiol Genomics* 2003;12:209-219.
71. Xia XD, Xu ZJ, Hu XG, et al. Impaired iNOS-sGC-cGMP signaling contributes to chronic hypoxic and hypercapnic pulmonary hypertension in rat. *Cell Biochem Funct.* 2012;30:279-285.
72. Burke DL, Frid MG, Kunrath CL, et al. Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297:L238-L250.
73. Pugliese SC, Poth JM, Fini MA, et al. The role of inflammation in hypoxic pulmonary hypertension: from cellular mechanisms to clinical phenotypes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015;308:L229-L252.
74. Voelkel NF, Tuder RM. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? *The J Clin Invest* 2000;106:733-738.
75. 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.
76. Morimatsu Y, Sakashita N, Komohara Y, et al. Development and characterization of an animal model of severe pulmonary arterial hypertension. *J VascRes* 2012;49:33-42.
77. Orton EC, Reeves JT, Stenmark KR. Pulmonary vasodilation with structurally altered pulmonary vessels and pulmonary hypertension. *J Appl Physiol* 1988;65:2459-2467.
78. Kentera D, Susic D, Veljkovic V, et al. Pulmonary artery pressure in rats with hereditary platelet function defect. *Respiration* 1988;54:110-114.
79. Sato K, Webb S, Tucker A, et al. Factors influencing the idiopathic development of pulmonary hypertension in the fawn hooded rat. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:793-797.
80. Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, et al. 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.
81. LeCras TD, Kim DH, Gebb S, et al. Abnormal lung growth and the development of pulmonary hypertension in the fawn-hooded rat. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1999;277:L709-L718.
82. Zamora MR, Stelzner TJ, Webb S, et al. Over expression of endothelin-1 and enhanced growth of pulmonary artery smooth muscle cells from fawn-hooded rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1996;270:L101-L109.
83. Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, et al. 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.
84. Ciucan L, Bonneau O, Hussey M, et al. A novel murine model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:1171-1182.
85. Lown JW, Sim SK. The mechanism of the bleomycin-induced cleavage of DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;77:1150-1157.
86. Sebt SM, Mignano JE, Jani JP, et al. Bleomycinhydrolase: molecular cloning, sequencing, and biochemical studies reveal membership in the cysteineproteinase family. *Biochemistry* 1989;28:6544-6548.
87. Umezawa H, Ishizuka M, Maeda K, et al. Studies on bleomycin. *Cancer* 1967;20:891-895.
88. Yagoda A, Mukherji B, Young C, et al. Bleomycin, an antitumor-antibiotic. Clinical experience in 274 patients. *Ann Intern Med* 1972;77:861-870.
89. Adamson IY, Bowden DH. The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol* 1974;77:185-197.
90. Thrall RS, McCormick JR, Jack RM, et al. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat: inhibition by indomethacin. *Am J Pathol.* 1979;95:117-130.
91. Chaudhary NI, Schnapp A, Park JE. Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 73:769-776.
92. Mungunsukh O, Griffin AJ, Lee YH, et al. Bleomycin induces the extrinsic apoptotic pathway in pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;298:L696-L703.
93. Hemnes AR, Zaiman A, Champion HC. PDE5A inhibition attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension through inhibition of ROS generation and RhoA/Rho kinase activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;294:L24-L33.
94. Schroll S, Arzt M, Sebah D, et al. Improvement of bleomycin-induced pulmonary hypertension and pulmonary fibrosis by the endothelin receptor antagonist bosentan. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010;170:32-36.
95. Rathinasabapathy A, Bruce E, Espejo A, et al. Therapeutic potential of adipose stem cell-derived conditioned medium against pulmonary hypertension and lung fibrosis. *Br. J. Pharmacol* 2016;173:2859-2879.
96. Chung MP, Monick MM, Hamzeh NY, et al. Role of repeated lung injury and genetic background in bleomycin-induced fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:375-380.
97. Walkin L, Herrick SE, Summers A, et al. The role of mouse strain differences in the susceptibility to fibrosis: a systematic review. *Fibrogenesis & tissue repair* 2013;6:18.
98. Lang IM, Pesavento R, Bonderman D, et al. Risk factors and basic mechanisms of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a current understanding. *Eur Respir J* 2013;41:462-468.
99. Dartevelle P, Fadel E, Mussot S, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2004;23: 637-648.

100. Hoeper MM, Mayer E, Simonneau G, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation* 2006;113:2011–2020.
101. Auger WR, Fedullo PF. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Semin Respir Crit Care Med* 2009;30:471–483.
102. Pepke-Zaba J, Delcroix M, Lang I, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH): results from an international prospective registry. *Circulation* 2011;124:1973–1981.
103. Remkova A, Simkova I, Valkovicova T. Platelet abnormalities in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015;8:9700.
104. Yaoita N, Shirakawa R, Fukumoto Y, et al. Platelets are highly activated in patients of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:2486–2494.
105. Morris TA, Marsh JJ, Chiles PG, et al. High prevalence of dysfibrinogenemia among patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Blood* 2009;114:1929–1936.
106. Sharma S, Lang IM. Current understanding of the pathophysiology of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thromb. Res* 2018;164:136–144.
107. Toshner M, Pepke-Zaba J. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: time for research in pathophysiology to catch up with developments in treatment. *F1000 Prime Reports* 2014;6:38.
108. Mercier O, Fadel E. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: animal models. *Eur Respir J* 2013;41:1200–1206.
109. Moser KM, Guisan M, Bartimmo EE, et al. In vivo and post mortem dissolution rates of pulmonary emboli and venous thrombi in the dog. *Circulation* 1973;48:170–178.
110. Moser KM, Cantor JP, Olman M, et al. Chronic pulmonary thromboembolism in dogs treated with tranexamic acid. *Circulation* 1991;83:1371–1379.
111. Mulchrone A, Kellihan HB, Forouzan O, et al. A large animal model of right ventricular failure due to chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a focus on function. *Frontiers in cardiovascular medicine* 2018;5:189.
112. Sato H, Hall CM, Griffith GW, et al. Large animal model of chronic pulmonary hypertension ASAIO J 2008;54:396–400.
113. Mercier O, Tivane A, Raoux F, et al. A reliable piglet model of chronic thrombo-embolic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:A2415.
114. Arias-Loza PA, Jung P, Abeßer M, et al. Development and characterization of an inducible rat model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension novelty and significance. *Hypertension* 2016;67:1000–1005.
115. Neto-Neves, EM, Brown MB, Zaretskaia MV, et al. Chronic embolic pulmonary hypertension caused by pulmonary embolism and vascular endothelial growth factor inhibition. *Am J Pathol* 2017;187:700–712.
116. Karpov A, Anikin N, Cherepanov D, et al. 3311 a new rat model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension induced by repeated intravenous administration of biodegradable alginate microspheres. *Eur. Heart J.* 2019;40:ehz745–0075.
117. Beppu H, Ichinose F, Kawai N, et al. 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.
118. Yasuda T, Tada Y, Tanabe N, et al. 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.
119. Ivy D, McMurtry IF, Yanagisawa M, et al. Endothelin B receptor deficiency potentiates ET-1 and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;80:L1040–L1048.
120. Said SI, Hamidi SA, Dickman KG, et al. Moderate pulmonary arterial hypertension in male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene. *Circulation* 2007; 115(10): 1260–1268.
121. Welches WR, Brosnihan KB, Ferrario CM. A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolylendopeptidase and neutralendopeptidase 24.11. *Lifesciences* 1993;52:1461–1480.
122. Dempsey EC, Wick MJ, Karoor V, et al. Neprilysin null mice develop exaggerated pulmonary vascular remodeling in response to chronic hypoxia. *Am J Pathol* 2009;174:782–796.
123. Ambartsumian N, Klingelhöfer J, Grigorian M, et al. Tissue-specific post-transcriptional down-regulation of expression of the S100A4 (mts1) gene in transgenic animals. *Invasion Metastasis* 1998;18:96–104.
124. Ambartsumian N, Grigorian M, Lukanidin E. Genetically modified mouse models to study the role of metastasis promoting S100A4 (mts1) protein in metastatic mammary cancer. *J DairyRes* 2005;72: 27–33.
125. Ebralidze A, Tulchinsky E, Grigorian M, et al. Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family. *Genes&development* 1989;3:1086–1093.
126. Greenway S, van Suylen RJ, Sarvaas GDM, et al. S100A4/Mts1 produces murine pulmonary artery changes resembling plexogenic arteriopathy and is increased in human plexogenic arteriopathy. *Am J Pathol* 2004;164: 253–262.
127. Dumpsie Y, Nilsen M, White K, et al. Development of pulmonary arterial hypertension in mice over-expressing S100A4/Mts1 is specific to females. *Respres* 2011;12:159.
128. Merklinger SL, Wagner RA, Spiekerkoetter E, et al. Increased fibulin-5 and elastin in S100A4/Mts1 mice with pulmonary hypertension. *Circ. Res* 2005;97:596–604.
129. MacLean MR, Dumpsie Y. Serotonin and pulmonary hypertension – from bench to bedside? *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:281–286.
130. Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, et al. Serotonin transporter over expression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J ClinInvest* 2001;108:1141–1150.
131. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, et al. Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2010;122:920–927.
132. Price LC, Wort SJ, Perros F, et al. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2012;141: 210–221.
133. Steiner MK, Syrkina OL, Kolliputi N, et al. Interleukin-6 over expression induces pulmonary hypertension. *Circ. Res* 2009;104:236–244.