

# Farmakološke mogućnosti u liječenju plućne arterijske hipertenzije

---

Škreblin, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:478627>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Nikolina Škreblin**

**Farmakološke mogućnosti u liječenju plućne  
arterijske hipertenzije**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakologija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmakologiju pod stručnim vodstvom izv.prof.dr.sc. Lidije Bach-Rojecky.

Želim zahvaliti izv. prof. dr.sc. Lidiji Bach Rojecky koja me svojim zanimljivim predavanjima zainteresirala za farmakologiju, ali i na Njenom stručnom vodstvu i na odgovorima na moja pitanja tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima, sestri, baki i djedu, Ivanu i Tei na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju tijekom studiranja.

# SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. Uvod.....   | 1  |
| 1.1. Općenito o plućnoj arterijskoj hipertenziji.....                      | 1  |
| 1.2. Patofiziologija i molekularna podloga bolesti.....                    | 2  |
| 1.2.1. Endotelna disfunkcija.....  | 2  |
| 1.2.2. Vaskularno remodeliranje.....                                       | 4  |
| 1.2.3. Kronična upala.....   | 5  |
| 1.3. Klasifikacija plućne hipertenzije.....                                | 6  |
| 1.4. Funkcionalna klasifikacija bolesti.....                               | 7  |
| 1.5. Liječenje plućne arterijske hipertenzije.....                         | 8  |
| 1.5.1. Nefarmakološke mjere.....   | 9  |
| 1.5.2. Nespecifična terapija.....  | 9  |
| 1.5.3. PAH specifična terapija.....  | 10 |
| 2. Obrazloženje teme.....  | 11 |
| 3. Materijali i metode.....  | 12 |
| 4. Rezultati i rasprava.....   | 13 |
| 4.1. Endotelinski put.....   | 13 |
| 4.1.1. Sinteza endotelina.....   | 13 |
| 4.1.2. Uloga endotelina-1 u patogenezi plućne arterijske hipertenzije..... | 14 |
| 4.1.3. Endotelinski receptori.....   | 14 |
| 4.1.4. Unutarstanični mehanizam.....                                       | 15 |
| 4.1.4.1. Vazokonstrikcija.....   | 15 |
| 4.1.4.2. Vazodilatacija.....   | 17 |
| 4.1.4.3. Mitogeno djelovanje.....  | 18 |
| 4.1.5. Antagonisti endotelinskih receptora.....                            | 19 |
| 4.1.6. Farmakokinetičke razlike antagonista endotelinskih receptora.....   | 24 |
| 4.1.7. Nuspojave ERA.....  | 25 |
| 4.1.8. Interakcije.....  | 27 |
| 4.1.9. Učinkovitost ERA.....   | 28 |
| 4.2. Put dušikovog oksida.....   | 29 |
| 4.2.1. Fiziološka uloga dušikovog oksida.....                              | 29 |
| 4.2.2. Sinteza dušikovog oksida.....                                       | 29 |
| 4.2.3. Unutarstanični mehanizam i djelovanje.....                          | 30 |
| 4.2.4. Uloga u patobiologiji PAH-a.....                                    | 33 |
| 4.2.5. Lijekovi koji djeluju na put dušikovog oksida.....                  | 33 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 4.2.6. | Inhibitori fosfodiesteraze 5.....                         | 35 |
| 4.2.7. | Aktivatori gvanilat ciklaze .....                         | 37 |
| 4.3.   | Prostaciklinski put .....                                 | 40 |
| 4.3.1. | Prostanoidi.....  | 40 |
| 4.3.2. | Djelovanje prostanoida.....                               | 41 |
| 4.3.3. | Lijekovi koji djeluju na prostaciklinski put.....         | 42 |
| 4.3.4. | Analozi prostaciklina.....                                | 42 |
| 4.3.5. | Neprostaciklinski agonist IP- receptora - seleksipag..... | 45 |
| 4.4.   | Serotonin u plućnoj hipertenziji .....                    | 47 |
| 4.4.1. | Sinteza i djelovanje.....                                 | 47 |
| 4.4.2. | Serotoninski sustav kao terapijska meta.....              | 49 |
| 4.5.   | Signalni putevi tirozin kinaza.....                       | 50 |
| 4.5.1. | Inhibitori tirozin kinaza .....                           | 51 |
| 4.6.   | Inhibitori Rho kinaze.....                                | 52 |
| 4.7.   | Potencijalna terapija u razvoju .....                     | 52 |
| 4.7.1. | Imunološka terapija .....                                 | 52 |
| 5.     | Zaključak.....  | 54 |
| 6.     | Literatura .....  | 56 |
| 7.     | Sažetak/ Summary .....                                    | 60 |

# 1. Uvod

## 1.1. Općenito o plućnoj arterijskoj hipertenziji

Plućna arterijska hipertenzija kronična je i progresivna bolest malih plućnih arterija. Karakterizirana je povišenim arterijskim tlakom koji iznosi  $>25$  mmHg za vrijeme odmora. Postoji podjela plućne arterijske hipertenzije na nekoliko kategorija, međutim svima im je zajedničko obilježje vazokonstrikcija plućnih arterija i njihovo strukturno remodeliranje. Remodeliranje obično zahvaća sve slojeve stijenke krvnih žila, ali najsnažnije sloj medije kojeg čine glatke mišićne stanice. Zbog poremećaja vazoregulacije i protoka krvi kroz dotične krvne žile dolazi do povišenja plućnog arterijskog tlaka i vaskularnog otpora, što u konačnici vodi ka hipertrofiji desnog ventrikula. Ukoliko se ne liječi dovodi do smrti zbog zatajenja srca. Upravo zbog toga cilj terapije jest zaustaviti vaskularno remodeliranje i poboljšati funkciju endotela (Montani i sur. 2013).

Procjenjuje se da je prevalencija PAH-a u općoj populaciji niska i iznosi između 15 i 52 oboljelih na milijun stanovnika. Zbog tako niske prevalencije svrstava se u skupinu rijetkih bolesti (*orphan disease*), a lijekovi za njeno liječenje u Europskoj Uniji dobivaju status lijekova za rijetke bolesti (*orphan drug status*). Bolest se često dijagnosticira u uznapređovalom stadiju što dodatno otežava procjenu stvarnog broja oboljelih. Bolest se može javiti u bilo kojoj životnoj dobi, kako kod odraslih tako i kod djece. Primijećeno je da se kod žena pojavljuje tri puta češće nego kod muškaraca (Tomulić V i sur. 2010).

Prognoze izlječenja razlikuju se ovisno o tipu bolesti, ali su općenito slabe što je djelomično posljedica kasnog otkrivanja bolesti. Smrtnost pacijenata je vrlo visoka, a prosječni životni vijek oboljelih nakon dijagnoze je manji od 3 godine. Ranije dijagnosticiranje i početak liječenja poboljšavaju preživljavanje i usporavaju progresiju bolesti. Napredak u razumijevanju patofizioloških mehanizama PAH-a omogućio je razvoj novih lijekova koji značajno poboljšavaju kvalitetu života oboljelih, ali i njihovo preživljavanje (Montani i sur. 2013).

## 1.2. Patofiziologija i molekularna podloga bolesti

Kod različitih podtipova plućne hipertenzije različiti su faktori koji dovode do pojave i progresije bolesti. Ono što je zajedničko svima jest vaskularna obstrukcija koja dovodi do povećanja vaskularnog otpora. Nekontrolirana proliferacija stanica u intimi i mediji krvnih žila ključna je pojava u patogenezi plućne arterijske hipertenzije. Vazokonstrikcija, endotelna disfunkcija, slaba kronična upala i tromboza sudjeluju u povećanju plućnog vaskularnog otpora. Patofiziološki procesi prikazani su na Slici 1. (Crosswhite i Sun, 2014; Montani D i sur., 2013)

Poznato je da plućna arterijska hipertenzija može biti sporadična u populaciji, ali isto tako može biti nasljedna u obitelji. Proučavanjem obitelji u kojima su članovi oboljeli od PAH-a otkriveno je nekoliko gena čije su mutacije povezane s pojavom bolesti. Poznata je mutacija gena za protein BMPR2 (eng., bone morphogenetic protein receptor II). Radi se o membranskom receptoru za faktore rasta iz porodice TGF  $\beta$  (eng., transforming growth factor  $\beta$ ) koji reguliraju proliferaciju i diferencijaciju stanica. Ova mutacija dovodi do pretjerane proliferacije glatkih mišićnih stanica. Otkrivene su također mutacije gena za *activin-like kinase type-1* koji je isto receptor za faktore rasta iz porodice TGF $\beta$  smješten na endotelnim stanicama, ali i gena za serotoninški transporter (5-HTT) (McLaughlin i McGoan. 2006).

### 1.2.1. Endotelna disfunkcija

Endotelne stanice su glavne stanice u regulaciji vaskularne funkcije. One produkcijom različitih signalnih molekula kontroliraju tonus krvnih žila, proliferaciju i apoptozu stanica u stijenci krvnih žila kao i agregaciju trombocita. Endotelne stanice kod plućne arterijske hipertenzije na poticaj određenih stimulusa nekontrolirano proliferiraju i formiraju endotelne lezije. Lezije koje sužavaju lumen krvnih žila sastoje se od velikog broja endotelnih stanica, matriksnih proteina i fibroblasta. Takav endotel više nije funkcionalan nego nastupa stanje endotelne disfunkcije, a nastaje zbog kroničnih ozljeda endotela, slabe kronične upale, hipoksije ili genetskih predispozicija (Crosswhite i Sun, 2014; Montani D i sur., 2013). Kao posljedica endotelne disfunkcije javlja se poremećaj ravnoteže produkcije vazodilatatora i vazokonstriktora. Smanjuje se endogena produkcija najznačajnijih vazodilatatora

prostaglandina I<sub>2</sub> i dušikovog oksida, a s druge strane pojačana je produkcija vazokonstriktora endotelina-1, serotonina i tromboksana A<sub>2</sub>. Zbog toga je pojačana vazokonstrikcija plućnih arteriola pa je stoga povećan tlak i otpor u tim krvnim žilama. Endotelna disfunkcija osim što dovodi do pojačane vazokonstrukcije doprinosi i vaskularnom remodeliranju stijenke plućnih arteriola. Posljedica je to mitogenog djelovanja pojedinih vazokonstriktora koji se pojačano produciraju uključujući endotelin-1, serotonin i tromboksan A<sub>2</sub>. Zbog središnje regulatorne uloge endotela, cilj terapije PAH-a jest povratiti njegovu normalnu funkciju. Postojeći lijekovi, a to su antagonisti endotelinskih receptora, inhibitori fosfodiesteraze 5 i analozi prostaciklina zaista poboljšavaju funkciju endotela (Crosswhite i Sun,2014; Montani D i sur., 2013).

### 1.2.2. Vaskularno remodeliranje

Kod plućne arterijske hipertenzije dolazi do promjena u strukturi stijenke krvnih žila zbog pojačane proliferacije vaskularnih stanica. Remodeliranje se događa u svim slojevima stijenke pa je tako prethodno opisano stvaranje endotelnih lezija. Međutim, najizraženije remodeliranje je u mediji žila gdje dolazi do nekontrolirane proliferacije glatkih mišićnih stanica. Proces vaskularnog remodeliranja uključuje aktivaciju i pretjeranu proliferaciju glatkih mišićnih stanica i fibroblasta, promjenu komunikacije endotela i ostalih vaskularnih struktura i pojačanu aktivnost cirkulirajućih progenitorskih stanica. Proliferacija i apoptoza glatkih mišićnih stanica u plućnima arterijama strogo su kontrolirani procesi kako bi se održala normalna struktura stijenke krvnih žila i kako bi one zadržale funkcionalnost. To je ostvareno djelovanjem raznih molekula porijeklom iz endotelnih stanica, kao što su endotelin-1, prostaciklin, dušikov oksid te neki faktori rasta, najviše trombocitni faktor rasta (platelet-derived growth factor-PDGF), Faktor rasta fibroblasta (fibroblast growth factor 2 - FGF2), epidermalni faktor rasta (epidermal growth factor – EGF) i stem cell factor (SCF). Zbog endotelne disfunkcije javlja se disbalans navedenih molekula pa se javlja strukturno remodeliranje medije plućnih krvnih žila (Crosswhite i Sun,2014; Wilkins, 2011; Morell i sur., 2009).

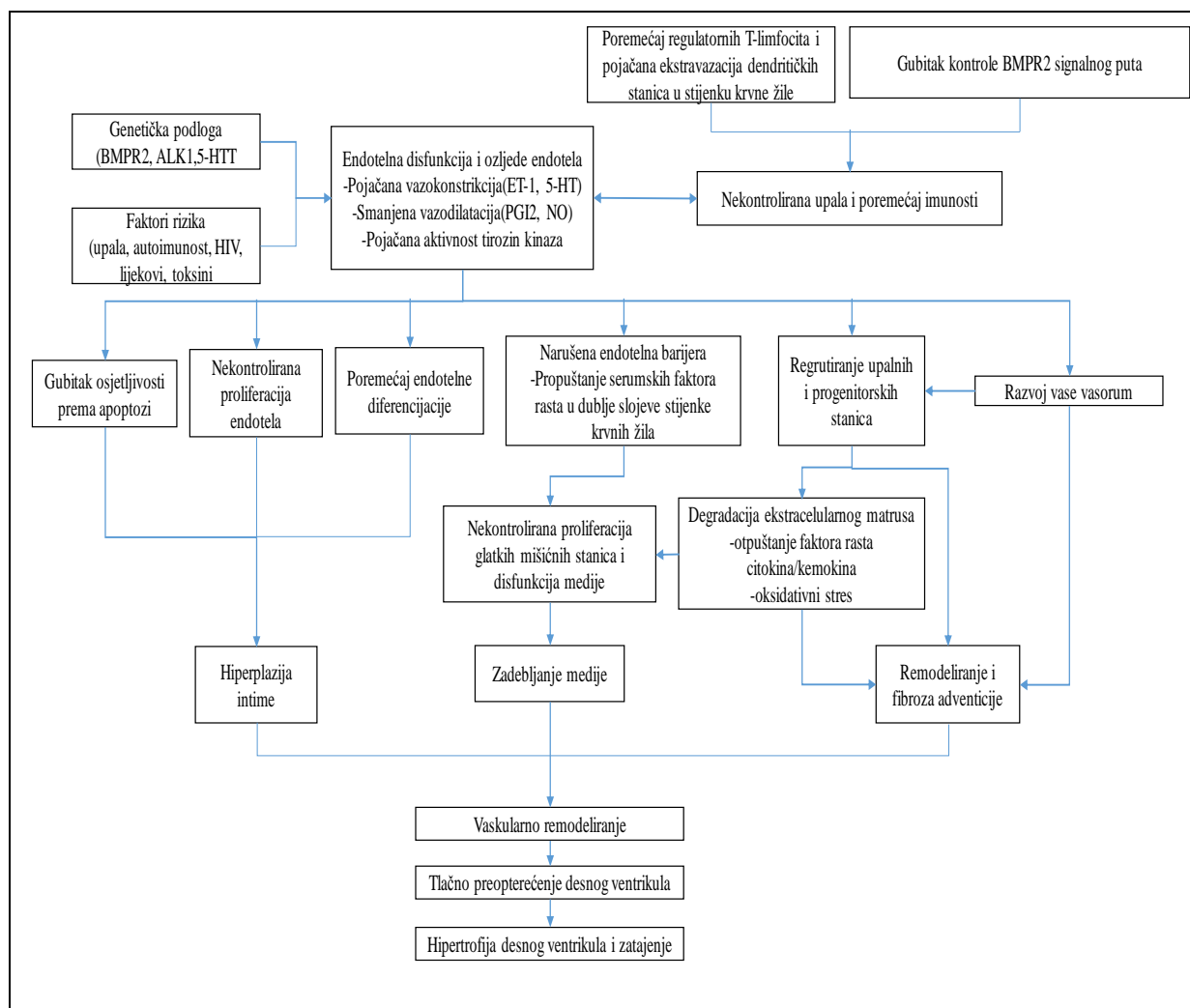
Na unutarstaničnoj razini važnu ulogu u regulaciji proliferacije ima koncentracija kalcija koji reguliraju upravo molekule iz endotela. Naime, ionikalcija ostvaruju svoje pro-proliferativno djelovanje tako što stvaraju kompleks s kalmodulinom koji onda u izravnoj interakciji aktivira



mitogenom aktiviranu protein kinazu (MAPK) koja potiče ekspresiju transkripcijskih faktora c-fos i c-jun koji promoviraju stanični rast i diobu. Upravo je ovo način na koji brojne mitogene molekule, uključujući i endotelin-1 potiču remodeliranje pulmonarnih krvnih žila. U središtu je dakle MAPK koja osim na ovaj način može biti aktivirana i preko Ras/Raf/Mek/Erk signalnog puta, a kojeg vežući se na membranske receptore pokreću faktori rasta poput PDGF, VEGF i TGF- $\beta$ . Za razliku od učinka mitogena, antimitogeni kao što su prostaciklin i dušikov oksid inhibiraju MAPK i njeno pro-proliferativno djelovanje na način da povećavaju unutarstanične koncentracije sekundarnih glasnika cGMP-a i cAMP-a. Oni onda aktiviraju svoje efektorske protein kinaze, PKA i PKG koje fosforilacijom blokiraju Ras/Raf/Mek/Erk put i aktivaciju MAPK. Disbalansom mitogenih i antimitogenih molekula nastupa abnormalna proliferacija glatkih mišićnih stanica, što dovodi do hiperplazije stijenke te do suženja lumena žila (Crosswhite i Sun, 2014; Wilkins, 2011; Morell i sur., 2009).

### 1.2.3. Kronična upala

Pokazalo se da upala ima važnu ulogu u razvoju plućne arterijske hipertenzije. U lezijama u stijenkama krvnih žila pluća pronađene su brojne upalne stanice koje uključuju monocite, makrofage, limfocite T i B i dendritičke stanice. Osim toga, pronađene su i povišene koncentracije citokina i kemokina (interleukin IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  i MCP-1) u plazmi oboljelih (Wilkins, 2011.).



Slika 1. Prikazpatofiziologije plućne arterijske hipertenzije(preuzeto i prilagođeno prema Montani i sur., 2013).

### 1.3. Klasifikacija plućne hipertenzije

Prema važećoj klasifikaciji „Dana Point“ bolest se može podijeliti u pet glavnih tipovaprema patologiji, patofiziologiji, hemodinamskim karakteristikama i strategiji liječenja (Tablica 1). Tipovi su plućna arterijska hipertenzija, plućna hipertenzija zbog bolesti lijevog srca (ili plućna venska hipertenzija), plućna hipertenzija zbog bolesti pluća i/ili hipoksije, kronična tromboembolijska plućna hipertenzija i plućna hipertenzija nejasnog mehanizma (Crosswhite i Sun, 2014).

Tablica 1. Podjela plućne arterijske hipertenzije (preuzeto i prilagođeno prema Ghofrani i sur., 2017)

| Kategorija plućne hipertenzije                        | Karakteristike bolesti  |
|---|---|
| 1. Plućna arterijska hipertenzija                     | Nastupa remodeliranje plućne vaskulature koje dovodi do zadebljanja stijenke plućnih arterija, povećanja plućnog vaskularnog otpora, pretjeranog tlačnog opterećenja desnog ventrikula i disfunkcije desnog srca. |
| 2. Plućna hipertenzija zbog bolesti lijevog srca      | Najčešći oblik plućne hipertenzije koji je posljedica sistoličke ili dijastoličke disfunkcije lijevog ventrikula, bolesti srčanih zalistaka ili nekih kongenitalnih stečenih stanja.                              |
| 3. Plućna hipertenzija zbog bolesti pluća i hipoksije | Oblik plućne hipertenzije koji nastaje kao posljedica kronične opstruktivne bolesti pluća (KOPB) ili intersticijske bolesti pluća.  |
| 4. Kroničnatromboembolijske hipertenzija              | Karakterizira je prisutnost tromba u plućnim žilama i remodeliranje krvnih žila.  |
| 5. Plućna hipertenzija s nejasnim mehanizmom          | Bolest uključuje hemoragijske poremećaje, mijeloproliferativne poremećaje i ostala stanja kao što je zatajenje bubrega.   |

#### 1.4. Funkcionalna klasifikacija bolesti

Plućna arterijska hipertenzija dijeli se u četiri klase s obzirom na to koliki je stupanj oboljenja, pa tako što je viši stupanj oboljenja bolest je teža. Klasifikaciju su definirale Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) i New York Health Association (NYHA) (Tablica 2). Podjela plućne arterijske hipertenzije prema stupnju težine bolesti važna je radi određivanja farmakoterapije, s obzirom da su lijekovi s različitim mehanizmima djelovanja indicirani u različitim stupnjevima oboljenja.

Tablica 2. Podjela bolesti prema stupnju izraženosti simptoma (preuzeto i prilagođeno prema Montani i sur., 2013)

|         | Klasifikacija prema WHO  | Klasifikacija prema NYHA  |
|---------|--|---|
| Klasa 1 | Pacijenti ne osjećaju simptome tijekom vježbe i odmora.  | Pacijenti ne osjećaju simptome za vrijeme obavljanja uobičajnih fizičkih aktivnosti.                    |
| Klasa 2 | Pacijenti ne osjećaju simptome za vrijeme odmora, ali osjećaju nelagodu i kratkoću daha tijekom umjerene fizičke aktivnosti. | Pacijenti osjećaju simptome tijekom uobičajnih fizičkih aktivnosti i ograničenost u njihovom izvođenju. |
| Klasa 3 | Pacijenti koji ne osjećaju simptome za vrijeme odmora, ali su ograničeni u obavljanju normalnih životnih aktivnosti.         | Pacijenti osjećaju simptome uz minimalnu aktivnost i ograničeni su u njihovom izvođenju.                |
| Klasa 4 | Pacijenti imaju simptome za vrijeme odmora, a oni se još dodatno pogoršavaju za vrijeme aktivnosti.                          | Pacijenti koji imaju simptome kod bilo kakve aktivnosti i za vrijeme odmora.                            |

### 1.5. Liječenje plućne arterijske hipertenzije

Liječenje plućne arterijske hipertenzije uključuje nefarmakološke mjere, odnosno prilagodbu načina života, konvencionalnu terapiju koja djeluje simptomatski i lijekove koji utječu na tijek bolesti. Cilj terapije je ublažavanje simptoma, poboljšanje kvalitete života oboljelih kao i produljenje života (Montani i sur. 2013).

### 1.5.1. Nefarmakološke mjere

Od nefarmakoloških mjera preporuča se lagano kretanje uz izbjegavanje intenzivnih fizičkih napora koji bi mogli dovesti do hipoksijom inducirane pulmonarne vazokonstrikcije i do pogoršanja stanja bolesti. Zbog smanjene oksigenacije krvi kod pojedinih pacijenata bit će potrebna primjena kisika, a sve kako bi se spriječila hipoksijom izazvana vazokonstrikcija i pogoršanje stanja. Pacijenti bi se trebali pridržavati natrij-restriktivne dijete, što znači unos manje od 2400 mg soli dnevno, zato što pojačani unos soli može dovesti do pojačanog zadržavanja vode u organizmu i konačno do zatajenja srca. Respiratorne infekcije mogu biti fatalne kod ove skupine pacijenata zbog čega ih je potrebno prevenirati, a to se postiže cijepljenjem protiv H. influenze i pneumokoka. Hemodinamske i hormonske promjene koje se javljaju u trudnoći mogu dovesti do pogoršanja stanja bolesti i do potencijalno fatalnog zatajenja desnog srca. Zbog visoke smrtnosti koja se povezuje s trudnoćom, kod pacijentica oboljelih od PAH-a trudnoća je kontraindicirano stanje. Iz tog razloga nužna je primjena odgovarajuće kontracepcije kako bi se trudnoća izbjegla. Izbor kontracepcije ovisi o terapiji bolesti, pa tako ako je u terapiji bosentan koji smanjuje učinkovitost oralne kontracepcije nužna je primjena dodatnih mehaničkih metoda (Montani i sur. 2013; McLaughlin i McGoon, 2006).

### 1.5.2. Nespecifična terapija

Diuretici su jedni od najvažnijih suportivnih lijekova u liječenju plućne arterijske hipertenzije. Napredovanjem PAH-a razvija se zatajenje desnog srca koje nastaje zbog remodeliranja miokarda. Kao posljedica toga dolazi do pojačane retencije tekućine u organizmu što se onda manifestira kroz ascites i periferne edeme. Diuretici zajedno sa  $\text{Na}^+$  restriktivnom dijetom smanjuju višak vode u tijelu. Doze diuretika potrebno je prilagoditi bubrežnoj funkciji i za vrijeme primjene kontrolirati koncentracije kalija u krvi te ga nadomiještati u slučaju manjka. Kod plućne arterijske hipertenzije pojačana je koagulabilnost i rizik od stvaranja tromba, međutim samo nekoliko studija podržava primjenu antikoagulansa. Ukoliko se ipak koriste, u terapiji je najčešće varfarin za koji se pokazalo da poboljšava preživljavanje pacijenata. U tom je slučaju potrebno pažljivo titriranje doze i oprez zbog mogućnosti stupanja u interakcije s drugim lijekovima s kojima se može naći u terapiji.

Kod brojnih pacijenata će u nekoj fazi bolesti biti nužna suplementacija kisika radi održavanja zadovoljavajuće razine saturacije kisikom iznad 90%, a sve kako si se spriječila hipoksijom uzrokovana vazokonstrikcija (Montani i sur. 2013).

### 1.5.3. PAH specifična terapija

Bolje razumijevanje molekularne podloge plućne arterijske hipertenzije dovelo je do razvoja nekoliko skupina lijekova koji djeluju na različite putove čiji poremećaj dovodi do pojave bolesti. Dosad razvijeni lijekovi koji se koriste poboljšali su simptome kod oboljelih i omogućili usporavanje progresije bolesti, ali nažalost još uvijek ne postoji lijek koji bi izliječio PAH. Lijekovi koji su odobreni za liječenje su antagonisti endotelinskih receptora (bosentan, ambrisentan i macitentan), inhibitori fosfodiesteraze 5 (sildenafil, tadalafil), stimulator topljive gvanilat ciklaze (riociguat), sintetski analozi prostaciklina (epoprostenol, iloprost, treprostinil) i agonist IP<sub>2</sub>- receptora (seleksipag) (Montani i sur. 2013).

## 2. Obrazloženje teme

Plućna arterijska hipertenzija kronična je i progresivna kardiovaskularna bolest s vrlo visokom smrtnošću koja je posljedica zatajenja srca. Radi se o rijetkoj bolesti s kompleksnom patobiologijom koja se svrstava u skupinu rijetkih bolesti (*orphan disease*). U prethodnih nekoliko desetljeća napravljen je veliki iskorak u razumijevanju molekularne podloge bolesti. To je omogućilo razvoj novih lijekova čije su farmakološke mete upravo signalni putevi koji su poremećeni kod plućne arterijske hipertenzije. Postojeći lijekovi najviše djeluju na smanjenje vazokonstrikcije, ali i na zaustavljanje patološkog remodeliranja krvnih žila. Unatoč napretku u liječenju PAH-a, ona i dalje ostaje neizlječiva pa se iz tog razloga istražuju novi inovativni lijekovi koji bi ciljali neke alternativne puteve te tako doveli do izlječenja.

Cilj ovog rada je prikazati najvažnije značajke u patobiologiji plućne arterijske hipertenzije, opisati patofiziološke puteve koji su uključeni u nastanak i progresiju bolesti, te farmakološki okarakterizirati skupine lijekova koji se koriste u terapiji. Osim toga, prikazat će se i potencijalni novi lijekovi koji se nalaze u različitim fazama istraživanja i razvoja.

### 3. Materijali i metode

Za izradu ovog teorijskog diplomskog rada proučavana je stručna i znanstvena literatura relevantna za temu plućne arterijske hipertenzije i njenog liječanja. Proučavani su udžbenici iz farmakologije i pretraživane bibliografske baze poput PubMeda. Pretraživanje je provedeno korištenjem različitih kombinacija ključnih riječi *pulmonary arterial hypertension, endothelin pathway, nitric oxide pathway, serotoninine pathway in pulmonary arterial hypertension, prostacyclin pathway, endothelin receptor antagonists, phosphodiesterase 5 inhibitors, guanilat cyclase agonists, prostacyclin analogs*.

Pregledavane su također mrežne stranice Europske agencije za lijekove (EMA) i Hrvatske agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) kako bi se pristupilo sažecima opisa svojstava onih lijekova koji su u Europi odbreni za liječenje plućne arterijske hipertenzije.



## 4. Rezultati i rasprava

### 4.1. Endotelinski put

Jedan od sustava uključenih u patogenezu plućne arterijske hipertenzije svakako je endotelinski sustav. Tome u prilog ide i činjenica da su blokatori endotelinskih receptora učinkovita terapijska skupina lijekova u liječenju PAH. Neurohormon endotelin-1 jedan je od najpotentnijih vazokonstriktora i mitogena u plućnoj cirkulaciji. Svoje učinke ostvaruje preko aktivacije ET-A i ET-B receptora prisutnih na endotelnim i glatkim mišićnim stanicama krvnih žila. Njegove su koncentracije značajno povišene u plazmi i u prekapilarnim plućnim arteriolama kod pacijenata oboljelih od plućne arterijske hipertenzije. Posljedica je to pojačane endotelne produkcije kao i inhibirane eliminacije endotelina. Razine endotelina-1 u cirkulaciji koreliraju s ozbiljnosti bolesti, poremećajem kardiopulmonarne hemodinamike i mortalitetom. Osim toga, povećan je broj endotelinskih receptora na plućnim prekapilarnim arteriolama (Stibon i Morrell, 2012).

#### 4.1.1. Sinteza endotelina

Endotelin-1 je vazoaktivni peptid od 21 aminokiseline koji spada u porodicu endotelina u koju se još svrstavaju endotelin-2 i endotelin-3. Prvenstveno se sintetizira u endotelnim stanicama krvnih žila nakon čega se egzocitozom izlučuje i veže za odgovarajuće endotelinske receptore koji su prisutni na glatkim mišićnim stanicama, endotelnim stanicama i fibroblastima krvnih žila. Sintetizira se u proteolitičkom procesu koji se sastoji od dva koraka. Primarni prekursor koji se sastoji od 200 aminokiselina, nazvan preproendotelin-1 se proteolitički cijepa djelovanjem endopeptidaze i tako nastaje i dalje inaktivni prekursor nazvan veliki endotelin-1. Taj se prekursor dalje prevodi u aktivni endotelin-1, koji je čak 140 puta potentniji vazokonstriktor i to djelovanjem endotelin-konvertirajućih enzima (ECEs). Endotelin-1 se konstitutivno sintetizira i izlučuje, a sve je to regulirano na razini genske transkripcije djelovanjem različitih vanjskih stimulusa. Primarno je parakrina molekula jer se čak 80% ET-1 sintetiziranog u endotelnim stanicama secernira egzocitozom kroz bazolateralnu stranu stanice prema glatkim mišićnim stanicama krvne žile, a samo se 20% izlučuje u krvotok.

Uklanjanje izlučenog endotelina-1 odvija se preko endotelnih stanica krvnih žila u plućima i bubrezima. Vežanjem na ET-B receptore na endotelnim stanicama pokreće se internalizacija endotelina-1, a zatim i degradacija u stanici (Miyagawa i Emoto,2014; Stibon i Morrell, 2012).

#### 4.1.2. Uloga endotelina-1 u patogenezi plućne arterijske hipertenzije

Endotelin-1 doprinosi razvoju plućne arterijske hipertenzije zato što djeluje na sve mehanizme koji sudjeluju u razvoju bolesti. Osim što je najjači vazokonstriktor u plućnoj cirkulaciji, on također dovodi do abnormalne proliferacije glatkih mišićnih stanica, endotelnih stanica i fibroblasta, a ujedno i inhibira njihovu apoptozu. Takvo djelovanje rezultira sa stvaranjem fibroznih zadebljanja u stijenci krvne žile, oštećenjem endotela zbog pretjerane vazokonstrikcije i trombozom. Fibroza stijenke žila posljedica je pojačane aktivacije i kontrakcije fibroblasta koji pojačano sintetiziraju komponente ekstracelularnog matriksa. Pro-proliferativnim djelovanjem na endotelne stanice doprinosi endotelnoj disfunkciji i disbalansu vazokonstriktora i vazodilatatora. Za razvoj PAH-a važna je i slaba kronična upala krvnih žila u kojoj endotelin-1 također ima svoju ulogu. On djeluje proupalno tako što povećava kapilarnu permeabilnost zbog čega je olakšana infiltracija upalnih stanica u tkivo, a osim toga stimulira stvaranje proupalnih citokina i staničnu adheziju. Konačno, endotelin-1 se povezuje i s povećanjem produkcije reaktivnih kisikovih spojeva zbog povećanja aktivnosti i ekspresije NADPH oksidaze u endotelu. Svi ovi učinci endotelina-1 doprinose njegovoj funkciji u plućnom vaskularnom remodeliranju (Clozel i sur.,2013; Stibon i Morrell, 2012).

#### 4.1.3. Endotelinski receptori

Endotelin-1 svoje učinke na krvnim žilama ostvaruje preko dva tipa endotelinskih receptora, ET-A i ET-B, koji su oba sa G-proteinom povezani receptori. Vežanjem endotelina-1 na endotelinske receptore dolazi do konformacijske promjene receptora i aktivacije pridruženih G- proteina, o čijem tipu ovisi koji će se signalni put aktivirati. G-proteini sastoje se od  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  podjedinica pri čemu je u inaktivnom stanju za  $\alpha$ -podjedinicu vezan nukleotid GDP. Nakon aktivacije i konformacijske promjene receptora na G-proteinu dolazi do zamjene GDP-a s GTP-om, a zatim i do disocijacije  $\alpha$ - podjedinice od  $\beta\gamma$ -podjedinice. Aktivirana  $\alpha$ -podjedinica

dalje u izravnoj interakciji s različitim ciljnim molekulama pokreće signalne putove u stanici, dok  $\beta\gamma$ -podjedinice ostaju zajedno vezane za membranu.

Afinitet vezanja endotelina-1 za ET-A receptor znatno je veći od afiniteta vezanja endotelina-2 i endotelina-3, dok su afiniteti sve tri izoforme proteina za ET-B podjednake. ET-A receptori dominantno se nalaze na glatkim mišićnim stanicama krvnih žila, dok su ET-B receptori smješteni na endotelnim, ali i glatkim mišićnim stanicama (Correale i sur., 2018; Casserly i Klinger, 2008).

Učinci aktivacije endotelinskih receptora razlikuju se ovisno o tome na kojim su stanicama ti receptori smješteni. Tako će aktivacijom oba tipa receptora smještenih na glatkim mišićnim stanicama doći do vazokonstrikcije i pretjerane proliferacije (mitogeno djelovanje) te hipertrofije stanica. S druge strane, aktivacija ET-B receptora na endotelnim stanicama dovodi posredno do vazodilatacije zbog toga što se potiče stvaranje dušikovog oksida (NO) i prostaciklina, prevenira se apoptoza i omogućuje se uklanjanje endotelina-1. To se ostvaruje aktivacijom signalnog puta Akt-kinaze koje će fosforilacijom aktivirati endotelnu NO-sintazu i pojačati produkciju NO, koji će uzrokujuću vazodilataciju biti protuteža endotelinu-1 i tako osigurati homeostazu tonusa krvnih žila pluća. Unatoč dvostrukom učinku, endotelin-1 je dominantno vrlo jaki vazokonstriktor (Casserly i Klinger, 2008).

#### 4.1.4. Unutarstanični mehanizam

##### 4.1.4.1. Vazokonstrikcija

Aktivacija ET-A i ET-B receptora na glatkim mišićnim stanicama dovodi do vazokonstrikcije koja je posljedica aktivacije  $Ca^{2+}$ -ovisnog i neovisnog (RhoA) signalnog puta. ET-A receptor na membrani glatkih mišićnih stanica krvnih žila povezan je s Gq-proteinom koji će aktivirati fosfolipazu C, zatim sa G12 proteinom koji aktivira RhoA protein, ali i s Gs proteinom koji aktivira adenilat ciklazu (AC) te tako povećava produkciju sekundarnog glasnika cAMP-a. ET-B receptori na glatkim mišićnim stanicama povezani su s Gq proteinom, ali i s G13 proteinom koji aktivira ROCK put i Gi proteinom koji inhibira adenilat ciklazu (AC) i smanjuje koncentraciju sekundarnog glasnika cAMP-a (Houde i sur., 2016).

Gq protein pridružen ET-A i ET-B receptoru aktivira fosfolipazu C koja iz membranskog fosfolipida fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfata (PIP<sub>2</sub>) stvara sekundarne glasnike diacilglicerol (DAG) i inozitol 1,4,5- trifosfat (IP<sub>3</sub>). Oni onda dovode do povećanja koncentracije  $Ca^{2+}$  u

stanicama. IP<sub>3</sub> kao hidrofilni glasnik difundira u citoplazmu i djeluje na specifične IP<sub>3</sub>-receptore smještene na sarkoplazmatskom retikulumu te dovodi do oslobađanja Ca<sup>2+</sup> iz intracelularnih rezervi. S druge strane, DAG kao hidrofobni glasnik aktivira citosolnu protein kinazu C (PKC) koja fosforilacijom djeluje na brojne mete u stanici. Signalni put koji uključuje PKC sudjeluje u regulaciji staničnog rasta, apoptoze stanica i vazokonstrikcije. Aktivirana PKC fosforilacijom aktivira membranske kalcijске kanale (receptorom aktivirani kalcijски kanali -ROCC) i omogućuje ulazak Ca<sup>2+</sup> iz ekstracelularnog prostora. Nakon toga slijedi senzitivizacija mikrofilamenata staničnog citoskeleta na Ca<sup>2+</sup>. Povećanje intracelularne koncentracije Ca<sup>2+</sup> dovodi do aktivacije prve mete u stanici, a to je protein kalmodulin. Daljnje događaje u stanici posreduju PKC i Ca<sup>2+</sup> aktivirana kalmodulin kinaza II (CamK).

Aktivirana PKC fosforilira i aktivira CPI-17 protein koji je inhibitor miozin fosfataze kratkog lanca (MLCP). Kada je MLCP inhibirana ona neće moći hidrolizirati fosfatne skupine s miozina. S druge strane, PKC ili CamKII izravnom fosforilacijom regulatorne podjedinice aktiviraju miozin kinazu kratkog lanca (MLCK), enzim koji fosforilira miozinske lance stvarajući tako vezna mjesta za interakciju s aktinom. Ovakvi procesi dovode do kontrakcija u glatkim mišićnim stanicama, odnosno do vazokonstrikcije.

Osim na prethodno opisani način, senzitivizacija mikrofilamenata na Ca<sup>2+</sup> može se dogoditi i tako da se aktivira put Rho kinaze (ROCK) i to zahvaljujući G12 proteinu koji je pridružen ET-A receptoru te G13 proteinu pridruženom ET-B receptoru. Sam ROCK put sudjeluje također i u regulaciji ekspresije gena u stanicama, diferencijacije, proliferacije, hipertrofije, apoptoze, adhezije i migracije stanica. Aktivacijom endotelinskog receptora dolazi do zamjene nukleoida GDP-a koji je vezan za Rho-A kada je ona u inaktivnom stanju s GTP-om čime se Rho-A aktivira i translocira iz citosola na membranu stanice. Aktivirana kinaza RhoA-GTP fosforilira i aktivira Rho-kinazu, a ona pak fosforilacijom regulatorne podjedinice inhibira aktivnost MLCP. Smanjenjem aktivnosti MLC-fosfataze povećava se fosforilacija miozina i potiče kontrakcija. Ovaj signalni put zaustavlja se zahvaljujući negativnim regulatorima, GTP-azama koje hidroliziraju GTP vezan za RhoA protein i prevode ga u GDP, ali i protein kinazama (kao što su PKA i PKC) koje fosforiliraju i inhibiraju RhoA. Postoje dokazi da pojačana aktivnost RhoA/Rho-kinaza puta dovodi do hipertenzije u krvnim žilama, te da se inhibicijom tog puta snižava krvni tlak. Također je vrlo dobro utvrđena veza NO i RhoA/Rho-kinaznog puta. Aktivacija puta Rho-kinaze u endotelnim stanicama krvnih žila od strane primjerice endotelina-1 suprimira ekspresiju eNO-sintaze, enzima odgovornog za sintezu NO, najvažnijeg vazodilatatora krvnih žila pluća. S druge pak strane, NO dovodi do

vazodilatacije, između ostalog, i preko inhibicije RhoA-kinaznog puta, i to preko protein kinaze G koja se aktivira u signalnom putu NO, a onda fosforilira i inhibira RhoA kinazu.

Endotelin-1 osim dominantno vazokonstriktorskog učinka kojeg ostvaruje preko ET-A receptora, preko istog receptora može djelovati i vazodilatacijski ukoliko je receptor povezan sa Gs proteinom. Naime, taj Gs protein aktivira adenilat ciklazu (AC) što dovodi do povećanja koncentracije cAMP-a i aktivacije protein kinaze A koja fosforilacijom aktivira miozin fosfatazu kratkog lanca i dovodi do relaksacije glatkih mišića krvnih žila. Suprotni se učinak ostvaruje kada endotelin-1 aktivira ET-B receptor s pridruženim Gi proteinom jer dolazi do inhibicije sinteze cAMP-a i do vazokonstrukcije (Houde i sur.,2016; Miyagawa i Emoto,2014; Lima i sur., 2010; Bouallegue i sur., 2007).

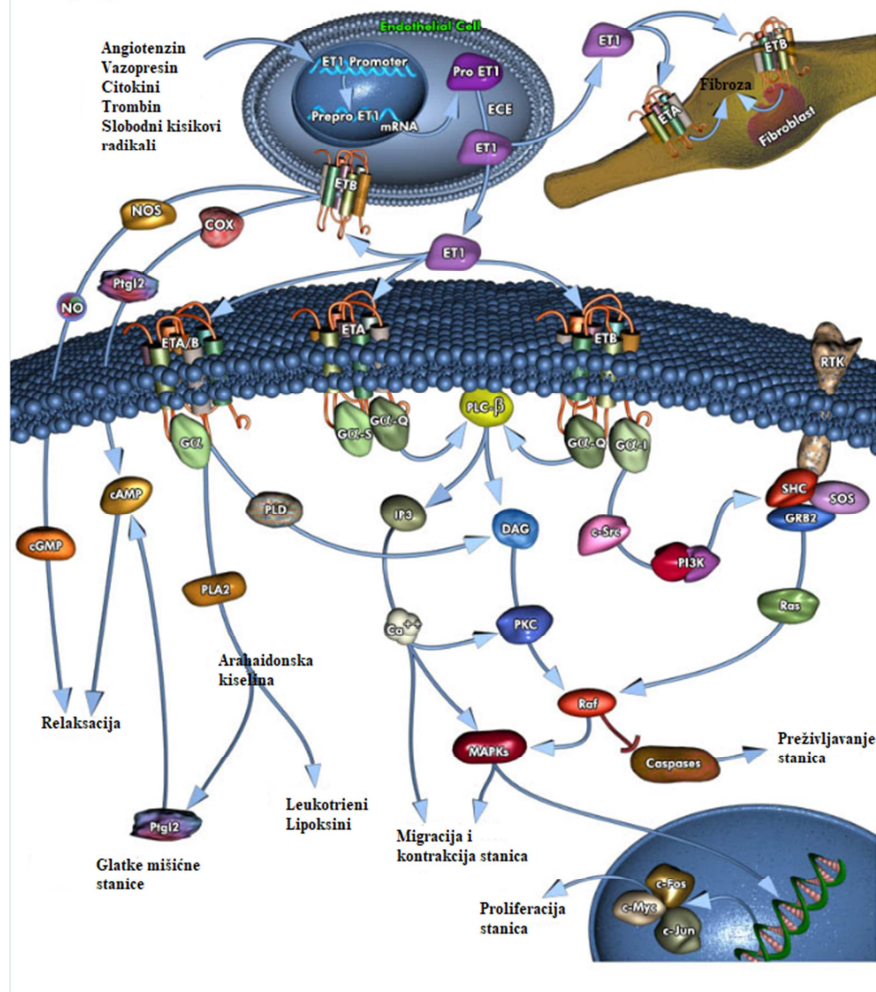
#### 4.1.4.2. Vazodilatacija

Nasuprot vazokonstriktorskom učinku koji se ostvaruje preko ET-A receptora, endotelin-1 može potaknuti i vazodilataciju djelujući na ET-Breceptore na endotelnim stanicama. Nakon vezanja za ET-B receptor, dolazi do aktivacije pridruženog Gq- proteina koji će dovesti do aktivacije puta fosfolipaze C i do povećanja koncentracije  $Ca^{2+}$  u endotelnoj stanici. Povećanje koncentracije  $Ca^{2+}$  dovest će do stvaranja kompleksa s kalmodulinom i do aktivacije kalmodulin kinaze II (CamKII) koja će fosforilacijom aktivirati endotelnu NO-sintazu i povećati sintezu NO. Porast koncentracije  $Ca^{2+}$  u stanici dovodi i do aktivacije membranskog enzima fosfolipaze A2 (PLA2) koja stvara arahidonsku kiselinu. Ona je prekursor prostaciklina koji se u toj situaciji pojačano stvara. Međutim, endotelin-1 može i negativno djelovati na produkciju NO. Ukoliko je ET-B receptor združen sa G13-proteinom, doći će do aktivacije Rho-kinaza puta u endotelnoj stanici. To dovodi do inhibicije djelovanja endotelne NO- sintaze. Osim smanjenja aktivnosti eNO-sintaze u endotelnim stanicama, može se smanjiti i ekspresija gena za enzim tako što se PKC fosforilacijom aktivira STAT3 transkripcijski faktor preko kojeg se utišava transkripcija gena za eNO- sintazu i tako reducira produkcija NO. Iz svega navedenog vidi se da endotelin-1 utječe na produkciju tvari koje imaju vazodilatacijsko djelovanje i koje ustvari čine protutežu njegovom vazokonstriktorskom djelovanju (Houde i sur.,2016; Miyagawa i Emoto,2014; Lima i sur., 2010; Bouallegue i sur., 2007).

#### 4.1.4.3. Mitogeno djelovanje

Osim što je snažni vazokonstriktor, endotelin-1 je i potentni mitogen, naime endotelinski su receptori povezani još i s aktivacijom MAP-kinaza. Ona spada u porodicu serin/treonin kinaza, koje posreduju kontrakciju glatkih mišićnih stanica, oksidacijski stres zbog pojačane produkcije superoksida, ali još važnije abnormalnu proliferaciju glatkih mišićnih stanica. Prva komponenta ovog kaskadnog puta je Ras, član porodice malih GTP- vezujućih proteina. U inaktivnom stanju na njega je vezan GDP, a nakon aktivacije receptora dolazi do zamjene s GTP-om. Nakon aktivacije, Ras fosforilira i aktivira Raf, koji zatim aktivira MAPK. MAPK fosforilira još neke nizvodne kinaze, a sve završava aktivacijom c-fos i c-jun transkripcijskih faktora u jezgri stanice koji reguliraju ekspresiju različitih citokina i faktora rasta te dovode do promocije proliferacije, rasta i diferencijacije glatkih mišićnih stanica (Houde i sur., 2016; Lima i sur., 2010; Bouallegue i sur., 2007).

Na slici 2 prikazani su signalni putovi vezani za aktivaciju ET-A i ET-B receptora.



Slika 2. Prikaz unutarstaničnih signalnih putova koje endotelin-1 pokreće u stanicama krvnih žila (preuzeto i prilagođeno s [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com))

#### 4.1.5. Antagonisti endotelinskih receptora

Zbog prethodno razjašnjene uloge endotelina-1 u pojavi i progresiji plućne arterijske hipertenzije, kao važan terapijski pristup nametnula se blokada njegovog djelovanja. Najučinkovitiji farmakološki mehanizam blokade endotelinskog puta jest uporaba nepeptidnih antagonista endotelinskih receptora koji se kompetitivno vežu za vezno mjesto endotelina-1 na receptoru. Lijekovi se dijele na selektivne antagoniste koji blokiraju samo ET-A receptor, čiji je predstavnik ambrisentan (Volibris®) i na neselektivne koji blokiraju oba endotelinska

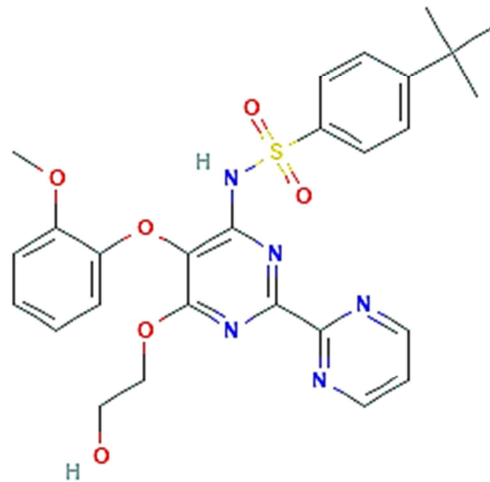
receptora, među koje spadaju bosentan (Tracleer<sup>®</sup>) i macitentan (Opsumit<sup>®</sup>). Nakon vezanja ovih lijekova na endotelinske receptore, endotelin-1 se više ne može vezati i aktivirati ih pa se postiže vazodilatacija i blokada mitogenog i remodelirajućeg učinka endotelina-1 na glatke mišićne stanice (Correale i sur., 2018; Casserly i Klinger, 2008) .

Postavlja se pitanje koja je od te dvije skupine lijekova klinički učinkovitija. Teorijskaje prednost dana selektivnim antagonistima ET-A receptora. Kad se oni primjenjuju endotelin-1 i dalje može ostvarivati pozitivne učinke aktivacijom ET-B receptora na endotelnim stanicama. Povećanjem sinteze NO i prostaciklina dovodi do vazodilatacije i antiproliferativnog učinka. Ipak ta je prednost upitna s obzirom da ET-B receptori postoje i na glatkim mišićnim stanicama i tamo posreduju vazokonstrikciju, te je njihova blokada nužna kako bi se ostvario maksimalni vazodilatacijski učinak (Correale i sur., 2018; Casserly i Klinger, 2008).

Istraživanja na životinjama pokazala su da se selektivnom blokadom ET-B receptora i dalje postiže vazokonstrikcija uzrokovana endotelinom-1 jer on aktivira ET-A receptore na glatkim mišićnim stanicama. Zbog blokade ET-B receptora nema pojačane produkcije NO i prostaciklina koji čine vazodilatatornu protutežu, iz toga slijedi da je nužna inhibicija ET-A receptora. Neka druga ispitivanja na animalnim modelima PAH pokazala su da se blokadom ET-A receptora smanjuje stupanj plućne hipertenzije za 25%, a bez blokade ET-B. Treće studije pak, pokazale su da je kombinirana blokada oba tipa receptora učinkovitija od izolirane blokade ET-A te da se postiže bolje preživljavanje životinja. Zbog različitosti eksperimentalnih i kliničkih oblika PAH i dalje ostaje nerazriješeno koja je opcija bolja u terapiji (Steiner i Preston, 2008).



Bosentan (Slika 3) je dualni je kompetitivni antagonist endotelinskih receptora, ali sa znatno većim afinitetom prema ET-A ( $K_i=4.1-43$  nMol), nego prema ET-B ( $K_i=38-730$  nMol) receptoru.

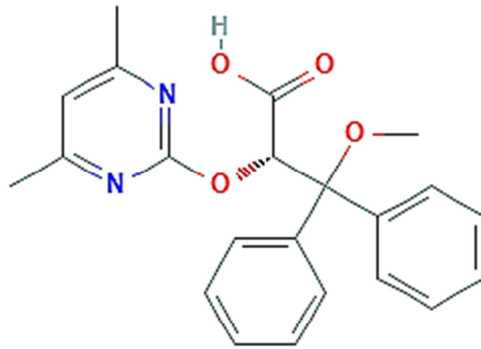


Slika 3. Struktura bosentana (preuzeto sa [www.pubchem.com](http://www.pubchem.com))

Odobren je za terapiju plućne arterijske hipertenzije kod odraslih pacijenata sa stupnjem bolesti III, prema klasifikaciji SZO s ciljem poboljšanja kapaciteta fizičkog opterećenja i smanjenja simptoma. Kod odraslih pacijenata terapija se započinje sa dozom 62,5 mg dva puta dnevno tijekom 4 tjedna, a nakon toga se prelazi na dozu održavanja od 125mg dva puta dnevno ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

Ispitivanjima na animalnim modelima bosentan je reducirao plućni vaskularni otpor i zaustavio patološku hipertrofiju krvnih žila pluća kao i desnog ventrikula. Na animalnom modelu plućne fibroze, smanjio je depoziciju kolagena u plućima. Bosentan smanjuje plućni i sistemski vaskularni otpor, dovodi do povećanja srčanog minutnog volumena, ali bez da pritom povećava frekvenciju srčanog ritma. Terapija bosentanom u kliničkim studijama dovela je do smanjenja u stopi kliničkog pogoršanja, što uključuje pogoršanje simptoma, hospitalizacije i smrtnost (Roberts i Preston, 2009; [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

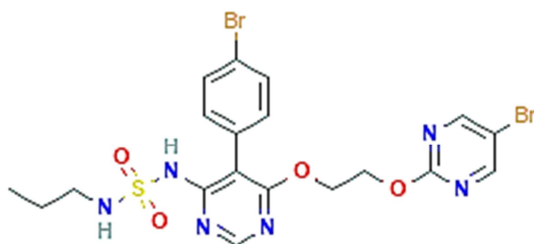
Ambrisentan (Slika 4) je selektivni antagonist ET-Areceptora dominantno smještenih na glatkim mišićnim stanicama krvnih žila pluća i kardiomiocitima, zbog čega blokira vazokonstrikciju i njihovu nekontroliranu proliferaciju.



Slika 4. Struktura ambrisentana (preuzeto sa [www.pubchem.com](http://www.pubchem.com))

Zbog selektivne blokade ET-A receptora ambrisentanom, endotelin-1 će aktivirati slobodne ET-Breceptore koji su smješteni na endotelnim stanicama te će dovesti do pojačane produkcije NO i prostaciklina koji su vazodilatatori. Indiciran je za liječenje plućne arterijske hipertenzije stupnja II i III prema klasifikaciji SZO kod odraslih pacijenata. Primjenjuje se u dozi 5 mg jednom dnevno (Correale i sur., 2018; [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)) .

Macitentan (Slika 5) je najnoviji odobreni nekompetitivni antagonist endotelinskih receptora. Razvijen je po uzoru na bosentan s ciljem maksimalnog povećanja djelovanja, a istovremeno smanjenja ozbiljnih neželjenih učinaka koji su prisutni kod njegovog prethodnika.



Slika 5. Struktura macitentana (preuzeto sa [www.pubchem.com](http://www.pubchem.com))

Neselektivno blokira ET-A i ET-B receptore, sa značajno većim afinitetom za ET-A receptor. Pokazalo se da macitentan ima značajniju efikasnost u usporedbi sa svojim prethodnicima, a to je posljedica bolje sposobnosti penetracije u tkivo zbog veće lipofilnosti i većeg afiniteta te sporije disocijacije s receptora. S obzirom na dominantno parakrinu signalizaciju endotelina-1, lijek koji može bolje penetrirati u tkivo svakako će ostvariti bolju blokadu učinka. Za razliku od bosentana i ambrisentana koji vrlo brzo disociraju s receptora, macitentan se na njemu zadržava čak 15 puta dulje zbog čega ima bolju efikasnost jer se njegov učinak ne može premostiti povećanjem koncentracije endogenog endotelina-1 kao što je to slučaj sa bosentanom i ambrisentanom. Indiciran je za dugotrajnu terapiju plućne arterijske hipertenzije kod odraslih i to kod stupnjeva bolesti II i III prema klasifikaciji SZO. Kod odraslih se pacijenata primjenjuje jednom dnevno u dozi od 10 mg (Clozel, 2016; [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

#### 4.1.6. Farmakokinetičke razlike antagonista endotelinskih receptora

Antagonisti endotelinskih receptora međusobno se razlikuju prema farmakokinetičkom profilu. Njihove najvažnije karakteristike sažete su u tablici 3.

Tablica 3. Farmakokinetika antagonista endotelinskih receptora (preuzeto i prilagođeno prema Correale i sur., 2018)

|  | Bosentan                    | Ambrisentan   | Macitentan                         |
|--|-----------------------------|---|------------------------------------|
| Put primjene                                   | Oralno                      | Oralno  | Oralno                             |
| Bioraspoloživost                               | 50%                         | 90%   | NEPOZNATA                          |
| Početak djelovanja/h                           | 3-5                         | 1,5   | 8                                  |
| Vežanje za proteine plazme (albumin)           | >98%                        | 98.8%   | >99%                               |
| Metabolizam                                    | CYP2C9, CYP3A4              | UGT(1A9S, 2B7S, 1A3S)<br>CYP3A4, CYP3A5,<br>CYP2C19 | CYP3A4, CYP2C8,<br>CYP2C9, CYP2C19 |
| Aktivni metabolit                              | +                           | -   | +                                  |
| Eliminacija                                    | 90% hepatska, 3%<br>renalna | 80% hepatska, 22%<br>renalna                        | 50% hepatska, 50%<br>renalna       |
| Poluvrijeme eliminacije (t <sub>1/2</sub> ) /h | 5-8                         | 13-16   | 16                                 |

Bosentan se intenzivno metabolizira u jetri preko CYP3A4 i CYP2C9, nakon čega se metaboliti primarno eliminiraju hepatskim putem. Minimalno se elimira renalnim putem, svega 3% nepromijenjenog bosentana. Metabolizmom nastaju 3 metabolita, od kojih je jedan farmakološki aktivan. S obzirom na značajan hepatski metabolizam i eliminaciju, provedena su ispitivanja o utjecaju stanja jetre na bioraspoloživost bosentana. Kod pacijenata s blagim oštećenjem jetrene funkcije (Child-Pugh stadij A) nije utvrđena značajna promjena farmakokinetike, pa nije potrebna prilagodba doze. Ispitivanja na 5 pacijenata pokazala su da umjereno oštećenje jetre (Child-Pugh stadij B) dovodi do značajnog povećanja izloženosti

bosentanu, dok za teško oštećenje jetre (Child-Pugh stadij C) ispitivanja nisu provedena. Zbog svega navedenog primjena bosentana kontraindicirana je kod pacijenata koji imaju umjereno i teško oštećenje jetre. S obzirom da se bosentan minimalno eliminiše renalnim putem, kod pacijenata s oštećenjem bubrega nema kontraindikacija niti je potrebna prilagodba doze (Correale i sur., 2018).

Ambrisentan se metabolizira primarno glukuronidacijom djelovanjem enzima UGT (UGT1A9S, UGT2B7S i UGT1A3S), ali podliježe i oksidativnom metabolizmu primarno putem CYP3A4, a manje putem CYP3A5 i CYP2C19. Eliminacija se primarno odvija hepatičkim putem. Iz tog razloga poremećaj rada jetre dovodi do povećanja koncentracije ambrisentana u plazmi te se javlja potreba za prilagodbom doze, a u slučaju kad se radi o teškom zatajenju jetre primjena je kontraindicirana. Renalna eliminacija ambrisentana je minimalna, stoga u slučaju pacijenata s oštećenjem bubrega nije potrebna korekcija doze. Ipak, preporučeno je oprez pri primjeni kod pacijenata s teškim bubrežnim zatajenjem (Correale i sur., 2018).

Macitentan se intenzivno metabolizira putem CYP enzima, dominantno CYP3A4 pri čemu nastaje jedan aktivni metabolit koji doprinosi farmakološkom učinku. Nakon intenzivnog metabolizma u jetri prodjednako se eliminiše renalnim i hepatičkim putem. S obzirom na farmakokinetičke značajke macitentana nije potrebna prilagodba doze kod pacijenata s blagim i umjerenim oštećenjem jetrene funkcije, ali je njegova primjena kontraindicirana kod teškog oštećenja jetre. Nije potrebna prilagodba doze kod pacijenata s oštećenjem bubrežne funkcije, ali treba pratiti razine hemoglobina i krvnog tlaka zbog povećanog rizika od hipotenzije i anemije (Correale i sur., 2018).

#### 4.1.7. Nuspojave ERA

Antagonisti endotelinskih receptora osim po farmakokinetičkim značajkama razlikuju se međusobno i prema sigurnosnom profilu, odnosno prema učestalosti pojave pojedinih nuspojava. Najčešće nuspojave koje se javljaju prilikom primjene antagonista endotelinskih receptora povezane su sa sistemskom vazodilatacijom koju djelomično uzrokuju. Osim toga, s njima se povezuje i hepatotoksičnost, anemija i periferni edemi.

Hepatotoksičnost je ozbiljna nuspojava do koje dovode antagonisti endotelinskih receptora stoga se redovito provode pretrage jetrenih enzima (AST i ALT) prije uvođenja ERA u terapiju, te jednom mjesečno za vrijeme trajanja terapije. Ona je vjerojatno posljedica kompetitivne inhibicije različitih hepatobilijarnih transportera odgovornih za aktivnu sekreciju citotoksičnih i necitotoksičnih žučnih soli iz hepatocita u žučovod. Nakon njihove inhibicije dolazi do nakupljanja tih soli u hepatocitima i do hepatotoksičnog učinka. Stupanj hepatotoksičnosti može se pratiti mjerenjem aminotransferaza u krvi. Povećanje razine aminotransferaza u plazmi ovisno je o dozi ERA. Novija ispitivanja pokazala su da inhibicija ET-B receptora izravno rezultira s kolestazom što također pridonosi hepatotoksičnom učinku. Ova je nuspojava najizraženija kod bosentana, kod ambrisentana je rizik hepatotoksičnosti relativno nizak, a razlog tome je slab učinak na hepatobilijarne transportere. Konačno, najnoviji macitentan nije hepatotoksičan (Correale i sur., 2018; Monaco i Davila, 2016; Aversa i sur., 2015; Clozel i sur., 2013).

Periferni edemi češća su nuspojava selektivnih blokatora ET-A receptora, dakle kod ambrisentana i to ponajprije kod starijih pacijenata, te su često razlog ukidanja ambrisentana iz terapije. Mehanizam u podlozi ove nuspojave proučavan je na animalnom modelu te je otkriveno da je ona posljedica aktivacije ET-B receptora posljedica čega je otpuštanje vazopresina koji potiče zadržavanje  $\text{Na}^+$  i vode u organizmu, odnosno inhibira natriurezu. Uz to se još smanjuje kontraktilnost miokarda zbog blokade ET-A receptora preko kojih endotelin-1 inače pojačava kontraktilnost miokarda. Za razliku od ambrisentana, periferni se edemi rijetko javljaju kod bosentana i macitentana (Correale i sur., 2018; Monaco i Davila, 2016; Aversa i sur., 2015; Clozel i sur., 2013).

Što se tiče hematoloških promjena, antagonisti endotelinskih receptora dovode do sniženja koncentracije hemoglobina i hematokrita. Anemija je najčešće slaba i rijetko zahtijeva prekid terapije, a nakon 12 tjedana dolazi do stabilizacije. Ona nije povezana s hemolizom ili krvarenjem, nego s inhibicijom putova koje u eritrocitima pokreće endotelin-1 preko ET-B receptora. Naime endotelin-1 blokira apoptozu eritrocita, a kada se lijekovima inhibira njegov učinak eritrociti pojačano podliježu apoptozi te se njihov broj smanjuje i nastupa anemija. Svi antagonisti endotelinskih receptora imaju podjednaku pojavnost anemije, ali ona nije toliko izražena da bi zahtijevala prekid terapije, međutim preporuka je kontrolirati koncentracije hemoglobina na početku terapije (Correale i sur., 2018; Monaco i Davila, 2016; Aversa i sur., 2015; Clozel i sur., 2013).

Od ostalih nuspojava najčešće su one povezane sa sistemskom vazodilatacijom, a to su nazalna kongestija, glavobolja, omaglica, sinkopa, palpitacija, hipotenzija, reakcije preosjetljivosti, dispneja, nazofaringitis, bronhitis, faringitis, GIT nuspojave, itd.

Još jedna važna karakteristika svih antagonista endotelinskih receptora je njihova teratogenost. Endotelin-1 od vitalne je važnosti za fetalni razvoj, a inhibicija njegovog djelovanja na modelu fetusa miša pokazala je da dolazi do hipertenzije i do kraniofacijalnih abnormalnosti. Iz tog razloga je primjena antagonista endotelinskih receptora kontraindicirana kod žena u fertilnoj dobi, osim ako se primijene odgovarajuće mjere kontracepcije. Prije početka terapije nužno je provesti test trudnoće koji mora biti negativan, te je također preporuka provoditi test svaki mjesec. Ukoliko se primjenjuje bosentan, kontracepcija se ne smije oslanjati samo na oralne kontraceptive, jer oni s njime stupaju u farmakokinetiku interakciju. Bosentan kao induktor citokroma smanjuje plazmatsku koncentraciju oralnih kontraceptiva zbog čega se smanjuje njihova učinkovitost, pa je stoga nužna primjena i sekundarnih mjera kontracepcije (Correale i sur., 2018; Monaco i Davila, 2016; Aversa i sur., 2015; Clozel i sur., 2013).

#### 4.1.8. Interakcije

Antagonisti endotelinskih receptora kao supstrati CYP3A4 stupaju u interakcije s drugim lijekovima koji djeluju kao inhibitori ili induktori tog enzima. Bosentan i macitentan koji se dominantno metabolizira preko CYP3A4 moraju se s oprezom primjenjivati sa azolnim antifungicima (ketokonazol, flukonazol) koji su inhibitori CYP3A4 te povećavaju njihove koncentracije u plazmi. Također, valjalo bi izbjegavati njihovu kombinaciju s rifampicinom koji je induktor CYP3A4 te kao takav zbog smanjenja koncentracije bosentana i macitentana u plazmi može narušiti njihovo djelovanje. Za razliku od njih, ambrisentan ne stupa u značajnije interakcije s inhibitorima i induktorima citokroma zato što se dominantno metabolizira glukuronidacijom (Aversa i sur., 2015).

Bosentan ima potencijal stvaranja brojnih interakcija zato što je i sam induktor citokroma CYP3A4 i CYP2C9. On inducira vlastiti metabolizam, ali i metabolizam drugih lijekova. Plazmatske koncentracije drugih lijekova koji se koriste u kombinaciji s bosentanom, a koji se metaboliziraju preko CYP3A4 i CYP2C9 bit će snižene zbog čega je često potrebna prilagodba njihovih doza. Od klinički značajnih interakcija svakako valja istaknuti one s

varfarinom, inhibitorima PDE5 i sa oralnim kontraceptivima s kojima se češće nalazi u politerapiji. Inhibitori PDE5 metaboliziraju se preko CYP3A4 pa će bosentan zbog indukcije enzima dovesti do sniženja njihove koncentracije u plazmi i do smanjenog ili čak izostanska djelovanja. Oralni kontraceptivi također su u interakciji s bosentanom i smanjuje im se učinkovitost, te je stoga važno pacijenticama naglasiti nužnost primjene dodatne metode kontracepcije. Ambrisentan i macitentan nisu inhibitori niti induktori CYP3A4 pa ne stupaju u ovakve interakcije kao bosentan (Aversa i sur., 2015).

#### 4.1.9. Učinkovitost ERA

Učinkovitost antagonista endotelinskih receptora vrednovana je meta-analizom koja je uključila 12 randomiziranih i kontroliranih kliničkih ispitivanja i ukupno 1471 pacijenta. Pokazalo se da antagonisti endotelinskih receptora mogu poboljšati kapacitet fizičke aktivnosti, poboljšati stupanj WHO/NYHA klasifikacije s obzirom na izraženost simptoma, ali i spriječiti pogoršanje stupnja klasifikacije. Osim toga reduciraju dispneju i poboljšavaju kardiopulmonarnu hemodinamiku kod pacijenata koji boluju od plućne arterijske hipertenzije stupnja II i III prema WHO/NYHA klasifikaciji. Unatoč dobrom učinku i redukciji simptoma upitno je smanjuju li ERA smrtnost oboljelih (Liu i sur., 2013).



## 4.2. Put dušikovog oksida

Dušikov oksid jedan je od glavnih vazodilatatora i antimitogena krvnih žila u plućima. Osim učinka na glatke mišićne stanice krvnih žila on djeluje i na trombocite i miocite ostvarujući inhibiciju adhezije leukocita u čemu se očituje njegov protuupalni činak. Također inhibira agregaciju trombocita i formiranje tromba (Stibon i Morrell, 2012).

### 4.2.1. Fiziološka uloga dušikovog oksida

Kod zdravih osoba NO je ključna molekula koja regulira vaskularnu perfuziju u plućima kao odgovor na stupanj ventilacije u pojedinim dijelovima pluća, a sve s ciljem što bolje oksigenacije krvi. Razina NO niska je u onom dijelu tkiva pluća u kojem je stupanj ventilacije nizak, odnosno kad nastupi hipoksija, što dovodi do vazokonstrikcije krvnih žila u tom dijelu pluća. Za razliku od toga, njegova je razina visoka u onim dijelovima pluća u kojima je ventilacija visoka što onda dovodi do vazodilatacije krvnih žila u tim dijelovima pluća (Stibon i Morrell, 2012).

### 4.2.2. Sinteza dušikovog oksida

NO se sintetizira u endotelnim stanicama krvnih žila pluća na poticaj različitih stimulansa kao što su acetilkolin, bradikinin, stres smicanja prilikom protoka krvi, hormoni, faktori rasta i mnogi drugi. Svi oni vežući se za vlastite membranske receptore na endotelnim stanicama mogu pokrenuti o  $Ca^{2+}$ -ovisni ili o  $Ca^{2+}$ -neovisni put aktivacije endotelne NO-sintaze, koja je odgovorna za sintezu NO. Acetilkolin i bradikinin preko svojih membranskih receptora na endotelnim stanicama dovode do povećanja koncentracije  $Ca^{2+}$  u stanici i posljedično do povećanja aktivnosti  $Ca^{2+}$ -kalmodulin kompleksa. On će u izravnoj interakciji sa kalmodulin-vezujućom domenom eNO-sintaze dovesti do njene aktivacije i povećanja produkcije NO. eNO-sintaza može biti aktivirana i neovisno o koncentraciji  $Ca^{2+}$  u citoplazmi endotelnih stanica i to tako da se fosforilira djelovanjem protein kinaza. Mehanički podražaji u krvnim žilama koje registriraju mehanoreceptori na endotelnim stanicama vrlo su važan stimulus za povećanje produkcije NO. Aktivacijom tih mehanoreceptora dolazi do aktivacije protein kinaze A (PKA) i serin-treonin protein kinaze Akt (poznata i kao protein kinaza B, PKB) koja

će fosforilirati i povećati aktivnost eNO- sintaze i tako povećati produkciju NO (Rang i sur., 2016).

NO nastaje u oksidoredukcijskoj reakciji u kojoj dolazi do prijenosa elektrona s molekulskog kisika koji je donor, preko niza kofaktora koji uključuju nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>), flavin adenin dinukleotid (FAD), flavin mononukleotid (FMN), kalmodulin i protoporfirin IX, do amino skupine L-arginina. Kao produkti te reakcije nastaju NO i H<sub>2</sub>O, dok se L-arginin prevodi u L-citrulin. Ta je reakcija katalizirana skupinom enzima nazvanih dušik oksid sintaze (NOS). Do sada su poznate tri izoforme ovog enzima nNOS i eNOS koje su konstitutivno eksprimirane u neuronima i endotelnim stanicama, te iNOS koja se pojačano eksprimira u upalnim procesima. Za plućnu arterijsku hipertenziju ključna je endotelna NO-sintaza (eNOS) koja je konstitutivno eksprimirana u endotelnim stanicama plućnih krvnih žila. Ti se enzimi sintetiziraju u obliku monomera, a da bi postali funkcionalni moraju formirati dimer kako bi mogli vezati kofaktor BH<sub>4</sub> i supstrat L-arginin, te producirati NO i citrulin kao konačne produkte. U slučaju neuspješne dimerizacije, monomeri će producirati peroksidne ione O<sup>2-</sup> umjesto NO te će tako doprinijeti oksidacijskom stresu u endotelnim stanicama i disfunkciji endotela (Zhao i sur., 2015).

#### 4.2.3. Unutarstanični mehanizam i djelovanje

Dušikov oksid je potentni vazoregulator koji se otpušta iz endotelnih stanica i difundira do glatkih mišićnih stanica u koje kao nepolarna plinovita molekula ulazi slobodnom difuzijom kroz membranu. U citoplazmi se veže i aktivira enzim topljivu gvanilat ciklazu (sGC) koja onda pojačano producira sekundarni glasnik cGMP iz GTP-a. sGC citosolni je enzim prisutan u glatkim mišićnim stanicama krvnih žila koji se sastoji od dviju podjedinica, veće  $\alpha$  podjedinice i manje  $\beta$  podjedinice. Postoje dvije izoforme  $\alpha$  podjedinica i dvije izoforme  $\beta$  podjedinica, međutim za vazodilataciju je najvažniji enzim s  $\alpha 1\beta 1$  kombinacijom podjedinica. Obje podjedinice sadrže karbonilne katalitičke domene koje zajedno formiraju katalitički aktivno središte enzima. Podjedinica  $\beta$  sadrži amino-terminalnu domenu koja veže prostetsku skupinu hem koja sadrži željezo. Željezo u sastavu hema može postojati u oksidiranom i reduciranom obliku, te u fiziološkim uvjetima postoji ravnoteža ta dva oksidacijska stanja željeza koja ustvari utječu na aktivnost enzima i na njegovu osjetljivost prema NO kao aktivatoru. U inaktivnom stanju enzima željezo je u stanju Fe<sup>2+</sup> i ono ima veliki afinitet za vezanje NO koji izaziva konformacijsku promjenu katalitičke podjedinice i višestruko

povećava katalitičku aktivnost enzima, te pojačava produkciju sekundarnog glasnika cGMP-a. Primijećeno je da kod pacijenata koji boluju od PAHa kao posljedica oksidativnog stresa dolazi do poremećaja ravnoteže oksidiranog i reduciranog željeza u strukturi hema, te je ono u tom slučaju pretežito u oksidiranom  $\text{Fe}^{3+}$  obliku, a aktivnost enzima je narušena. sGC čiji je hem u takvom obliku neosjetljiv je prema NO, a osim toga hem s oksidiranim željezom vrlo brzo disocira s proteina zbog čega se sama proteinska struktura izlaže ubikvitinaciji i proteolitičkoj razgradnji (Klinger i Kadowitz 2017; Zhao i sur., 2015; Klinger, 2007).

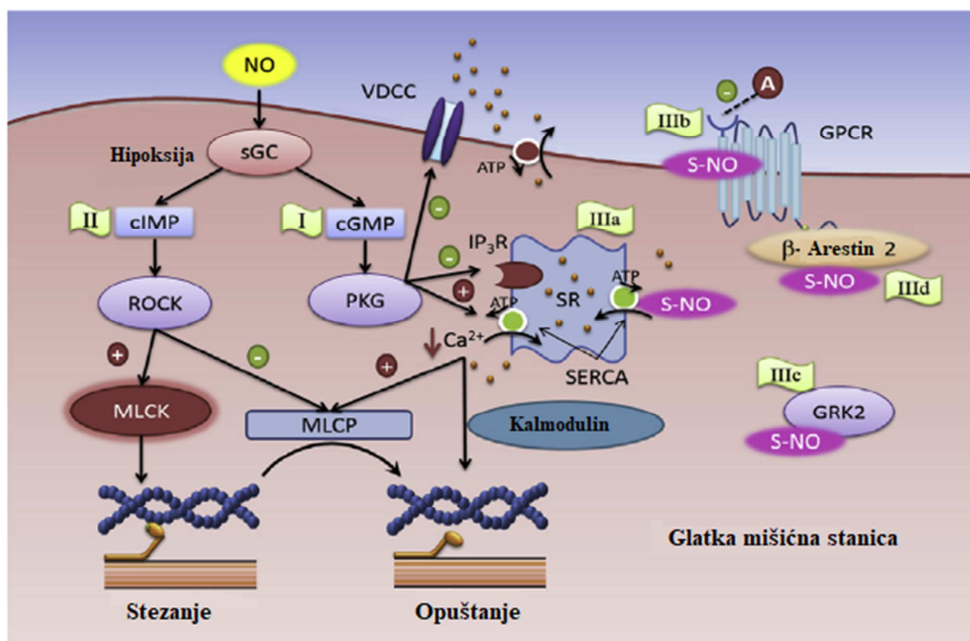
cGMP djeluje kao sekundarni glasnik koji aktivira svoje proteinske mete u stanici. Najznačajnije su protein kinaza G (PKG) koja fosforilacijom ciljnih proteina dovodi do vazodilatacije, te do inhibicije proliferacije i migracije glatkih mišićnih stanica. Osim nje, tu su još i membranski kationski kanali čiju aktivnost regulira upravo cGMP i fosfodiesteraze cikličkih nukleotida (PDE) koje degradacijom reguliraju koncentraciju cGMP-a u stanicama (Klinger i Kadowitz 2017; Zhao i sur., 2015; Klinger, 2007).

Protein kinaza G (PKG) svojim fosforilacijskim djelovanjem inhibira receptorski aktivirane kalcijске kanale na membranama stanica i sprječava ulazak ekstracelularnog kalcija. Ona također inhibira IP3 receptore na sarkoplazmatskom retikulumu tako sprječavajući oslobađanje intracelularnih rezervi kalcija. Osim toga, fosforilacijom aktivira o  $\text{Ca}^{2+}$  ovisne kalijeve kanale koji omogućuju izlazak  $\text{K}^+$  i hiperpolarizaciju stanice koja onda dovodi do zatvaranja o naponu ovisnih  $\text{Ca}^{2+}$ - kanala (VDCC). Konačno potiče ponovnu pohranu  $\text{Ca}^{2+}$  u sarkoplazmatski retikulum, preko aktivacije Ca-ATPaze smještene na membrani sarkoplazmatskog retikuluma. Svi ti događaji u stanici dovode do smanjenja koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ , a onda i do smanjenja osjetljivost mikrofilamenata prema tim ionima. Djelovanjem PKG fosforilira se regulatorna podjedinica enzima miozin fosfataze kratkog lanca čime se on aktivira te posljedično defosforilira miozinske lance i dovodi do relaksacije blokirajući interakciju miozina i aktina. S druge strane, zbog smanjenja koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  inaktivira se kalmodulin i zaustavlja se aktivnost miozin kinaze kratkog lanca te ne može doći do fosforilacije miozina i njegove interakcije s aktinom. Vazodilataciji doprinosi i blokada vazokonstrikcije pokrenute od strane endotelina-1, a koja se ostvaruje preko inhibicije puta RhoA/Rho- kinaze, tako što PKG fosforilacijom inhibira RhoA i njezinu translokaciju na membranu. U glatkim mišićnim stanicama nalazi se još jedan enzim koji je važan za regulaciju koncentracije cGMP u stanici, a to je fosfodiesteraza 5 (PDE5) koja hidrolizira cGMP i tako ograničava njegovu koncentraciju u stanici (Klinger i Kadowitz 2017; Zhao i sur., 2015; Klinger, 2007).

NO svoje učinke osim na prethodno opisan način preko aktivacije topljive sGC ostvaruje i tako da u prisutnosti elektron-akceptora stupa u kemijske reakcije S-nitrozilacije. On naime reagira s cisteinskim tiolnim skupinama na proteinima te ih tako kovalentno modificira i utječe na njihovu funkciju. Upravo S-nitrozilacijom NO pojačava aktivnost Ca-ATP-aze na sarkoplazmatskom retikulumu, koja onda pojačano uklanja  $Ca^{2+}$  iz citoplazme i tako doprinosi vazodilataciji.

Osim vazodilatacijskog, NO također ima antiproliferativni i proapoptozni učinak na endotelnim stanicama i glatkim mišićnim stanicama krvnih žila pluća tako sprječavajući patološko remodeliranje krvnih žila. Mehanizam kojim NO inhibira proliferaciju nije u potpunosti poznat, ali većina studija govori u prilog tome da se taj učinak ostvaruje posredstvom cGMP-u i PKG, koja fosforilacijom inhibira MAPK, ključni enzim u signalnom putu aktivacije proliferacije. Druga istraživanja pak govore u prilog tome da NO ostvaruje antiproliferativno djelovanje mehanizmom neovisnim o cGMP-u jer se pokazalo da NO mijenja ekspresiju i aktivnost proteina uključenih u regulaciju staničnog ciklusa (Klinger i Kadowitz 2017; Zhao i sur., 2015; Klinger, 2007).

Signalni putovi koji su regulirani unutar stanice s NO prikazani su na slici 6.



Slika 6. Unutarstanični signalni put dušikovog oksida (preuzeto i prilagođeno prema Zhao i sur., 2015) NO – dušikov oksid, sGC – topljiva gvanilat ciklaza, cIMP – ciklički inozim monofosfat, cGMP – ciklički gvanozin monofosfat, ROCK – Rho povezana protein kinaza, PKG – protein kinaza G, MLCK – miozin kinaza kratkog lanca, MLCP – miozin fosfataza kratkog lanca, VDCC – Ca<sup>2+</sup> kanali ovisni o naponu, SR-sarkoplazmatski retikulum, SERCA – kalcijaska ATPaza sarkoplazmatskog retikuluma, GPCR – receptori povezani s G- proteinima, GRK2 – receptorska protein kinaza povezana sa G –proteinom

#### 4.2.4. Uloga u patobiologiji PAH-a

Disfunkcija puta NO jedna je od temeljnih promjena koja se događa na početku razvoja PAH-a. Manjak NO dovodi do pretjerane vazokonstrikcije i remodeliranja krvnih žila. Poremećaj ovoga puta može se dogoditi na više razina, a to uključuje nedostatak prekursorske aminokiseline L-arginina, smanjenu ekspresiju ili aktivnost eNO-sintaze i oksidacijski stres u endotelnim stanicama. Manjak L-arginina najčešće je posljedica pojačane aktivnosti arginaze u plazmi, enzima koji se s endotelnom NO-sintazom natječe za supstrat L-arginin. Smanjenje aktivnosti eNOS velikim je dijelom posljedica inhibicije posredovane asimetričnim dimetilargininom (ADMA), glavnim endogenim inhibitorom ovog enzima čije su koncentracije u plazmi oboljelih povišene.

Osim toga, poremećaj puta NO može se dogoditi i zbog smanjene aktivnosti efektorskih enzima u glatkim mišićnim stanicama, sGC i PKG. Zbog toga će se smanjeno producirati sekundarni glasnik cGMP ili će imati smanjeni učinak. Moguća je i pretjerana aktivnost fosfodiesteraze 5 (PDE5) koja će pretjerano razgrađivati cGMP. Kod pacijenata koji boluju od plućne hipertenzije zabilježen je pojačan oksidativni stres u krvnim žilama. On je posljedica pojačane produkcije reaktivnih kisikovih spojeva zbog pretjerane aktivnosti NADPH oksidaze ili pak disfunkcije mitohondrija. ROS koji nastaju oksidiraju tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>), kofaktor eNOS zbog čega ona umjesto NO stvara superoksidge. Oksidativni stres dovodi također i do inaktivacije sGC koja postaje neosjetljiva na NO (Yuansheng i sur., 2016).

#### 4.2.5. Lijekovi koji djeluju na put dušikovog oksida

Zbog važnosti NO kao vazodilatatora, te njegovog antiproliferativnog djelovanja, aktivacija NO puta je vrlo važan terapijski pristup u terapiji PAH.

Prvi je pristup bio nadomiještanje nedostatka NO. Ono se može ostvariti primjenom lijekova koji su donori NO, kao što su nitroglicerina, Na-nitroprusid i neki drugi oralni nitrati ili inhalacijom plinovitog NO. Liječenje korištenjem oralnih donora NO pokazalo se neuspješnim prvenstveno zbog slabe selektivnosti ovih lijekova prema krvnim žilama u plućnoj vaskulaturi. Naime, doze koje su potrebne za ostvarenje zadovoljavajućeg smanjenja tlaka u plućnim krvnim žilama dovode do jake sistemske vazodilatacije i hipotenzije koja je neprihvatljiva. Inhalacijski NO ima brojne povoljne karakteristike kao što su lipofilnost i sposobnost brze difuzije kroz alveolarni epitel do prekapilarnih pulmonarnih arterija na koje djeluje. Ima veliki afinitet vezanja za željezo u sastavu hema čime se inaktivira, što znači da će se inaktivirati čim dospije u krvotok te neće moći ostvariti sistemski učinak vazodilatacije. Vazodilatacijski učinak inhalacijskog NO je brz i kratkotrajan zbog kratkotrajnog poluvremena života u plazmi. Inhalacijski NO prva je linija liječenja pulmonarne hipertenzije u novorođenčadi koja se primjenjuje u jedinicama intenzivne njege. Klinička ispitivanja pokazala su da je akutni vazodilatatorni odgovor na inhalacijski NO približno jednak odgovoru na terapiju prostaciklinima i blokatorima kalcijevih kanala. Prednost inhalacijskog NO je ta da nema sistemske hipotenzije i smanjenja oksigenacije krvi (Klinger, 2007).

Zbog navedenih ograničenja terapije nadomiještanjem NO razvijeni su lijekovi koji djeluju na niže mete u tom putu. Kao učinkovita skupina lijekova pokazali su se inhibitori fosfodiesteraze-5 u koju spadaju sildenafil i tadalafil. Oni inhibiraju razgradnju sekundarnog glasnika cGMP-a, međutim njihov nedostatak je taj što im učinkovitost ovisi o razini NO. Naime, oni su učinkoviti samo ako je put NO i dalje aktivan, što znači da nastaju dovoljne količine cGMP-a. Zbog toga se javila potreba za novim pristupom koji će omogućiti održavanje aktivnosti puta NO čak i onda kada je razina NO jako niska. To se postiže aktivacijom enzima topljive gvanilat ciklaze koja stvara sekundarni glasnik cGMP. Do sada jedini odobreni lijek s takvim mehanizmom djelovanja je riociguat. Obje ove skupine lijekova dovode do povećanja koncentracije cGMP-a u glatkim mišićnim stanicama krvnih žila, koji onda posreduje vazodilataciju kao i inhibiciju proliferacije i fibroze krvnih žila (Klinger, 2007).

#### 4.2.6. Inhibitori fosfodiesteraze 5

Enzim fosfodiesteraza 5 dio je porodice enzima fosfodiesteraza koju čini 11 izoenzima. Radi se o enzimu koji je značajno eksprimiran u glatkim mišićnim stanicama krvnih žila pluća gdje katalizira hidrolizu cGMP-a. Zbog njegove povećane ekspresije i aktivnosti razgradnje cGMP-a, zajedno sa smanjenom bioraspoloživošću NO, javlja se vazokonstrikcija kao i pojačana proliferacija i otpornost prema apoptozi glatkih mišićnih stanica. Iz tog razloga terapija PAH je usmjerena na smanjenje aktivnosti upravo tog izoenzima.

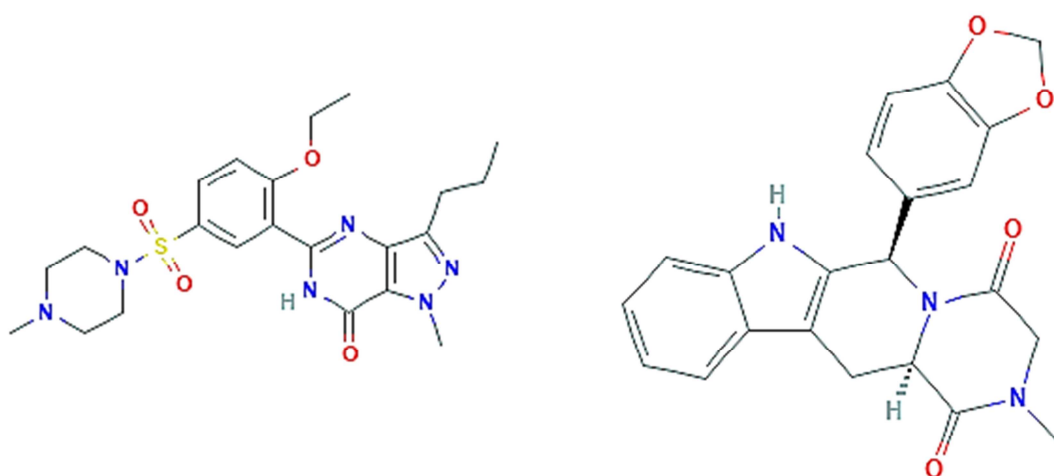
Lijekovi sildenafil i tadalafil (Slika 7), inhibiraju enzim PDE5 i tako smanjuju degradaciju cGMP-a pa se njegova koncentracija povećava, odnosno učinak mu se prolongira. To rezultira pojačanom aktivnošću PKG i vazodilatacijom, ali i antiproliferativnim učinkom. Oba lijeka su kompetitivni inhibitori PDE5, koji se vežu za njenu katalitičku podjedinicu te tako priječe vezanje supstrata cGMP-a i njegovu hidrolizu.

In vitro ispitivanjima za oba je lijeka utvrđeno da selektivno inhibiraju PDE5, izoformu koja je dominantno eksprimirana u krvnim žilama pluća, dok prema ostalim izoformama enzima fosfodiesteraze imaju znatno manji afinitet. Upravo zbog toga ovi lijekovi dovode do vazodilatacije plućnih arterija, a da pritom samo blago i prolazno smanjuju sistemski krvni tlak, bez izazivanja kliničkih učinaka. Važno je da ovi lijekovi imaju znatno manji afinitet prema PDE6 koji je odgovoran za fototransdukciju u mrežnici oka. Selektivnost prema PDE5 u odnosu na PDE6 je 10 puta veća kod sildenafil, te čak 700 puta veća kod tadalafila. Iz tog razloga se kod sildenafil javljaju vidni poremećaji, a kod tadalafila su oni puno rjeđi. Jednako je tako važno da ovi lijekovi imaju puno manji afinitet prema PDE3 izoformi enzima koja je odgovorna za razgradnju cAMP, sekundarnog glanika u miocitima koji je ključan u kontroli kontraktilnosti miokarda. Sildenafil je oko 4000 puta selektivniji prema PDE5 u odnosu na PDE3 izoformu, a tadalafil čak više od 10000 puta. Iz tog razloga ni jedan ni drugi ne utječu izravno na srčanu funkciju i kontraktilnost ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

Kao najčešće nuspojave uslijed primjene ovih lijekova javljaju se palpitacije, hipotenzija, glavobolja, crvenilo lica te bolovi u mišićima. Zbog pojačanog rizika od sistemske hipotenzije koja može biti potencijalno fatalna kontraindicirana je istodobna primjena više lijekova koji djeluju na put NO. Tako je primjena inhibitora PDE5 kontraindicirana u kombinaciji s donorima NO i sa stimulatorom gvanilat ciklaze, riocigvatom. Iz istog razloga potreban je oprez u slučaju istovremene primjene s alfa-blokatorima koji se koriste kao antihipertenzivi.

Inhibitori PDE5 povećavaju rizik od krvarenja kada se primjenjuju u kombinaciji s antikoagulansima i antiagregacijskim lijekovima (Watanabe, 2018.).

Sildenafil i tadalafil indicirani su za liječenje odraslih pacijenata koji boluju od plućne arterijske hipertenzije (PAH) funkcionalnog stupnja II i III prema WHO klasifikaciji, s ciljem poboljšanja tjelesnih sposobnosti. Kod sildenafilu je preporuka primjenjivati dozu od 20 mg tri puta na dan. Tadalafil se zbog duljeg poluvremena eliminacije iz organizma može primjenjivati samo jednom dnevno u dozi od 40 mg.



Slika 7. Strukture sildenafilu i tadalafilu (preuzeto sa [www.pubchem.com](http://www.pubchem.com))

Sildenafil i tadalafil međusobno se razlikuju prema farmakokinetičkim karakteristikama (Tablica 4). S obzirom na farmakokinetički profil sildenafilu, utvrđeno je da nije potrebna prilagodba doze kod pacijenata s oštećenjem bubrega, također nije potrebna korekcija doze niti kod pacijenata s oštećenjem jetre (Child Pugh A i B), dok je primjena kod pacijenata s teškim oštećenjem jetre (Child Pugh C) kontraindicirana. Prilagodba doze tadalafilu potrebna je kod pacijenata s oštećenjima jetre i bubrega, dok je kod pacijenata sa teškim oštećenjem bubrega ili teškim oštećenjem jetre (Child Pugh C) primjena kontraindicirana ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).



Tablica 4. Farmakokinetičke karakteristike inhibitora fosfodiesteraze 5 (www.ema.europa.eu)

|  | Sildenafil                                 | Tadalafil                     |
|--|--|-------------------------------|
| Put primjene                                   | Oralni                                     | Oralni                        |
| Bioraspoloživost                               | 41% (velika varijabilnost – raspon 25-63%) | 36%                           |
| Početak djelovanja/h                           | 0,5-2                                      | 4                             |
| Vežanje za proteine plazme (albumin)           | 96%  | 94%                           |
| Metabolizam                                    | CYP3A4, manje CYP2C9                       | CYP3A4                        |
| Aktivni metabolit                              | +  | -                             |
| Eliminacija                                    | Hepatička (80%), Renalna (13%)             | Hepatička(61%), renalna (36%) |
| Poluvrijeme eliminacije (t <sub>1/2</sub> ) /h | 3-5  | 16                            |

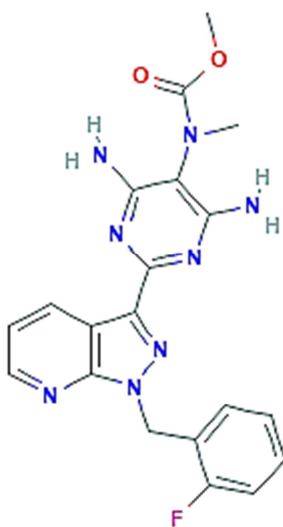
#### 4.2.7. Aktivatori gvanilat ciklaze

Kod pacijenata oboljelih od plućne arterijske hipertenzije smanjena je raspoloživost NO koji je glavni aktivator topljive gvanilat ciklaze. Zbog toga je smanjena produkcija cGMP-a u glatkim mišićnim stanicama, a to je razlog zašto je za velik broj pacijenata terapija inhibitorima PDE5 neučinkovita. Naime, kada je smanjena sinteza cGMP-a, inhibicijom njegove razgradnje neće se uspjeti postići dovoljno visoka koncentracija da bi se postigla vazodilatacija i antimitogeno djelovanje.

Drugačiji pristup aktivaciji puta NO predstavlja izravna aktivacija sGC i indukcija sinteze cGMP-a, neovisno o prisutnosti njenog endogenog aktivatora, NO. Dvije su skupine molekula koje mogu modificirati aktivnost enzima, to su njeni stimulatori i aktivatori. Stimulatori sGC jesu alosterički stimulatori koji povećavaju osjetljivost enzima prema sniženim razinama NO, uz uvjet da je željezo u sastavu hema u reduciranom obliku, odnosno da ima afinitet vezanja liganda. Oni stabiliziraju kompleks NO i hema kako bi održali enzim u njegovoj

aktivnojkonformaciji. Stimulatori mogu djelomično povećati aktivnost sGC u odsustvu NO, međutim oni primarno djeluju sinergistički tako što amplificiraju signalni put endogenog aktivatora. Za sada jedini odobreni lijek koji ima ovakav mehanizam djelovanja je riocigvat (Adempas<sup>®</sup>). Za razliku od stimulatora, aktivatori sGC se vežu za  $\beta$  podjedinicu enzima u vezno mjesto hema koji je disocirao te ga aktiviraju neovisno o prisutnosti NO. Oksidacija željeza i gubitak prostetske skupine hema u aktivnom mjestu sGC zbog čega ona postaje neosjetljiva prema NO kao aktivatoru, najčešće su posljedica oksidacijskog stresa u stanici. Iako je otkriveno nekoliko aktivatora sGC-a, uključujući i cinacigvat, nijedan još nije odobrena, a glavni je razlog neprihvatljiva i potencijalno fatalna hipotenzija koju uzrokuju (Buys i sur., 2018; Lian i sur., 2017; Dupont i sur., 2014; Stasch i Evgenov, 2013).

Riocigvat (Slika 8) je stimulator sGC-a, novi lijek u terapiji PAH koji ima dvostuki način djelovanja. On povećava osjetljivost topljive gvanilat ciklaze na endogeni NO prisutan u manjim količinama tako što stabilizira njihovu međusobnu interakciju, te također izravno stimulira aktivnost sGC neovisno o prisutnosti i koncentraciji NO vežući se na katalitičko vezno mjesto. Indiciran je za liječenje kronične tromboembolijske plućne hipertenzije (KTEPH) i plućne arterijske hipertenzije (PAH) funkcionalnih razreda II i III prema SZO ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).



Slika 8. Struktura riocigvata (preuzeto sa [www.pubchem.com](http://www.pubchem.com))

In vitro studije su pokazale da riocigvat povećava aktivnost sGC 73 puta, dok u sinergiji s endogeno prisutnim NO, ali u manjim koncentracijama povećava aktivnost enzima čak 112 puta. Ispitivanja na animalnim modelima pokazala su da riocigvat učinkovito smanjuje plućnu hipertenziju te zaustavlja hipertrofiju desnog srca i vaskularno remodeliranje. Riocigvat značajno poboljšava pulmonarnu hemodinamiku i kapacitet kretanja (Buys i sur., 2018; Lian i sur., 2017; Dupont i sur., 2014; Stasch i Evgenov, 2013).

Riocigvat je lijek koji ima vrlo visoku oralnu bioraspodivnost od čak 94%, a maksimalnu koncentraciju u plazmi postiže nakon 1-1,5 sati. Visoko je vezan za proteine plazme albumin i  $\alpha$ 1- kiseli glikoprotein, čak 95%. Glavni metabolički put ovog lijeka je N-demetilacija katalizirana enzimima CYP1A1, CYP3A4, CYP3A5 I CYP2J2, a pritom nastaje farmakološki aktivni metabolit koji se zatim glukuronidacijom prevodi u konačni inaktivni metabolit. Enzim CYP1A1, podložan je indukciji djelovanjem policikličkih aromatskih ugljikovodika iz duhanskog dima, što će onda dovesti do pojačanog metabolizma riocigvata i do smanjenja njegove koncentracije u plazmi, pa se stoga preporuča prestanak pušenja kako se ne bi narušila učinkovitost terapije. Riocigvat se iz organizma eliminira kombinirano renalnim (33-45%) i hepatskim putem (48-59%). Kod pacijenata s blagim zatajenjem jetre (Child Pugh A) dolazi do povećanja koncentracije lijeka u plazmi za oko 35% što je unutar vrijednosti normalnih intraindividualnih razlika, dok je kod umjerenog oštećenja jetre (Child Pugh B) uočeno povećanje od 51% zbog čega je kod takvih pacijenata nužna korekcija doze. S obzirom da ne postoje ispitivanja koja uključuju pacijente koji imaju teško oštećenje jetre (Child Pugh C), primjena riocigvata kod te skupine pacijenata je kontraindicirana. Kod pacijenata s oštećenjem bubrežne funkcije također je uočeno povećanje koncentracije lijeka u plazmi te oni zbog toga imaju veći rizik pojave hipotenzije, stoga je kod njih potrebna korekcija doze ovisno o funkciji bubrega ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

Riocigvat stupa u brojne farmakodinamičke i farmakokinetičke interakcije s drugim lijekovima koji se s njime koriste u politerapiji. Ulazi u značajne interakcije s ostalim lijekovima koji djeluju na put NO, dakle sa nitratima i sa inhibitorima PDE5. U slučaju zajedničke primjene dolazi do aditivnog učinka u smanjenju sistemskog krvnog tlaka pa se povećava rizik od hipotenzije, te su stoga ovakve kombinacije lijekova kontraindicirane. Kao i ostali lijekovi za liječenje plućne arterijske hipertenzije i riocigvat ima teratogeni učinak zbog čega je trudnoća kontraindicirana, te je stoga potrebno primjeniti odgovarajuće mjere kontracepcije za vrijeme terapije (Buys i sur., 2018; Lian i sur., 2017; Dupont i sur., 2014; Stasch i Evgenov, 2013; [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

### 4.3. Prostaciklinski put

Još jedan važni signalni put u patogenezi plućne arterijske hipertenzije svakako je put prostaglandina I<sub>2</sub>. Prostaglandin I<sub>2</sub> ili prostaciklin vrlo je važna molekula u plućnoj cirkulaciji koja djeluje vazodilatatorno i antiproliferativno na stanice u stijenci krvnih žila, a osim toga ima i antitrombotski i imunomodulacijski učinak.

#### 4.3.1. Prostanoidi

Prostaciklin spada u skupinu signalnih molekula skupnog naziva prostanoidi koji se sintetiziraju u endotelnim stanicama krvnih žila iz arahidonske masne kiseline. Postoje dvije skupine prostanoidnih molekula koje suprotno djeluju na tonus krvnih žila, ali i na proliferaciju glatkih mišićnih stanica. Prva skupina su prostaglandini u koje spadaju prostaglandin D<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>, prostaglandin F<sub>2a</sub> i prethodno spomenuti prostaglandin I<sub>2</sub> (prostaciklin). Oni djeluju vazodilatacijski i inhibiraju nekontroliranu proliferaciju. Druga skupina su tromboksani od kojih je najznačajniji tromboksan A<sub>2</sub> koji djeluje vazokonstriktorno i mitogeno. Endogeni prostanoidi svoje učinke ostvaruju preko odgovarajućih membranskih receptora. Receptori smješteni na glatkim mišićnim stanicama na koje prostanoidne molekule djeluju mogu se podijeliti na relaksacijske receptore u koje spadaju IP, DP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub> i EP<sub>4</sub>, te vazokonstriktorske EP<sub>1</sub>, EP<sub>3</sub>, FP i TP. Oni se međusobno razlikuju po tipu G-proteina koji je receptoru pridružen i signalnim putovima koji se u stanicama pokreću. Za plućnu vaskulaturu najvažniji su prostaciklin i tromboksan A<sub>2</sub>, a ključni prostanoidni receptori preko kojih oni ostvaruju svoje učinke jesu IP, EP<sub>3</sub> i TP (Lang i Gaine 2015).

Arahidonska kiselina koja je prekursorska molekula svih prostanoida izdvaja se djelovanjem fosfolipaze A<sub>2</sub> iz membranskih fosfolipida u čijim se strukturama nalazi. Oslobođena arahidonska kiselina se zatim prevodi u prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) djelovanjem Prostaglandin G/H sintaze (PTGS) ili ciklooksigenaze koja ima ciklooksigenaznu i peroksidaznu aktivnost. Prostaglandin H<sub>2</sub>, zajednički je prekursor svih prostanoida, a prostaciklin iz njega nastaje djelovanjem enzima prostaglandin I sintaze (Pluchart i sur., 2017).

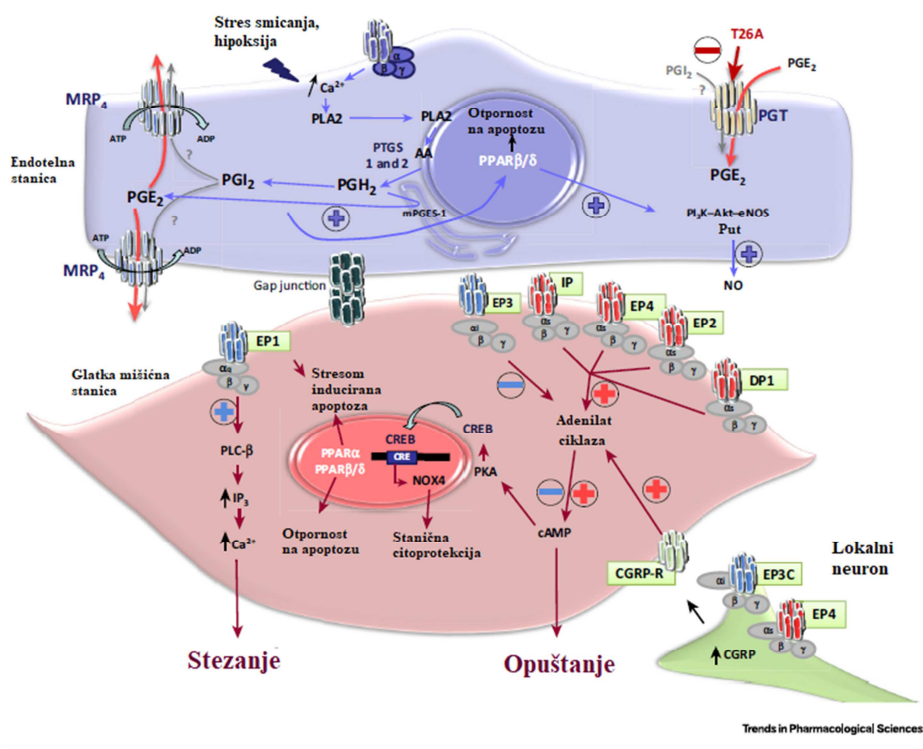
#### 4.3.2. Djelovanje prostanoida

Prostaciklin (prostaglandin I<sub>2</sub>) je najvažniji prostanoid s vazodilatacijskim djelovanjem kojeg sintetiziraju endotelne i glatke mišićne stanice plućnih krvnih žila. Osim vazodilatacije, prostaciklin također inhibira agregaciju trombocita, a djeluje i arteroprotektivno tako što inhibira adheziju upalnih stanica na stijenku krvnih žila. Na glatke mišićne stanice djeluje preko membranskih prostaciklinskih IP- receptora, koji su jedini funkcionalni relaksacijski prostanoidni receptori u pulmonarnim krvnim žilama, a osim toga djeluje i preko nuklearnog PPAR receptora. Uočeno je da je kod oboljelih od PAH smanjena ekspresija gena za enzim odgovoran za sintezu prostaciklina, PGI<sub>2</sub> – sintaze, a sukladno tome smanjena je i razina endogenog prostaciklina (Lang i Gaine 2015).

Vežanjem prostaciklina na IP- receptor (Slika 9), koji je glavni prostanoidni receptor u arterijama pluća, dolazi do konformacijske promjene receptora i aktivacije pridruženog Gs- proteina koji onda aktivira adenilat ciklazu (AC). Adenilat ciklaza sintetizira cAMP, koji ima funkciju sekundarnog glasnika u signalnom putu, te aktivira protein kinazu A (PKA) koja fosforilacijom ciljnih meta u glatkim mišićnim stanicama izaziva vazodilataciju i inhibira nekontroliranu proliferaciju. S druge strane, glavni prostanoidni receptori u plućnim arterijama koji dovode do vazokonstrikcije jesu TP i EP3. Vežanjem agonista za TP receptor dolazi do konformacijske promjene i aktivacije fosfolipaze C, koja stvaranjem sekundarnih glasnika dovodi do povećanja intracelularne koncentracije Ca<sup>2+</sup> i posljedične vazokonstrikcije. Aktivacijom EP3 receptora kojem je pridružen Gi protein dolazi do vazokonstrikcije zato što se inhibira enzim adenilat ciklaza što onda dovodi do smanjenja koncentracije cAMP, zbog čega se neće aktivirati PKA, dakle učinak je suprotan učinku aktivacije IP receptora (Pluchart i sur., 2017; Lang i Gaine 2015).

Osim preko membranskih receptora, prostaciklin svoje učinke ostvaruje i preko nuklearnih PPAR receptora (Slika 9) koji postoje u tri izoforme, a to su PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  i PPAR $\gamma$ .

Nakon vežanja prostaciklina na taj receptor dolazi do njegove heterodimerizacije s retinoidnim X receptorom (RXR), a zatim taj kompleks regulira ekspresiju brojnih gena. PPAR $\alpha$  receptor važan je za supresiju stresom inducirane apoptoze glatkih mišićnih stanica, dok aktivacija PPAR $\beta/\delta$  receptora u endotelnim stanicama dovodi do vazodilatacije zato što se u tom signalnom putu aktivira eNOSi stvara NO. Ova skupina nuklearnih receptora objašnjava vazodilatacijski i citoprotektivni učinak endogenog prostaciklina (Pluchart i sur., 2017).



Slika 9. Unutarstanični signalni put prostaciklina (preuzeto i prilagođeno prema Pluchart i sur., 2017)

#### 4.3.3. Lijekovi koji djeluju na prostaciklinski put

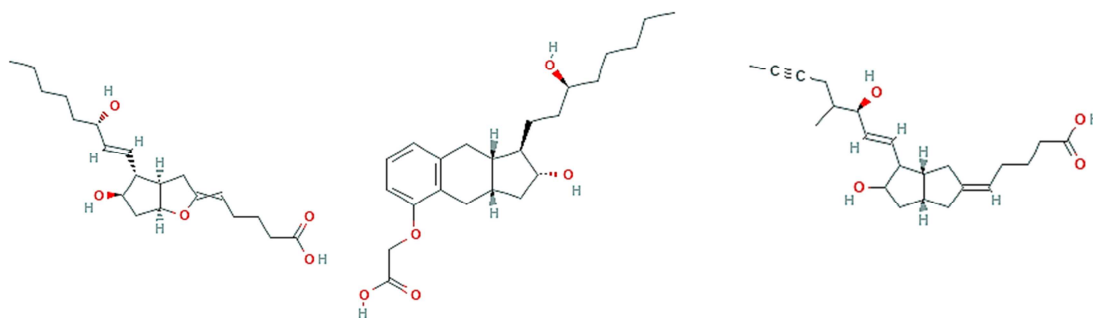
Kod oboljelih od plućne arterijske hipertenzije uočene su snižene razine endogenog prostaciklina u plazmi i smanjena ekspresija PGI<sub>2</sub> sintaze u plućima. Zbog toga što prostaciklin ostvaruje pozitivne učinke na plućnu cirkulaciju, razvijene su dvije skupine lijekova za liječenje PAH koji ciljaju prostaciklinski put, točnije aktiviraju ga. To su sintetski analozi prostaciklina i neprostaciklinski agonisti IP- receptora (Stibon i Morrell, 2012).

#### 4.3.4. Analozi prostaciklina

Prva skupina lijekova s djelovanjem na prostaciklinski put jesu prostaciklinski analozi, koji su i danas zlatni standard u liječenju plućne arterijske hipertenzije. Do sada su odobrena 3 sintetska analoga prostaciklina epoprostenol, iloprost i treprostinil (Slika 10).

Jednako kao i endogeni prostaciklin, analozi prostaciklina djeluju kao agonist IP-receptora, te dovode do aktivacije adenilat ciklaza i do pojačane produkcije cAMP-a. S obzirom na raznoliku rasprostranjenost IP- receptora na membranama različitih stanica oni će imati široki spektar učinaka. Zbog djelovanja na glatke mišićne stanice potentni su vazodilatatori, zatim inhibiraju agregaciju trombocita i formiranja tromba, a osim toga imaju i protuupalno i antiproliferativno djelovanje. Primjena prostaciklinskih analoga smanjuje plućni vaskularni otpor, tlak u desnom atriju, povećava srčani indeks, i produljuje život oboljelima. Njihova primjena omogućuje i očuvanje preostale funkcije endotela preko aktivacije nuklearnih PPAR receptora. Osim aktivacije IP-receptora koji su glavni vazodilatatorni receptori prostaciklina u plućima, sintetski analozi prostaciklina imaju i različite afinitete prema ostalim prostanooidnim receptorima kao što su DP1, EP1, EP2 i EP3. Zbog aktivacije navedenih receptora razlikuju im se farmakološki učinci. Aktivacija tih receptora odgovorna je za pojavu neželjenih učinaka od kojih su najčešći gastrointestinalni (proljevi i povraćanje), živčani (bolovi u zglobovima i ekstremitetima, glavobolje) i vaskularni (glavobolja). Ove su nuspojave česte i mogu se javiti prilikom uvođenja analoga prostaciklina u terapiju, prilikom titracije doze, ali i kod kronične primjene (Lang i Gaine, 2015).

Iz samog mehanizma djelovanja preko IP receptora proizlaze najčešće nuspojave, a to su hipotenzija, sinkopa, krvarenje, tahikardija. Potreban je dodatni oprez kod pacijenata koji zbog komorbiditeta ili lijekova u terapiji već imaju rizike. Iz navedenog proizlazi da je potreban oprez u slučaju istodobne primjene analoga prostaciklina s antihipertenzivima, vazodilatatorima, antikoagulantima i inhibitorima agregacije trombocita. Potencijalno fatalne nuspojave su sepsa i septikemija koje su povezane upravo s parenteralnim načinom primjene ovih lijekova. Unatoč tome što poboljšava preživljavanje pacijenata, ovakvo liječenje ima i svoje nedostatke, a to je prvenstveno primjena intravenskim infuzijama, subkutanim injekcijama i inhalacijski. Epoprostenol i treprostinil primjenjuju se kontinuiranom infuzijom za što se koriste centralni venski kateteri povezani s infuzijskim pumpama. Takav je način primjene lijeka vrlo zahtijevan i nužna je detaljna edukacija pacijenata o rukovanju s ovakvim uređajima kako bi se izbjegle neželjene situacije. Potrebna je edukacija o brizi o samom kateteru, ali i o načinu sterilne rekonstitucije lijeka. To je bitno da bi se spriječile infekcije, ali i da bi se spriječio nagli prekid administracije lijeka koji bi doveo do brzog pogoršanja simptoma bolesti. Također, analozi prostaciklina kratko se zadržavaju u plazmi zbog čega je nužna višestruka primjena u danu (Lang i Gaine, 2015).



Slika 10. Strukture epoprostenola, treprostinila i iloprosta (preuzeto sa [www.pubchem.com](http://www.pubchem.com))

Epoprostenol (Slika 10) je sintetski prostaciklin koji je bio prvi odobreni lijek u terapiji plućne arterijske hipertenzije koji je poboljšao hemodinamske parametre i smanjio simptome. Također je i prvi lijek koji je smanjio mortalitet od ove teške bolesti, a za sada i jedini s takvim dokazima. Indiciran je u terapiji PAH stupnjeva III i IV prema klasifikaciji SZO, a primjenjuje se u obliku kontinuirane intravenske infuzije. Terapija se započinje s dozom od  $2-4 \text{ ngkg}^{-1}\text{min}^{-1}$  nakon čega se titrira do doza u rasponu od  $20\text{ngkg}^{-1}\text{min}^{-1}$  do  $40 \text{ ngkg}^{-1}\text{min}^{-1}$ . Nakon intravenske administracije, epoprostenol se brzo distribuira u tkiva. Njegov veliki nedostatak je nestabilnost, naime poluvrijeme života u plazmi iznosi manje od 5 minuta. Posljedica je to spontanog raspada u plazmi do prostaglandin F1-alfa pri normalnom fiziološkom pH i temperaturi, zbog čega se treba primjenjivati u obliku kontinuirane intravenske infuzije. Zbog visokog pH otopine ovog lijeka potreban je veliki oprez prilikom njegove administracije u krvotok, kako ne bi došlo do ektravazacije u tkivo jer bi to dovelo do oštećenja tkiva (Stibon i Noordegraaf, 2017; [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

Treprostinil (Slika 10) je sintetski analog prostaciklina odobren za terapiju PAH funkcionalne klase III prema SZO, a dovodi do poboljšanja podnošenja tjelesnih napora i smanjenja simptoma. Znatno je kemijski stabilniji od epoprostenola pa zato ima i puno dulje poluvrijeme života u plazmi. U Europi je odobren za primjenu putem kontinuirane intravenske ili subkutane infuzije, a postoje i oblici za oralnu i inhalacijsku primjenu odobreni samo u SAD-u. Prednost se daje subkutanoj primjeni, dok je intravenska primjena rezervirana za osobe koje su intolerantne na takav put primjene. Administracija lijeka provodi se putem centralnog venskog katetera pomoću infuzijske pumpe. Liječenje se započinje sa dozom od  $1,25 \text{ ngkg}^{-1}\text{min}^{-1}$



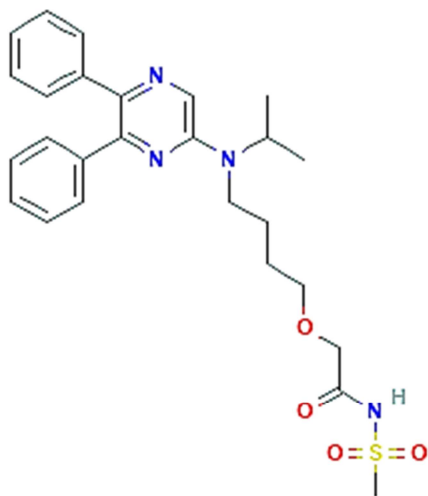
$l\text{min}^{-1}$ , a zatim se povećava do  $20\text{--}80\text{ ngkg}^{-1}\text{min}^{-1}$ . Glavni problem primjene ovog lijeka je bol na mjestu gdje se primjenjuje infuzija ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

Iloprost (Slika 10) je sintetski analog prostaciklina indiciran za liječenje PAH stupnja III prema NYHA klasifikaciji. Registriran je za primjenu inhalacijom korištenjem nebulizatora, dok je u malom broju zemalja registriran za intravensku primjenu. Kod inhalacijske primjene, terapija se započinje sa  $2,5\text{ }\mu\text{g}$  po inhalaciji, pa ako se ta doza dobro podnosi postupno se titrira do doze od  $5\text{ }\mu\text{g}$ . Nakon inhalacije iloprost vrlo brzo ulazi u sistemsku cirkulaciju. Ima kratko poluvrijeme eliminacije iz plazme (20-25 minuta) zato što se  $\beta$ -oksidacijom prevodi u inaktivni metabolit. Zbog toga je potrebna učestala primjena lijeka, čak 6 do 9 puta na dan. Inhalacijska primjena iloprost dovela je do povećane pojave kašlja nepoznatog uzroka ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

#### 4.3.5. Nprostaciklinski agonist IP- receptora - seleksipag

Prethodno opisani analozi prostaciklina unatoč terapijskoj učinkovitosti imaju brojne nedostatke. Oni se povezuju s brojnim neželjenim učincima koji su posljedica neselektivnosti prema IP- receptorima. Problem predstavlja i njihov parenteralni put primjene koji nosi rizike od infekcija i tromboza. Zbog svega navedenog kao nova skupina lijekova pojavili su se selektivni nprostanooidni agonisti IP-receptora namijenjeni za oralnu primjenu. Do sada jedini odobreni lijek s takvim djelovanjem je seleksipag (Slika 11) (Lang i Gaine 2015).

Seleksipag (Slika 11) je selektivni agonist IP- receptora, različit od prostaciklina i njegovih analoga. Radi se o lijeku koji je za sada jedini predstavnik skupine nprostaciklinskih agonista IP- receptora namijenjen za peroralnu primjenu. Indiciran je za dugotrajno liječenje plućne arterijske hipertenzije kod odraslih pacijenata sa stupnjem bolesti II-III prema klasifikaciji SZO. Doziranje je potrebno postupno prilagođavati svakom pacijentu tako da se postigne maksimalna podnošljiva doza.



Slika 11. Struktura seleksipaga (preuzeto sa [www.pubchem.com](http://www.pubchem.com))

Seleksipag je prolijek koji se djelovanjem karboksilesteraza hidrolizira pri čemu nastaje njegov aktivni metabolit koji je približno 37 puta potentniji od samog seleksipaga. Seleksipag i njegov aktivni metabolit su agonisti IP receptora s velikim afinitetom i selektivnošću prema tom tipu receptora u odnosu na druge prostanoide receptore (EP1-EP4, DP, FP i TP). Aktivacijom IP receptora dovodi do vazodilatacije te antiproliferativnih i antifibrinolitičkih učinaka. Na animalnom modelu uočeno je da sprječava remodeliranje srca i pluća, te također uzrokuje proporcionalno smanjenje plućnih i perifernih tlakova.

Farmakokinetika seleksipaga ispitana je na zdravim dobrovoljcima. Utvrđeno je da se seleksipag nakon oralne primjene brzo apsorbira s bioraspoloživošću od 49%. Seleksipag i njegov aktivni metabolit značajno se vežu za proteine plazme, približno 99% i to u jednakoj mjeri za albumin i za alfa-1- kiseli glikoprotein. U jetri i crijevima dolazi do hidrolize seleksipaga djelovanjem karboksilesteraze pri čemu nastaje njegov aktivni metabolit. Oksidativni je metabolizam uglavnom kataliziran enzimom CYP2C8, a manjim dijelom CYP3A4 pri čemu nastaju hidrosilirani i dealkilirani metaboliti. Aktivni metabolit seleksipaga podliježe metabolizmu glukuronidacije djelovanjem enzima UGT1A3 i UGT2B7. Iz organizma se izlučuje u obliku metabolita i to primarno hepatskim putem (93%), a znatno manje renalnim putem (12%)(Lang i Gaine, 2015).

Najčešće nuspojeve koje seleksipag uzrokuje su glavobolja, proljev, mučnina i povraćanje, bol u čeljusti, mialgija, bol u ekstremitetima, artralgijska i crvenilo uz osjećaj vrućine. Također,

često dovodi do anemije i hipertireoze. Ovesu nuspojave povezane sa mehanizmom djelovanja seleksipaga te se češće javljaju tijekom faze povećanja doze lijeka, a obično su prolaze ili se liječe simptomatski. Seleksipag kao i ostali lijekovi za liječenje PAH-a kontraindiciran je u trudnoći zbog štetnog djelovanja na plod. Zbog toga žene reproduktivne dobi moraju koristiti učinkovitu kontracepciju za vrijeme trajanja terapije ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

#### 4.4. Serotonin u plućnoj hipertenziji

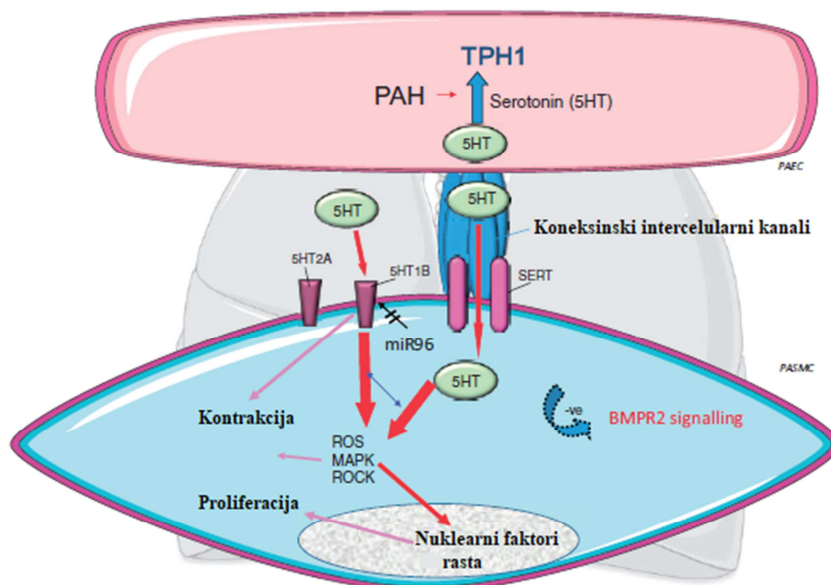
Serotonin (5- hidroksitriptamin) je još jedna od molekula koja sudjeluje u razvoju plućne arterijske hipertenzije potičući vazokonstrikciju i proliferaciju stanica. Kod zdravih osoba prisutna je niska koncentracije slobodnog serotonina u plazmi zbog toga što je on pohranjen unutar trombocita i endotelnih stanica. S druge strane, kod oboljelih od PAH-a koncentracije serotonina u plazmi značajno su povećane. Teorija o povezanosti serotonina i plućne arterijske hipertenzije pojavila se 1960-ih godina kada je uočen povećani rizik razvoja PAH-a kod pacijenata koji su koristili anoreksik aminoreks, a kasnije fenfluramin i klorfenteramin. Anoreksici ulaze u stanice idjeluju kao kompetitivni supstrati serotoninskog transportera (SERT) i tako pojačavaju otpuštanje serotonina iz trombocita, a ujedno inhibiraju njegov unos u trombocite. Na taj način povećavaju ekstracelularnu koncentraciju serotonina (MacLean i Dempsie., 2009).

##### 4.4.1. Sinteza i djelovanje

Serotonin se sintetizira u endotelnim stanicama plućnih arterija iz aminokiseline L-triptofana djelovanjem enzima triptofan hidroksilaze 1 (TPH1) pri čemu nastaje 5-hidroksi-L- triptofan. On se zatim djelovanjem 5-hidroksitriptofandekarboksilaze prevodi u serotonin. Triptofan hidroksilaza-1 je izoforma enzima odgovorna za produkciju serotonina na periferiji. Nakon sinteze u endotelnim stanicama serotonin djeluje primarno parakrino na glatke mišićne stanice. Može djelovati na membranske receptore na glatkim mišićnim stanicama ili pak ući u stanice i toprekomembranskog serotoninskog receptora. Serotonin djeluje tako da promovira

proliferaciju glatkih mišićnih stanica i fibroblasta u krvnim žilama pluća, izaziva vazokonstrikciju i lokalnu mikrotrombozu zbog poticanja agregacije trombocita. Vazokonstriktivni učinak ostvaruje se preko aktivacije membranskih serotoninskih receptora 5-HT1B, 5-HT2A i 5-HT2B, dok je za mitogeni učinak nužna internalizacija serotonina u stanice posredstvom serotoninskog transportera (SERT) (Slika 12). Aktivacija 5-HT2A receptora dovodi do plućne, ali i sistemske vazokonstrikcije, međutim njegov antagonist ketanserin nije specifičan za pulmonarnu cirkulaciju pa zato ne može biti terapijska opcija. 5-HT2B receptor važan je za razvoj hipoksijom inducirane plućne arterijske hipertenzije, ali i za kontrolu koncentracije serotonina u plazmi. Međutim, moguće je da se preko tog receptora ostvaruje i vazodilatacija plućnih arterija, zbog čega njegova inhibicija nije poželjna. Za vazokonstrikciju i razvoj PAH-a najvažniji su ipak 5-HT1B receptori jer se na animalnom modelu pokazalo da se njihovom inhibicijom smanjuje hipoksijom potaknuto vaskularno remodeliranje. Važnost ovog receptora otkrivena je na temelju nuspojava sumatriptana, agonista 5-HT1B receptora koji se koristi u terapiji migrene jer se pokazalo da on značajno utječe na plućni tlak i otpor. Aktivacijom tog tipa receptora pridruženi Gi-protein suprimira aktivnost adenilat ciklaze i tako smanjuje produkciju cAMP-a, zbog čega je suprimirana vazodilatacija. S druge strane, pridruženi Gq protein aktivira fosfolipazu C (PLC) što dovodi do povećanja koncentracije sekundarnog glasnika inozitol-3-fosfata (IP3) i konačno do povećanja koncentracije  $Ca^{2+}$  i vazokonstrikcije (MacLean, 2018; MacLean i Dempsie, 2009; MacLean i sur., 2000).

Serotonin je poznati mitogen koji potiče proliferaciju glatkih mišićnih stanica i fibroblasta u plućnim arterijama što dovodi do zadebljanja medijalnog sloja arterija i suženja njihovog lumena. Proliferaciju će potaknuti nakon internalizacije u glatke mišićne stanice zahvaljujući serotoninskom transporteru čija je ekspresija pojačana. Nakupljanjem u stanicama dovodi do pojačane produkcije reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) zbog aktivacije enzima monoamino oksidaze (MAO-A) koja je odgovorna za razgradnju serotonina. Glavna posljedica nastalog oksidacijskog stresa je fosforilacija i aktivacija MAPK. Aktivacijom MAPK i ROCK signalnih putova dovodi do fosforilacije i translokacije ERK1/2 u jezgru gdje će ona djelovati kao transkripcijski faktor koji će potaknuti ekspresiju faktora rasta i proliferaciju (Slika 12) (MacLean, 2018; MacLean i Dempsie, 2009; MacLean i sur., 2000).



Slika 12. Unutarstanični signalni put serotonina bitan za plućnu arterijsku hipertenziju (preuzeto i prilagođeno prema MacLean,2018)

#### 4.4.2. Serotoninski sustav kao terapijska meta

Zbog važnosti serotonina u razvoju plućne arterijske hipertenzije nameće se potreba za novim lijekovima koji bi inhibirali njegove učinke. Postoji nekoliko potencijalnih meta lijekova, a to su enzim triptofan hidroksilaza (TPH1), 5-HT1B receptor i serotoninski transporter (5-HTT).

##### *Inhibitori triptofan hidroksilaze 1 (TPH1)*

Triptofan hidroksilaza (TPH1) enzim je koji katalizira ključni korak u sintetskom putu serotonina. Ovaj je enzim pojačano eksprimiran u plućnim endotelnim stanicama kod oboljelih od PAH-a kao posljedica kronične hipoksije. Zbog toga se serotonin pojačano producira što doprinosi povećanju njegove koncentracije u plazmi. Sve je više dokaza da farmakološka inhibicija triptofan hidroksilaze može spriječiti progresiju PAH-a. Kod pacijenata koji su liječeni imatinibom primijećene su snižene koncentracije serotonina u plazmi u odnosu na kontrolnu skupinu koja je primala placebo. Ovakav podatak sugerira da imatinib smanjuje ekspresiju TPH1 u endotelnim stanicama preko inhibicije signalnog puta

PDGF $\beta$ . Prilikom razvoja inhibitora TPH1 bitno je postići selektivnost, odnosno spriječiti inhibiciju triptofan hidrosilaze 2 (TPH2), izoforme enzima sustavu odgovorne za produkciju serotonina u mozgu. Do sada su razvijani lijekovi koji su bili neselektivni TPH inhibitori, ali nisu imali sposobnost prolaska krvno-moždane barijere pa tako niti sposobnost inhibicije TPH2. U budućnosti bi trebalo biti moguće razviti TPH1 selektivne inhibitore zbog toga što je otkriveno i okarakterizirano novo alosteričko vezno mjesto TPH1 koje je specifično za tu izoformu enzima (MacLean .,2018; MacLean i Dempsie.,2008).

#### *Inhibitori serotoninskog transportera i antagonisti 5-HT1B receptora*

Serotoninski transporter (SERT) sljedeća je potencijalna meta lijekova. Radi se o monoaminskom transporteru koji aktivno unosi serotonin u stanice, a njegova se aktivnost povezuje s nekontroliranom proliferacijom glatkih mišićnih stanica. Zbog toga bi bilo potrebno farmakološki inhibirati taj transporter. Na taj bi se način smanjio unos serotonina u glatke mišićne stanice, oksidacijski stres i blokirala nekontrolirana proliferacija. Ipak, malo je vjerojatno da bi inhibitori SERT-a bili učinkoviti u liječenju PAH-a s obzirom da zbog povećanja koncentracije serotonina u plazmi dovode do vazokonstrikcije jer serotonin aktivira 5-HT1B receptore na glatkim mišićnim stanicama. Tome u prilog ide i činjenica da se antidepresivi (također inhibitori SERT-a) povezuju s povećanim rizikom od razvoja PAH. Brojne studije pokazuju da je učinak serotonina na proliferaciju i vazokonstrikciju u plućnoj cirkulaciji posljedica sinergizma aktivacije 5-HT1B receptora i unosa serotonina u glatke mišićne stanice posredstvom SERT. Iz tog razloga učinkovitija bi bila kombinacija inhibicije SERT-a i antagonizma 5-HT1B receptora u odnosu na samostalnu inhibiciju SERT-a. Inhibitor SERT-a će spriječiti proliferaciju, a antagonist 5-HT1B receptora blokirati vazokonstrikciju (MacLean .,2018; MacLean i Dempsie.,2008).

#### 4.5. Signalni putovi tirozin kinaza

Važnu ulogu u vaskularnom remodeliranju plućnih krvnih žila imaju različiti faktori rastajaer reguliraju proliferaciju, diferencijaciju, migraciju i preživljavanje stanica. Za faktore rasta PDGF (faktor rasta trombocita), FGF2 (faktor rasta fibroblasta), EGF (epidermalni faktor rasta) i stem cell factor (SCF) pokazalo se da imaju patološku funkciju u PAH. Posljedica je to pojačane ekspresije ili pojačane aktivnosti njihovih membranskih receptora, koja dovodi do

nekontrolirane proliferacije i migracije endotelnih i glatkih mišićnih stanica. Općenito većina faktora rasta svoje učinke na stanice ostvaruje aktivacijom membranskih receptora, nakon čega slijedi pokretanje signalnih putova pri čemu ključnu ulogu imaju tirozin kinaze. Postoje dva tipa tirozin kinaza, to su receptorske i nereceptorske. Receptorske su transmembranski glikoproteini koji imaju funkciju receptora za faktore rasta, a njihova unutarstanična domena ima funkciju tirozin kinaze. Nakon vezanja liganda na transmembransku domenu dolazi do konformacijske promjene receptora i do autofosforilacije tirozinskih ostataka receptora. Osim toga, provodi se fosforilacija i drugih efektorskih nizvodnih molekula, a to su nereceptorske tirozin kinaze koje onda dalje održavaju signalne putove u stanici (Montani i sur., 2014).

#### 4.5.1. Inhibitori tirozin kinaza

Zbog prethodno navedene važnosti tirozin kinaza u razvoju plućne arterijske hipertenzije kao nova terapijska opcija pojavljuju se inhibitori tirozin kinaza. Radi se o lijekovima koji su primarno antitumorski lijekovi, a tu spadaju imatinib, sorafenib i nilotinib. Na životinjskim modelima plućne arterijske hipertenzije ovi su lijekovi pokazali učinak reverzije plućnog vaskularnog remodeliranja, a to je posljedica inhibicije proliferacije i poticanja apoptoze glatkih mišićnih stanica (Montani i sur., 2014).

Imatinib je inhibitor nekoliko tirozin kinaza povezanih sa PAH-om, uključujući BCR-ABL, c-kit i PDGF-receptor. Sorafenib je također inhibitor više tirozin kinaza, uključujući c-kit, VEGF receptor, Raf i neke druge. Nilotinib je inhibitor PDGFR, c-kit i c-Abl, ali s jačim učinkom na c-Abl u odnosu na imatinib. Inhibitori tirozin kinaza su potencijalno inovativna terapija PAH, međutim problem predstavlja njihova sigurnost, odnosno činjenica da se povezuju s kardiotskičnošću. Rizik kardiotskičnosti je veći kod pacijenata s postojećim bolestima srca, pa tako i kod pacijenata oboljelih od PAH-a kod kojih je učestalo zatajenje desnog srca. Na animalnom modelu je pokazano da je u podlozi kardiotskičnosti mitohondrijska toksičnost. Dolazi do smanjenja membranskog potencijala u mitohondrijima i do otpuštanja citokroma c u citosol, s posljedičnom aktivacijom kaspaza 3 i 7 koje aktiviraju apoptozu kardiomiocita (Montani i sur., 2014).

## 4.6. Inhibitori Rho kinaze

Rho kinaza je unutarstanična kinaza koja zajedno sa svojim efektorskim enzimima ROCK1 i ROCK2 sudjeluje u regulaciji različitih staničnih procesa kao što su kontrakcija, proliferacija, diferencijacija i preživljavanje. Ona se aktivira kao dio signalnih putova različitih signalnih molekula kao što su endotelin-1, serotonin, tromboksan A2 i brojni faktori rasta. Posebnu važnost ovaj RhoA/ROCK signalni put ima u regulaciji vazokonstrikcije i vaskularnog remodeliranja plućnih krvnih žila. Kod pacijenata oboljelih od PAH-a utvrđene su povišene razine Rho-kinaza u glatkim mišićnim stanicama krvnih žila pluća pa ona postaje nova potencijalna meta lijekova. Cilj je lijekovima inhibirati RhoA-ROCK signalni put, a to se može postići izravnom i neizravnom inhibicijom ROCK-a. Izravnu inhibiciju postižu frasudil i derivati aminofurazana, dok neizravnu inhibiciju ostvaruju statini (Baliga i sur., 2011).

Fasudil je potentni specifični inhibitor Rho-kinaze (ROCK). U malim plućnim arterijama koje su izložene hipoksiji, frasudil inhibicijom ROCK-a inhibira fosforilaciju miozinskih lanaca i tako dovodi do vazodilatacije. Na animalnim modelima je dokazano da inhibitori ROCK-a smanjuju plućni tlak, plućno vaskularno remodeliranje i hipertrofiju desnog ventrikula. U kliničkim ispitivanjima na ljudima frasudil je bio primjenjivan intravenskim i inhalacijskim putem, te je pokazao brz, ali skroman učinak smanjenja plućnog vaskularnog otpora. Ovaj bi se lijek trebao primjenjivati inhalacijski korištenjem nebulizatora kako bi mogao izravno doći u pluća, a ne u sistemski u krvotok gdje bi zbog nespecifičnosti doveo do sistemske hipotenzije (Montani i sur., 2014).

## 4.7. Potencijalna terapija u razvoju

### 4.7.1. Imunološka terapija

Zbog imunološke podloge PAH u kliničkim se ispitivanjima nalazi nekoliko imunomodulatora kako bi se utvrdila njihova učinkovitost i sigurnost u terapiji. Jedan od imunomodulatora koji je ispitivan je ubenimex koji djeluje kao inhibitor upalnog medijatora leukotrijena B4 koji je u serumu oboljelih pronađen u značajno povišenim koncentracijama. Odustalo se od njegovih daljnjih istraživanja zbog toga što se u drugoj fazi kliničkih ispitivanja pokazao neučinkovitim. Sljedeći lijek u ispitivanjima je rituksimab,



monoklonsko protutijelo usmjereno na CD20<sup>+</sup> receptore na B-limfocitima. Ovaj se lijek još uvijek nalazi u drugoj fazi kliničkih ispitivanja u kojoj sudjeluju pacijenti oboljeli od PAH povezane sa sistemskom sklerozom (Simonneau i sur., 2016.).

#### *Terapija usmjerena na disfunkciju mitohondrija*

Novija istraživanja pokazala su da poremećena funkcija mitohondrija u vaskularnim stanicama ima važnu ulogu u vaskularnom remodeliranju i razvoju PAH. Zbog toga se istražuju molekule koje bi smanjile mitohondrijsku disfunkciju kao potencijalna inovativna terapija. Bardoksolon metil je aktivator Nrf2 transkripcijskog faktora i inhibitor NF-κB signalnog puta. Trenutno se nalazi u trećoj fazi kliničkih ispitivanja (Simonneau i sur., 2016.).

#### *Vazoaktivni intestinalni peptid*

Vazoaktivni intestinalni peptid (VIP) je peptidna molekula koja dovodi do vazodilatacije plućnih krvnih žila i smanjuje učinke vazokonstriktora koji se pojačano stvaraju. VIP svoje učinke ostvaruje tako da se veže za membranske receptore VPAC1 i VPAC2 i dovodi do povećanja stanične koncentracije sekundarnih glasnika cGMP-a i cAMP-a i do vazodilatacije. Važnost VIP-a pokazana je na modelu miša kojem je utišan gen za VIP, jer je to dovelo do značajnog povećanja sistoličkog tlaka u desnom ventrikulu, te do vaskularnog remodeliranja i upale. Kod oboljelih od PAHa uočene su smanjene serumske koncentracije VIPa kao i povećana ekspresija oba tipa njegovih receptora, pa je zato on postao nova potencijalna meta djelovanja lijekova. Aviptadil, sintetski analog VIP-a namijenjen za inhalacijsku primjenu ispitan je kao potencijalna terapija PAHa, međutim dosadašnji rezultati nisu pokazali bolju učinkovitost u odnosu na postojeće lijekove (Montani i sur., 2014.).

## 5. Zaključak

Plućna arterijska hipertenzija rijetka je progresivna bolest plućnih arteriola koja u velikom broju slučajeva završava zatajenjem srca.

U prethodnih nekoliko desetljeća došlo je do velikog napretka u razvoju lijekova koji ciljaju tri najznačajnija signalna puta u endotelnim i glatkim mišićnim stanicama. To su endotelinski, prostaciklinski i put dušikovog oksida koji se povezuju s nastankom progresivne plućne arterijske hipertenzije.

Lijekovi koji djeluju na jedan od ta tri puta kompenziraju endotelnu disfunkciju uzrokujući vazodilataciju plućnih arterija. U kliničkim ispitivanjima pokazalo se da svi oni smanjuju simptome bolesti i usporavaju pogoršanje simptoma, ali ne dovode do izlječenja. Jedini od odobrenih lijekova koji je dokazano smanjio smrtnost je epoprostenol.

Kako bi se unaprijedila postojeća terapija istražuju se novi putovi primjene lijekova, posebice prostaciklinskih analoga koji su se pokazali najučinkovitijima u najtežim stadijima bolesti. Cilj je razviti oblike koji će se primjenivati manje invazivnim načinima od trenutnih intravenskih infuzija.

Ovi se lijekovi mogu koristiti kao monoterapija, ali se često poseže i za njihovim kombinacijama s obzirom da je velik broj pacijenata ne odgovara na monoterapiju. Odabir lijekova koji će se koristiti u terapiji ovisi o stadiju bolesti s obzirom na izraženost simptoma (WHO/NYHA klasifikacija).

Unatoč dostupnoj farmakoterapiji, PAH i dalje ostaje neizlječiva bolest, s visokom smrtnošću oboljelih pa se zato istraživanja novih lijekova trebaju usmjeriti na neke druge signalne putove i molekule.

Cilj nove terapije je zaustaviti vaskularno remodeliranje plućnih arterija, ali i desnog ventrikula. Da bi se to postiglo kao potencijalne farmakološke mete istražuju se različiti faktori rasta i njihovi receptori, upalne molekule itd., a temeljeno na boljem razumijevanju patogeneze bolesti. Brojni lijekovi s djelovanjem na nove farmakološke mete danas su u različitim fazama prekliničkih i kliničkih ispitivanja.

Plućna arterijska hipertenzija i dalje spada u skupinu bolesti za koje ne postoji odgovarajuća terapija (*unmet medical need*) te se stoga nastavlja tragati za lijekovima koji bi omogućili

bolje terapijske ishode, odnosno usporili ili zaustavili progresiju bolesti djelujući na više patofizioloških putova te u konačnici omogućili oboljelima učinkovitiju i sigurniju terapiju te veću kvalitetu života.

## 6. Literatura

Ambrisentan, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/volibris-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/volibris-epar-product-information_hr.pdf) , pristupljeno 29.3.2019.

Aversa M, Porter S, Granton J. Comparative safety and tolerability of endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. *Drug Saf*, 2015, 38, 419-435.

Baliga RS, MacAllister RJ, Hobbs AJ. New perspectives for the treatment of pulmonary hypertension. *Br J Pharm*, 2011,163, 125-140.

Bosentan, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tracleer-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tracleer-epar-product-information_hr.pdf) , pristupljeno 25.3.2019.

Bouallegue A, Daou GB, Srivastava AK. Endothelin-1 induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *CurVasc Pharmacol*, 2007,5,45-52.

Buys ES, Zimmer DP, Chickering J, Graul R, Chien YT, Profy A, Hadcock JR, Masferrer JL, Milne GT. Discovery and development of next generation sGC stimulators with diverse multidimensional pharmacology and broad therapeutic potential. *Nitric Oxide*, 2018, 78, 72-80.

Cassery B, Klinger JR. Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Drug Des*, 2008,2, 265-280.

Clozel M, Maresta A, Humbert M. Endothelin receptor antagonists. *Handb Exp Pharmacol*, 2013, 218, 199-227.

Clozel M. Endothelin research and the discovery of macitentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Regul Integ Comp Physiol*, 2016, 311, 721-726.

Cohen H, Chahine C, Hui A, Mukherji R. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *Am J Health-Syst Pharm*, 2004, 61, 1107-1119.

Correale M, Ferraretti A, Monaco I, Grazioli D, Di Biase M, Brunetti ND. Endothelin-receptor antagonists in the management of pulmonary arterial hypertension: where do we stand?. *Vasc Health and Risk Manag*, 2018, 14, 253-264.

Crosswhite P, Sun Z. Molecular mechanisms of pulmonary arterial remodeling. *Mol Med*, 2014,20, 191-201.

Dupont LL, Glynn C, Bracke KR, Brouckaert P, Brusselle GG. Role of the nitric oxide – soluble guanylyl cyclase pathway in obstructive airway diseases. *Pulm Pharmacol Ther*, 2014, 29, 1-6.

Epoprostenol, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/flolan-article-30-annex-i\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/flolan-article-30-annex-i_en.pdf) , pristupljeno 25.3.2019.

Ghofrani HA, Humbert M, Langleben D, Schermuly R, Stasch JP, Wilkins MR, Klinger JR. Riociguat: Mode of action and clinical development in pulmonary hypertension. *Chest*, 2017,151, 468-480.

Houde M, Desbiens L, Orleans-Juste P. Endothelin-1: Biosynthesis, signaling and vasoreactivity. *Adv Pharmacol*, 2016, 77, 143-175

<https://pulmonaryhypertensionnews.com/pulmonary-hypertension-who-classification/>

Iloprost, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ventavis-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ventavis-epar-product-information_hr.pdf) , pristupljeno 25.3.2019.

Klinger JR, Kadowitz PJ. The nitric oxide pathway in pulmonary vascular disease. *Am J Cardiol*, 2017, 120, 71-79.

Klinger JR, The nitric oxide /cGMP signaling pathway in pulmonary hypertension. *Clin Chest Med*, 2007, 28, 143-167.

Lang IM, Gaine SP. Recent advances in targeting the prostacyclin pathway in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev*, 2015, 24, 630-641.

Lian TY, Jiang X, Jing ZC. Riociguat: a soluble guanylate cyclase stimulator for the treatment of pulmonary hypertension. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11, 1195-1207.

Lima VV, Giachini FR, Hardy DM, Webb RC, Tostes RC. O-GlcNAcylation: a novel pathway contributing to the effects of endothelin in the vasculature. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, 2010, 300, 236-250.

Liu C, Chen J, Deng B, Liu K. Endothelin receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013, 2, CD004434.

Macitentan, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/opsumit-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/opsumit-epar-product-information_hr.pdf) , pristupljeno 29.3.2019.

MacLean MR, Dempsie Y. Pulmonary Hypertension: therapeutic targets within the serotonin system. *Br J Pharmacol*, 2008, 155, 455-462.

MacLean MR, Dempsie Y. Serotonin and pulmonary hypertension – From bench to bedside?. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9, 281-286.

MacLean MR, Herve P, Eddahibi S, Adnot S. 5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol*, 2000, 131, 161-168.

MacLean MR. The serotonin hypothesis in pulmonary hypertension revisited: targets for novel therapies. *Pulmonary circulation*, 2018, 8, 1-9.

- McLaughlin VV,McGoon MD. Pulmonary arterial hypertension. *Circulation*,2006,114,1417-1431.
- Miyagawa K, Emoto N. Current state of endothelin receptor antagonism in pulmonary hypertension. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, 2014,8,202-216.
- Monaco TJ, Davila CD. Safety, efficacy and clinical utility of macitentan in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Dove Press J*,2016,10, 1675-1682.
- Montani D, Chaumais MC, Guignabert C, Günther S,Girerd B, Jaïs X, Algalarrondo, Price LC, Savale L, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension. *Pharmacol Ther*, 2014, 141, 172-191.
- Montani D, Günther S, Dorfmueller P, Perros F Girerd1,2,3, Gilles Garcia B, Jaïs X, Savale L, Artaud-Macari, Price LC, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O. Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J Rare Dis*,2013,8, 97.
- Morell NW i sur. Cellular and Molecular Basis of PAH. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54, 20-31.
- Pluchart H, Khouri C, Blaise Sm Rousiti M, Cracowski JL. Targeting the prostacyclin pathway: Beyond Pulmonary arterial hypertension. *Trends Pharmacol Sci*, 2017,38, 512-523.
- Rang HP i sur. Nitric oxide and related mediators. U: Rang and Dale's Pharmacology. London,Elsevier,2016, str.237-246.
- Riocigvat, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/adempas-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/adempas-epar-product-information_hr.pdf), pristupljeno 5.4.2019.
- Roberts KE, Preston IR. Safety and tolerability of bosentan in the management of pulmonary arterial hypertension.*Drug Des Devel Ther*, 2009,3, 111-118.
- Seleksipag, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/uptravi-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/uptravi-epar-product-information_hr.pdf) , pristupljeno 5.4.2019.
- Sildenafil, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/revatio-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/revatio-epar-product-information_hr.pdf), pristupljeno 4.3.2019.
- Simonneau G, Hoeper MM, McLaughlin, Rubin L, Galiè N. Future perspectives in pulmonary arterial hypertension. *Eur Resp Rev*, 2016, 25, 381-389.
- Stasch JP, Evgenov OV. Soluble guanylate cyclase stimulators in pulmonary hypertension. *Handb Exp Pharmacol*, 2013, 218, 279-313.Steiner MK, Preston IR. Optimizing endothelin receptor antagonist use in the management of pulmonary arterial hypertension. *Vasc Health Risk Manag*, 2008, 5, 943-952.
- Sitbon O, Morrell NW. Pathways in pulmonary arterial hypertension: the future is here. *Eur Respir Rev*,2012, 126, 321-327.

Tadalafil, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/adcirca-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/adcirca-epar-product-information_hr.pdf) , pristupljeno 4.3.2019.

Tomulić V, Vitezić D, Zaputović L. Plućna arterijska hipertenzija – rijetka i teška bolest. *Medix*, 2010, 87/88.

Treprostinil, <http://new.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Remodulin-1-mg-ml-otopina-za-infuziju/13893/> , pristupljeno 25.3.2019.

Watanabe H. Treatment selection in pulmonary arterial hypertension : Phosphodiesterase type 5 inhibitors versus soluble guanylate cyclase stimulator. *Eur Cardiol*,2018,18, 35.

Wilkins MR. Pulmonary hypertension: the science behind the disease spectrum. *Eur Resp Rev*, 2011, 123, 19-26.

Yuansheng G, Tianji C, Raj JU. Endothelial and smooth muscle cell interaction in the pathobiology of pulmonary hypertension. *Am J Respir Cel Mol Biol*, 2016,54, 451-460.

Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SWS. Vascular nitric oxide:Beyond eNOS.*J Pharmacol Sci*,2015, 129,83-94.

## 7. Sažetak/ Summary

Plućna arterijska hipertenzija je progresivna bolest pluća s vrlo velikom smrtnošću koja je posljedica zatajenja srca. Budući da se javlja rijetko u populaciji, spada u skupinu rijetkih bolesti (*orphan diseases*). Zahvaljujući napretku u razumijevanju patobiologije u podlozi ove bolesti razvijeni su brojni lijekovi koji djeluju na jedan od tri ključna signalna puta u glatkim mišićnim stanicama krvnih žila pluća – prostaciklinski, endotelinski i put dušik oksida. Tako su glavne skupine lijekova koji se koriste u terapiji antagonisti endotelinskih receptora, inhibitori fosfodiesteraze 5, stimulator topljive gvanilat ciklaze, sintetski analozi prostaciklina i neprostaciklinski agonisti IP receptora. Svi ovi lijekovi smanjuju endotelnu disfunkciju i dovode do vazodilatacije, ali pritom slabo djeluju na vaskularno remodeliranje. Zbog toga su prvenstveno simptomatska terapija koja blago usporava napredovanje bolesti, što je poticaj daljnim istraživanjima novih terapijskih opcija kako bi usporili ili zaustavili progresiju bolesti djelujući na više patofizioloških putova te u konačnici omogućili oboljelima učinkovitiju i sigurniju terapiju te veću kvalitetu života.

### Summary

Pulmonary arterial hypertension is a progressive lung disease with very high mortality resulting from heart failure. It is a very serious disease that occurs rarely in the population and therefore belongs to the group of *orphan diseases*. Thanks to the progression in understanding the patobiology underlying this disease many new drugs have been developed. Existing approved drugs act on the major signal pathways in smooth muscle cells. Main groups of drugs used in the therapy of pulmonary arterial hypertension are endothelin receptors antagonists, phosphodiesterase 5 inhibitors, stimulators of soluble guanylate cyclase, synthetic analogs of prostacyclin and agonists of IP receptors. All of these drugs reduce endothelial dysfunction and lead to vasodilation, but have little effect on stopping vascular remodeling. Because drugs which have been approved do not cure the disease but only reduce the symptoms further researches continue in order to find new therapeutic options.



## ***Farmakološke mogućnosti u liječenju plućne arterijske hipertenzije***

**Nikolina Škreblin**

SAŽETAK

Plućna arterijska hipertenzija je progresivna bolest pluća s vrlo velikom smrtnošću koja je posljedica zatajenja srca. Budući da se javlja rijetko u populaciji, spada u skupinu rijetkih bolesti (orphan diseases). Zahvaljujući napretku u razumijevanju patobiologije u podlozi ove bolesti razvijeni su brojni lijekovi koji djeluju na jedan od tri ključna signalna puta u glatkim mišićnim stanicama krvnih žila pluća – prostaciklinski, endotelinski i put dušik oksida. Tako su glavne skupine lijekova koji se koriste u terapiji antagonisti endotelinskih receptora, inhibitori fosfodiesteraze 5, stimulator topljive gvanilat ciklaze, sintetski analozi prostaciklina i neprostaciklinski agonisti IP receptora. Svi ovi lijekovi smanjuju endotelnu disfunkciju i dovode do vazodilatacije, ali pritom slabo djeluju na vaskularno remodeliranje. Zbog toga su prvenstveno simptomatska terapija koja blago usporava napredovanje bolesti, što je poticaj daljnim istraživanjima novih terapijskih opcija kako bi usporili ili zaustavili progresiju bolesti djelujući na više patofizioloških putova te u konačnici omogućili oboljelima učinkovitiju i sigurniju terapiju te veću kvalitetu života.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 63 stranice, 15 grafičkih prikaza, 4 tablice i 52 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: plućna arterijska hipertenzija, endotelinski put, put dušikovog oksida, put prostaciklina, antagonisti receptora endotelina, inhibitori fosfodiesteraze 5, agonisti gvanilat ciklaze, analozi prostaciklina.

Mentor: Dr. sc. **Lidija Bach Rojecky**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: Dr. sc. **Lidija Bach Rojecky**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. **Željka Vanić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. **Marijana Zovko Končić**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2019.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmacology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### *Pharmacological Options for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension*

Nikolina Škreblin

#### SUMMARY

Pulmonary arterial hypertension is a progressive lung disease with very high mortality resulting from heart failure. It is a very serious disease that occurs rarely in the population and therefore belongs to the group of orphan diseases. Thanks to the progression in understanding the pathobiology underlying this disease many new drugs have been developed. Existing approved drugs act on the major signal pathways in smooth muscle cells. Main groups of drugs used in the therapy of pulmonary arterial hypertension are endothelin receptors antagonists, phosphodiesterase 5 inhibitors, stimulators of soluble guanylate cyclase, synthetic analogs of prostacyclin and agonists of IP receptors. All of these drugs reduce endothelial dysfunction and lead to vasodilation, but have little effect on stopping vascular remodeling. Because drugs which have been approved do not cure the disease but only reduce the symptoms further researches continue in order to find new therapeutic options.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 63 pages, 15 figures, 4 tables and 53 references. Original is in Croatian language.

Keywords: pulmonary arterial hypertension, endothelin pathway, nitric oxide pathway, serotonin pathway in pulmonary arterial hypertension, prostacyclin pathway, endothelin receptor antagonists, phosphodiesterase 5 inhibitors, guanilat cyclase agonists, prostacyclin analogs

Mentor: **Lidija Bach Rojecky, Ph.D. Associate Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Lidija Bach Rojecky, Ph.D. Associate Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Željka Vanić, Ph.D. Associate Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Marijana Zovko Končić, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June, 2019

