




PULMONER ARTERİYEL HİPERTANSİYON TEDAVİSİNDE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR

CURRENT APPROACHES IN PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION TREATMENT

Cenk YILDIZ¹ , Burcu DEVRİM^{2,*} 

¹Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 58140,
Sivas, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 06560, Ankara,
Türkiye

ÖZ

Amaç: Pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH), yüksek morbidite ve mortaliteye sahip kronik bir hastalıktır. PAH için uygulanan tedavi stratejileri hastaların yaşam kalitesinin iyileşmesini sağlamakla birlikte, hastaların büyük çoğunluğu için PAH, tedavi olasılığı olmayan hayatı sınırlayan bir hastalık olmaya devam etmektedir. Mevcut PAH tedavisinde karşılaşılan en önemli sorunlar hasta uyuncunun düşük olması ve yan etkilerin görülmesidir. Bu derlemede, PAH tedavisinde rhoA/rho kinaz, tirozin kinaz, endotel progenitör hücreleri, vazoaaktif bağırsak peptiti ve miRNA gibi çeşitli yeni moleküler yolakların potansiyeli tartışılmıştır. Ayrıca, tedavide kullanılmak üzere onaylanmış ve inceleme aşamasında olan etkin maddelerin etkinliğini artırmak için hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımına yönelik çeşitli yöntemler değerlendirilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: PAH, pulmoner vasküler direncin artması ve sonunda sağ kalp yetmezliği ve ölümlerle sonuçlanan ilerleyici pulmoner vasküler fonksiyonel ve yapısal değişikliklerle karakterize kronik bir hastalıktır. PAH patofizyolojisinden sorumlu hücresel ve moleküler mekanizmalar hakkındaki bilgilerin artması PAH tedavisinde yeni terapötik yaklaşımların oluşmasını sağlamıştır. Bu yaklaşımlar arasında rhoA/rho kinaz, tirozin kinaz, endotel progenitör hücreleri, vazoaaktif bağırsak peptiti ve miRNA gibi çeşitli yeni moleküler yolakların kullanımı yer almaktadır. Ayrıca, PAH tedavisinde ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı etkin maddelerin lokal olarak etki bölgesine hedeflendirilmesini sağlayarak optimum etkinin elde edilmesi ve yan etki görülme potansiyelinin azaltılması açısından umut verici olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Hedeflendirilmiş tedavi, ilaç taşıyıcı sistemler, pulmoner arteriyel hipertansiyon, tedavi stratejileri

ABSTRACT

Objective: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a chronic disease with high morbidity and mortality.

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Burcu Devrim
e-posta / e-mail: bdevrim@pharmacy.ankara.edu.tr, Tel. / Phone: +903122033162

Although the applied treatment strategies provide an improvement in the quality of life of the patients, PAH continues to be a life-limiting disease for most patients, without the possibility of treatment. The most important problems encountered in the current therapies for PAH are patient incompliance and off-target side effects. In this review, the potential of various new molecular pathways such as rhoA/rho kinase, tyrosine kinase, endothelial progenitor cells, vasoactive intestinal peptide and miRNA are discussed in the treatment of PAH. In addition, various methods for the use of targeted drug delivery systems have been evaluated to improve the efficacy of approved and investigational drugs.

Result and Discussion: PAH is a chronic disease characterized by increased pulmonary vascular resistance and progressive pulmonary vascular functional and structural changes that eventually result in right heart failure and death. Increasing knowledge about the cellular and molecular mechanisms responsible for PAH pathophysiology has led to the emergence of new therapeutic approaches for PAH treatment. These approaches include the use of various new molecular pathways such as rhoA/rho kinase, tyrosine kinase, endothelial progenitor cells, vasoactive intestinal peptide, and miRNA. Furthermore, the use of drug delivery systems in the treatment of PAH has been promising in terms of achieving the optimum effect and reducing the potential for side effects by ensuring that the active substances are targeted locally to the effect area.

Keywords: Drug delivery systems, pulmonary arterial hypertension, targeted therapy, treatment strategies

GİRİŞ

Pulmoner hipertansiyon (PH), pulmoner basıncın progresif yükselmesi ile ilişkili hayatı tehdit eden kardiyopulmoner bir hastalıktır. PH'a neden olan çok sayıda etioloji hastalığın tedavisini ve prognozunu etkilemektedir. Uluslararası standartlar için Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 1973 yılında hastalığın nedenine bağlı olarak PH tanısı için bir sınıflandırma yapmıştır [1]. PH için ilk tanı ve tedavi kılavuzu 1998 yılında yayınlanmıştır. En son güncellenen sınıflama ve kılavuz ise 2015 yılında yayınlanmıştır. Bu kılavuz Türk Kardiyoloji Derneği tarafından dilimize çevrilmiştir.

Birden fazla klinik durumu içerebilecek PH, dinlenme konumunda sağ kalp kateterizasyonu ile değerlendirilen ortalama pulmoner arter basıncında ≥ 25 mmHg'lik artış şeklinde tanımlanan kalp ve damar hastalıklarının ve solunum hastalıklarının çoğunu daha da karmaşık hale getirebilecek hemodinamik ve fizyopatolojik bir durumdur [2].

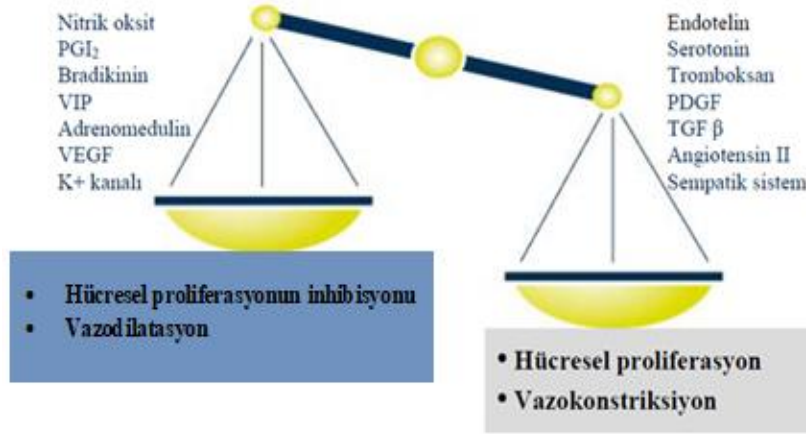
Pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH), PH'nun hızlı ilerleyen ve yaşamı tehdit edici bir alt grubudur [3]. PAH; endotel disfonksiyonu, intima ve düz kas hücre çoğalması ile karakterizedir. Pulmoner vasküler direncin ve basıncın progresif olarak artması sağ ventrikül performansını düşürmekte, sonrasında sağ kalp yetmezliği ve ölüm ile sonuçlanmaktadır.

Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon

Pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH), küçük pulmoner arterlerde pulmoner vasküler yeniden şekillenme, artmış pulmoner arteriyel basınç ve pulmoner vasküler direnç ile karakterize bir hastalıktır [4]. Sağlıklı bireylerde sağ ventrikül kirli kanı oksijenlenmesi için pulmoner arterler aracılığıyla akciğerlere pompalamakta, ancak hastalık geliştiğinde bu damarlarda daralma gerçekleşmektedir. Bunun sonucunda damarlara kan pompalayan sağ ventrikül zorlanmakta ve genişlemektedir. PAH'da

pulmoner vasküler direncin ilerleyici artışı, pulmoner vasküler kompliyansın azalması ve artan pulmoner arter basıncı sağ kalp disfonksiyonu ve ölüm ile sonuçlanmaktadır [5].

Hastalık fizyopatolojik olarak vazodilatör etkili (prostasiklin, nitrik oksit, vazoaaktif intestinal peptit) ve vazokonstriktör etkili (tromboksan A₂, endotelin, serotonin) faktörlerin, büyüme inhibitörlerinin ve mitojenik faktörlerin, antitrombotik ve trombotik faktörlerin arasındaki denge bozukluğundan kaynaklanmaktadır (Şekil 1). Sonuç olarak prostasiklin ve nitrik oksit gibi vazodilatör ajanların üretimi azalırken, endotelin gibi vazokonstriktör ajanların üretimi artmaktadır [6].



Şekil 1. PAH fizyopatolojisinde etkili faktörler

PAH'ın Risk Faktörleri ve Semptomları

PAH etiyolojisinde ilaçlar, toksinler ve enfeksiyonlar rol oynamaktadır. PAH için risk faktörleri Tablo 1'de verilmiştir [2,7].

Tablo 1. PAH risk faktörleri

İlaç ve toksinler	Demografik ve tıbbi durum	Hastalıklar
1. Kesin <ul style="list-style-type: none"> Aminorex Fenfluramin Dexfenfluramin Toksik kolza yağı Benfluoreks Seçici serotonin geri alım inhibitörleri 	1. Kesin <ul style="list-style-type: none"> Cinsiyet 	1. Kesin <ul style="list-style-type: none"> HIV enfeksiyonu
2. Çok olası <ul style="list-style-type: none"> Amfetaminler L-triptopan Dasatinib Metamfetaminler 	2. Olası <ul style="list-style-type: none"> Gebelik Sistemik hipertansiyon 	2. Çok olası <ul style="list-style-type: none"> Portal hipertansiyon/Karaciğer hastalığı Kollagen vasküler hastalık Kongenital, sistemik-pulmoner-kardiyak şantlar
3. Olası <ul style="list-style-type: none"> Kokain Kemoterapötik ajanlar Sarı kantaron Fenilpropanolamin Amfetamin benzeri ilaçlar İnterferon α ve β 		3. Olası <ul style="list-style-type: none"> Tiroid hastalıkları

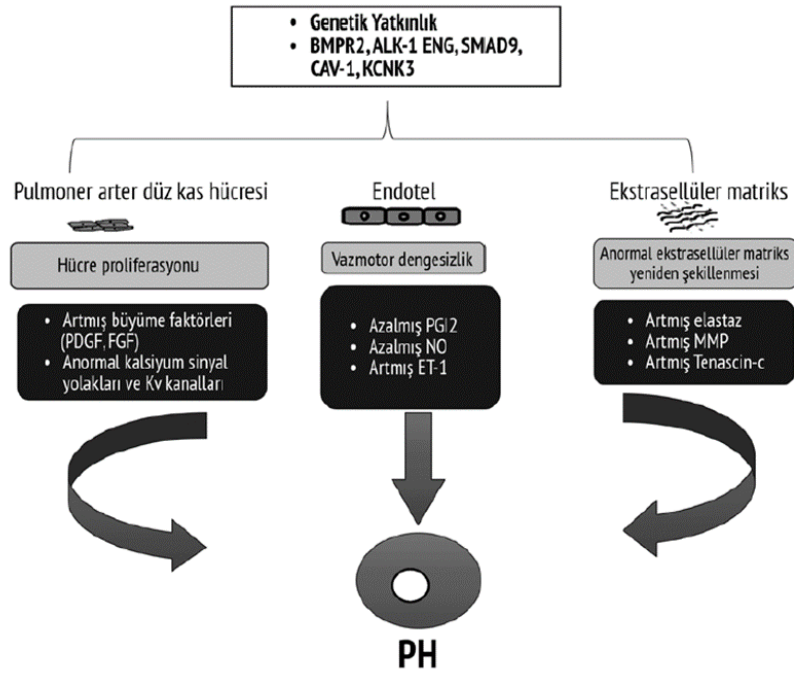
PAH'lı hastalarda oksijen taşınmasındaki kötüleşme ve kalp debisindeki azalmaya bağlı semptomlar görülmektedir [8]. PAH'da erken evrede semptomlar olmadığı gibi, nonspesifik olabilir veya hastalar asemptomatiktir. Bazı durumlarda ise tanı konmadan 2 yıl önce hastalık belirtilerinin başlayabildiği gözlenmiştir [7]. Bu belirtiler dispne, yorgunluk, güçsüzlük, genel egzersiz intoleransı, göğüs ağrısı, senkop ve abdominal distansiyon olarak sayılabilir. Egzersiz dispnesi hastalığın erken döneminde diğer semptomlara göre daha sık görülmektedir [8].

PAH'ın Prevelansı

Ortalama pulmoner arter basıncı ve pulmoner vasküler dirençte artma ile karakterize olan PAH, çoğunlukla genç kadınlarda görülen, geç tanı konan, yavaş ilerleyen ve erken yaşta ölümlü sonuçlanan bir hastalıktır. Kadın erkek oranı 1.7/1.0'dir. Hastalığın görüldüğü yaş sınırı belirgin olmamakla birlikte çoğu olgu 3. ve 4. dekatta görülmektedir [8].

PAH'ın Patofizyolojisi

PAH'ın gelişimi ve ilerlemesi, tek bir patolojik özellik ile açıklanamaz. Patolojik olarak PAH, vasküler yeniden şekillenme ve düz kas hipertrofisine bağlı olarak ortaya çıkabilecek pulmoner arterlerin daralması nedeniyle gelişmektedir. Bu daralma, kalbin pulmoner dolaşıma yeterli kan pompalamasını zorlaştırmaktadır. Bunun sonucu olarak, sağ ventrikül yükünün artmasına, sağ ventrikülün genişlemesine, artmış pulmoner vasküler direnç (PVR) ve dolaşımda oksijen eksikliğine neden olmaktadır.



Şekil 2. Pulmoner hipertansiyon patogenezinde etkili mekanizmalar

PAH ile ilişkili ölümlerin en önemli nedenlerinden biri sağ ventrikül yetmezliğidir [9]. PAH patogeneğinde mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler gibi hastalığın ilerlemesini kolaylaştıran genetik yatkınlıklar ve hipoksi, virüs ve anoreksik ajanlar gibi ileti yollarını etkileyen çevresel faktörler ile tetikleyici ajanlar bulunmaktadır (Şekil 2) [10].

PAH'da Klasik Tedavi Yaklaşımları

PAH tedavisinin temel amacı; hipertansiyonun derecesini azaltarak, olumsuz etkilenen sağ ventrikül fonksiyonlarını ve fonksiyonel kapasiteyi düzeltmek ve böylece hastanın yaşam kalitesini artırmak ve iyi bir prognoz sağlamaktır [7]. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından oral, inhale, subkutan ve intravenöz yollarla verilen onaylanmış tedaviler prostasiklin, endotelin ve nitrik oksit yollarını hedeflemektedir [4]. Tablo 2'de PAH tedavisi için onaylanmış etkin maddeler yer almaktadır [11].

Tablo 2. PAH tedavisi için onay almış etkin maddeler

Prostasiklin yolu	Endotelin yolu	Nitrik oksit yolu
Epoprostenol (iv)	Bosentan (oral)	Sildenafil (oral)
İloprost (inh, iv)	Ambrisentan (oral)	Tadalafil (oral)
Treprostiniil (inh, iv, sc, oral)	Macitentan (oral)	Vardenafil (oral)
Beraprost (oral)		Riociguat (oral)
Selexipag (oral)		

iv:intravenöz, sc:subkutan, inh:inhale

Mevcut tedaviler PAH'lu hastaların yaşam kalitesinin iyileşmesini sağlamakla birlikte bazı eksikliklere sahiptir. Bu eksiklikler aşağıda özetlenmiştir.

- Tedavide kullanılan etkin maddeler çok kısa bir yarılanma ömrüne sahiptir, bu nedenle ilacın invazif yolla (intravenöz ve subkutan) sürekli infüzyon şeklinde uygulanması gerekmektedir.
- İlaçların uzun süreli kullanımını takiben ciddi yan etkilere sebep olan hedefleme (seçicilik) eksikliği vardır.
- Hastalığın ilerlemesini etkili bir şekilde engellemek için iki veya daha fazla yolun hedeflenerek tedavi edilmesi gerekmektedir [6].

Prostasiklin Yolu

Prostasiklin (PGI₂), endotelde ve düz kasta araşidonik asitten türetilen bir prostaglandindir. Trombosit agregasyonunu inhibe eden PGI₂ vazodilatör, anti-enflamatuvar, anti-trombotik ve anti-proliferatif etkilere sahiptir. PAH'da PGI₂ seviyesi ve sentezi azalmakta, bu da hastalıkta görülen vazokonstriksiyon ve trombosit agregasyonuna katkıda bulunmaktadır. PAH'da bu eksikliği gidermek için tedavide prostasiklin analogları kullanılmaktadır [12]. Prostasiklin analogları olarak epoprostenol (Veletri®, Flolan®), iloprost, treprostiniil, beraprost (Dorner®) ve Aralık 2015'de FDA tarafından onaylanan prostaglandin I reseptör agonistlerinden seleksipag (Upravi®) kullanılmaktadır [5]. İloprost

(Ventavis®) ve treprostiniil (Tyvaso®) inhalasyon çözeltisi olarak onaylanmıştır, buna ek olarak treprostiniil (Remodulin®, Orenitram® uzatılmış salım yapan tabletler) için oral tablet olarak da onaylanan preparatlar mevcuttur. Beraprost ise Japonya ve Kore’de kullanım için onaylanmıştır [6]. PAH tedavisinde kullanılan prostasiklin analoglarının bazı kısıtlamaları Tablo 3’te verilmiştir [6].

Tablo 3. Prostatiklin analoglarının kullanımını kısıtlayan faktörler

Epoprostenol	Kısa yarı ömür (3-5 dk) Asidik pH’da stabil değil Oral kullanıma uygun değil
Treprostiniil	İnfüzyon bölgesinde ağrı ve sertlik
İloprost	Yarı ömür 20-25 dk Günlük 6-9 inhalasyon
Beraprost	Eliminasyon yarı ömrü 35-40 dk
Seleksipag	Zayıf çözünmeden dolayı oral biyoyararlanım düşük

PAH’da prostasiklin analoglarıyla tedavide karşılaşılan sorunları ortadan kaldırarak daha etkili bir tedavi sağlamak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Ishihara ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, beraprost sodyum içeren nanopartiküllerin sürekli salım özelliklerini, hedefleme yeteneklerini ve farmakolojik aktivitelerini incelemiştir. Beraprost nanopartikülleri poli(laktik asit) (PLA) homopolimeri ve monometoksi poli(etilen glikol)-PLA blok kopolimerleri kullanılarak su içinde yağ çözücü difüzyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküller; partikül büyüklüğü, yükleme etkinliği, in vitro salım, PAH’lı hayvan modellerinde vasküler geçirgenlik, kanda nanopartiküllerin belirlenmesi ve in vivo ortamda nanopartiküllerin birikimi açısından değerlendirilmiştir. Hasarlı pulmoner arterlerde nanopartiküllerin birikimi floresan özellikteki rodamin S içeren nanopartiküller kullanılarak incelenmiştir. Beraprost yüklü nanopartiküllerin farmakolojik aktivitelerinin incelemesinde monokrotalin ile indüklenmiş PAH sıçan modeli ve hipoksi ile indüklenmiş fare modelleri kullanılmıştır. Beraprost, PLA nanopartiküllerine uygun pH koşullarında ve demir klorür varlığında yüklenmiştir. Beraprostun sürekli salım profillerini ve kanda kalış sürelerini optimize etmek için çeşitli PEG-PLA ve PLA kombinasyonları test edilmiş ve düşük molekül ağırlıklı PLA ile hazırlanan nanopartiküllerde daha hızlı salım profili ve daha hızlı klirens gözlenmiştir. Monokrotalinle indüklenmiş PAH modeli sıçanlara rodamin S nanopartiküllerinin uygulanması sonucu hasarlı pulmoner arterlerde birikim gözlenmiştir ve bu birikimin muhtemelen EPR etkisinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlar intravenöz olarak uygulanan beraprost yüklü nanopartiküllerin PAH hastalarında hasarlı arterlere seçici olarak iletilebileceğini göstermiştir. İntravenöz olarak uygulanan beraprost yüklü nanopartiküllerin farmakolojik etkisi oral yoldan uygulanan beraprost ile karşılaştırılmıştır. Haftada bir kez intravenöz beraprost nanopartiküllerinin uygulamasıyla (20 µg BPS/kg) iyileşme derecesi tek başına beraprostun (100 µg/kg) günlük oral uygulamasıyla elde edilene benzer bulunmuştur. Bu sonuçlar, beraprost nanopartiküllerinin, etkili beraprost dozunun azaltılmasını ve daha az uygulama sıklığının kullanılmasını mümkün kıldığını göstermiştir [13].

Leifer ve arkadaşları, treprostininin ön ilaç formunu lipit nanopartiküllere yükleyerek inhalasyon yoluyla kullanım için bir formülasyon tasarlamışlardır. Treprostininin kısa yarı ömrü nedeniyle oral ve inhalasyon yoluyla çok sık kullanılmasını engellemek ve akciğerler ve plazmadaki yüksek ilaç konsantrasyonundan kaynaklanan bazı yan etkilerin önüne geçebilmek için bu çalışma gerçekleştirilmiştir. Öncelikle treprostininin ön ilaç şekli tasarlanmış ve bu ön ilacın sağlıklı hayvanlardan alınan akciğer dokularında treprostininle dönüşümü incelenmiştir. Daha sonra, treprostinin ön ilacı etanol enjeksiyon yöntemi kullanılarak lipit nanopartiküllere yüklenmiştir. Nanopartiküllerin hazırlanmasında lipit olarak skualen, 1,2-dioleil-sn-glisero-3-fosfokolin (DOPC) ve kolesterol-PEG 2000 kullanılmıştır. Nanopartiküllerin büyüklükleri dinamik ışık saçılımı yöntemi kullanılarak tayin edilmiş, morfolojileri ise geçirimsiz elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir. Yapılan incelemelerde nanopartiküllerin ortalama 100 nm büyüklüğünde olduğu bulunmuştur. Amfifilik DOPC ve Kolesterol-PEG 2000'nin nanopartikül yüzeyinde bulunup stabilizasyonu sağlarken, nanopartiküllerin %80'ini oluşturan treprostinin ön ilacının ve skualenin hidrofobik bir çekirdek oluşturduğu düşünülmektedir. Çalışma kapsamında birçok ön ilaç ve bu ön ilaçları içeren birçok lipit nanopartikül oluşturulmuştur. Hazırlanan nanopartiküller pulmoner vazokonstriktif sıçan modellerinde inhale treprostinin çözeltisi ile karşılaştırılmış ve farmakokinetik verilerin iyileştiği gözlenmiştir. Optimum nanopartikül formülasyonu inhale treprostinin ile karşılaştırıldığında sıçan hipoksisi modelinde pulmoner vazokonstriksiyonda uzatılmış bir vazodilatör etki gözlenmiştir [14].

Jain ve arkadaşları, ilaç verimliliğini artırmak için iloprost için lipozomal nanopartiküller sentezlemişler ve fare intrapulmoner arterleri üzerindeki farmakolojik etkinliğini değerlendirmişlerdir. Lipozomlar ince film hidrasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Lipozomlarda katyonik lipidler, stearylamin veya 1,2-di-(9Z-oktadesenoil)-3-trimetilamonyum-propan (DOTAP) kullanımı iloprost enkapsülasyonunu en az % 50 artırırken, kolesterol ilavesi, iloprost enkapsülasyonunu azaltmıştır. Hazırlanan iloprost lipozomları, insan pulmoner arter düz kas hücrelerinin canlılığını etkilememiştir. Eşdeğer bir serbest iloprost konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında, polimer kaplı lipozomal formülasyonlar fare pulmoner arterlerinde önemli ölçüde artmış vazodilatasyon sergilemiştir. Polimer olarak polietilen glikol kullanılan lipozomlar içinde enkapsüle edilmiş olan iloprost, arterlerde konsantrasyona bağlı gevşeme göstermiştir. Çalışmanın sonuçları katyonik lipozomların iloprostu yüksek etkinlik ile enkapsüle edebildiğini ve terapötik etkinliği iyileştirmek için potansiyel iloprost taşıyıcısı olarak kullanılabilirliklerini düşündürmüştür [15].

Alwan ve arkadaşları, absorpsiyon için hız sınırlayıcı bir adım olarak kabul edilen zayıf çözünürlük nedeniyle düşük oral biyoyararlanıma sahip seleksipag ile bir çalışma yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada seleksipagın çözünürlüğünü ve çözünme hızını artırmak amacıyla sert jelatin kapsüllere doldurulmuş seleksipag nanokristalleri hazırlamış ve karakterize etmişlerdir. Seleksipag nanokristalleri; polimerik stabilizatör olarak HPMC E5, PVA, Soluples®, PXM-407 polimerleri ile asit-

baz nötralizasyon ve presipitasyon-ultrasonikasyon yöntemleri ile hazırlanmıştır. Seleksipag nanokristallerinde en stabil ve uygun formülü seçmek için stabilizatör tipi ve hazırlama yöntemlerinin nanokristallerin partikül boyutu ve polidispersite indeksi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Liyofilize nanokristallerde de etken madde içeriği, redisperse edilebilirlik, akışkanlık, sıkıştırılabilirlik özellikleri gibi karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda hazırlanan seleksipag nanokristalleri, saf seleksipaga göre birkaç kat artmış doygunluk çözünürlüğü göstermiştir. Liyofilize seleksipag nanokristalleri içeren sert jelatin kapsüller, saf seleksipag içeren sert jelatin kapsüllere göre daha hızlı bir çözünme profili sergilemiştir [16].

Endotelin yolu

Endotelin, insanlarda ET-1, ET-2 ve ET-3 olmak üzere üç ayrı formda bulunmaktadır. ET-1 primer olarak damar endotelinden salgılanan, kuvvetli ve uzun süreli vazokonstriksiyon sağlayan bir ajandır. Nötrofil ve mast hücrelerinden sitokin salımını uyarmak suretiyle enflamasyonu tetiklemektedir. Ayrıca damar düz kas hücrelerinde ve fibroblastlarda proliferasyona yol açmaktadır [17]. ET-1'in düz kas hücrelerinde endotelin reseptörlerine (ETA ve ETB) bağlanması fosfolipaz C'yi aktive etmekte, bu da hücre içi kalsiyumu artırmakta ve sürekli vazokonstriksiyona neden olmaktadır. PAH teşhisi konan hastalarda hem plazma hem de akciğer dokularında ET-1 aktivasyonu arttığı için yüksek ET-1 seviyelerinin hastalık şiddeti ve prognozu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle PAH tedavisinde ET_A ve ET_B'yi bloke eden çeşitli bileşikler geliştirilmiştir [18]. Üç endotelin reseptör antagonisti; bosentan (Tracleer®), ambrisentan (Letairis®) ve macitentan (Opsumit®) PAH tedavisi için FDA ve EMA tarafından onaylanmıştır. Başka bir endotelin reseptör antagonisti olan sitaksentan Avustralya, Kanada ve Avrupa Birliği'nde onaylanmış, ancak Aralık 2010'da endotelin reseptör antagonistleri ile ilişkili terminal bir yan etki olan ölümcül karaciğer hasarı raporları doğrultusunda piyasadan ve klinik çalışmalardan çekilmiştir [6].

PAH tedavisinde kullanılan endotelin reseptör antagonistlerinin bazı kısıtlamaları Tablo 4'te verilmiştir [6].

Tablo 4. Endotelin reseptör antagonistlerinin kullanımını kısıtlayan faktörler

Bosentan	Karaciğer toksisitesi (hepatik aminotransferaz artışı)
Ambrisentan	Teratojenite Karaciğer toksisitesi
Macitentan	Teratojenite

Anjaneyulu ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, bosentanın PAH tedavisinde sistemik yan etkilerini en aza indirmek için Pulsincap formülasyonu tasarlamıştır. Bosentan ve diğer formülasyon bileşenlerinin karışımları için Hausner oranı ve Carr indeksi hesaplanarak mikromeritik özellikleri incelenmiştir. Çalışmada şeker pelletleri bosentan ile kaplanmıştır. Şeker pelletleri etkin madde ile kaplanmadan önce sudaki çözünürlüklerini azaltmak için %2 a/a hidroksipropil metil selüloz (HPMC)

ile kaplanmıştır. Daha sonra akışkan yatak cihazı kullanılarak etkin madde bulamacıyla kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan bosentan kaplı pelletler %2'den az nem içerecek şekilde 45 °C'de kurutulmuştur. Pulsincap formülasyonlarını geliştirmek için boş sert jelatin kapsüller kullanılmış ve bu sert jelatin kapsüller formaldehit ile kaplanmıştır. Kapsüller için HPMC K10, guar zıncı, ksantan zıncı ve sodyum aljinat gibi şişebilen polimerleri ve farklı oranlarını içeren tıplar hazırlanmıştır. Hazırlanan formaldehit kaplı kapsüllerin içerisine 62,5 mg bosentana eşdeğer olacak şekilde pelletler koyulmuş ve şişebilen tıplarla kapatılarak Pulsincap sistemleri hazırlanmıştır. Hazırlanan Pulsincap sistemlerinin in vitro salım özellikleri incelenmiştir. İn vitro salım çalışmaları USP Aparat 1 (sepet yöntemi) kullanılarak 12 saat boyunca 50 rpm dönüş hızında ve 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Ortam olarak ilk 2 saat pH 1.2, sonraki 3 saat pH 7.4 fosfat tamponu ve devamında pH 6.8 fosfat tamponu kullanılmıştır. Yapılan salım çalışması sonucunda Pulsincap formülasyonlarından 3 saat sonra bosentan salımı olduğu gözlenmiş ve 12 saat boyunca devam eden bir salım profili sergilemiştir. Yapılan çalışma sonucunda Pulsincap formülasyonundan bosentan salımının tıpadaki hidrojel konsantrasyonu ile orantılı olduğu görülmüştür. Artan hidrojel konsantrasyonu ile mide ortamında etkin madde salımının azaldığı ve bağırsak ortamında ise kontrollü etkin madde salımının sağlanabileceği bulunmuştur. Sonuç olarak, bosentanın geliştirilen Pulsincap formülasyonu ile başarılı bir şekilde kontrollü salımının sağlanabildiği görülmüştür [19].

Deshmane ve arkadaşları yaptıkları çalışmada suda çözünürlüğü zayıf olması nedeniyle oral biyoyararlanımı düşük olan ambrisentan için ilaç taşıyıcı sistem olarak doğal *Daucus carota* ekstresi kullanılarak katı dispersiyonları hazırlanmıştır. *Daucus carota* ekstresi sıcak su ekstraksiyonu ile elde edilmiş ve çözünürlük, şişme indeksi, viskozite, yığın açısı, hidrasyon kapasitesi ve akut toksisite testi (LD₅₀) açısından değerlendirilmiştir. Oluşturulan katı dispersiyonlar etken madde içeriği, çözünürlük, morfoloji ve in vitro salım çalışmaları ile karakterize edilmiştir. Katı dispersiyonlar ile saf ambrisentanın in vivo biyoyararlanım çalışmaları farelere oral uygulama sonucu değerlendirilmiştir. C_{max}, t_{max}, AUC, MRT gibi farmakokinetik parametreler katı dispersiyonu oluşturulan ambrisentanın hızlı çözüldüğünü ve emildiğini göstermiştir. Çalışma sonucunda, doğal *Daucus carota* ekstresinin çözünürlüğü ve biyoyararlanımı iyileştirmek için katı dispersiyon ve/veya diğer dozaj formlarının hazırlanması için iyi bir alternatif kaynak olabileceği düşünülmüştür [20].

Nitrik oksit yolu

Nitrik oksit (NO) endojen bir vazodilatördür ve fizyolojik koşullar altında antiproliferatif ve antienflamatuvar etkiler dahil olmak üzere birçok etkisi bulunmaktadır [21]. NO, düz kas kasılmasını düzenleyen önemli bir ikinci haberci olan siklik guanozin monofosfat (cGMP) üretimini artırmaktadır [6]. NO sentezinin ve NO-çözünebilir guanilat siklaz (sGC)-cGMP yolu arasındaki sinyal iletiminin bozulması PAH patogenezinde rol oynamaktadır [22]. İn hale NO, PAH tedavisi için potansiyel bir terapötik yaklaşım olarak araştırılmış ve hastanede yatan pediatrik PAH hastalarının tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır [6]. NO'in etkisini belirginleştirerek etki gösteren fosfodiesteraz-5

inhibitörleri, PAH tedavisinde umut vaat eden bir başka gruptur [17]. Bu gruba dahil olan sildenafil (Revatio®) ve tadalafil (Adcirca®) FDA tarafından PAH tedavisi için onaylanmıştır. NO, cGMP üretimini artırarak etki ettiği için cGMP biyosentezini uyaran ilaçlar da PAH tedavisinde etkili olabilmektedir. sGC uyarıcılarına örnek olan Riociguat (Adempas®) PAH tedavisi için onaylanmış bir diğer ilaçtır [6].

PAH tedavisinde NO yolağında kullanılan ilaçların bazı kısıtlamaları Tablo 5'te verilmiştir [6].

Tablo 5. Nitrik oksit yolağında kullanılan etkin maddelerin kullanımını kısıtlayan faktörler

Sildenafil	Retina kanaması Doza bağlı sistemik yan etkiler
Tadalafil	Doza bağlı sistemik yan etkiler
Vardenafil	Düşük çözünürlük İlk geçiş etkisi

Bu grupta bulunan sildenafil sitratın oral ve intravenöz uygulama için çeşitli piyasa preparatları bulunmaktadır. Ancak bu preparatlar kısa yarılanma ömrü, başta hipertansiyon ve baş ağrısı olmak üzere sistemik yan etkiler gibi olumsuz özellikler göstermektedir. Bu olumsuz özelliklerin üstesinden gelmek ve kontrollü salım elde etmek için çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla Shahin ve arkadaşları sildenafil sitratın sürekli pulmoner salımı için hidrojel mikropartiküller tasarlamış ve değerlendirmiştir. Çalışmada değişen oranlarda mukoadesif, biyoyumlu ve biyobozunur özellikler gösteren sodyum karboksimetil selüloz, sodyum aljinat ve sodyum hiyalüronat polimerleri kullanılarak püskürterek kurutma tekniğiyle hidrojel mikropartiküller oluşturulmuştur. Bu mikropartiküllerde partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı, üretim verimi, yükleme etkinliği, in vitro salım, şişme, biyodegradasyon, nem içeriği, in vitro aerodinamik çap ve sitotoksisite gibi karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, sıçanlarda oral yoldan verilen Viagra® ile karşılaştırmalı olarak hidrojel mikropartiküllerinin intratrakeal olarak uygulanmasını takiben akciğer birikimi ve farmakokinetik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar polisakarit polimerlerinin değişik konsantrasyonları ve bileşimleriyle hazırlanan hidrojel mikropartiküllerinin yüksek verimi, yüksek yükleme etkinliği, uygun partikül boyutu ve 24 saat boyunca uzatılmış salım özelliğine sahip olduğunu göstermiştir. Hidrojel mikropartikül formülasyonlarının in-vivo değerlendirilmesi, akciğerlerde birikim açısından umut verici sonuçlar vermiş ve ticari sildenafil sitrat tabletleriyle karşılaştırıldığında ilacın eliminasyon yarı ömrünü uzattığı gözlenmiştir. Bu nedenle, formüle edilebilen püskürterek kurutulmuş hidrojel mikropartiküllerin, PAH tedavisi için günde bir kez pulmoner yol ile uygulanabilecek potansiyel bir ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilceği düşünülmüştür [23].

Lila ve arkadaşları, tadalafil ve sildenafil'den daha seçici ve on kat daha güçlü bir başka fosfodiesteraz-5 inhibitörü olan vardenafil ile bir çalışma yapmışlardır. Vardenafil oral uygulamadan sonra düşük çözünürlük ve ilk geçiş metabolizması nedeniyle düşük biyoyararlanıma sahiptir. Bu

nedenle çalışmada vardenafil katı dispersiyonları hazırlanarak çözünme hızını artırmak ve ilk geçiş etkisinden kaçınmak için pastil dozaj formu tasarlanmıştır. Hazırlanan bu pastillerde; ağırlık varyasyonu, sertlik ve kalınlık, erozyon süresi, yükleme kapasitesi, friabilite, yüzey pH'sı ve in vitro salım çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca in vivo değerlendirme, sıçanlarda optimize edilmiş formülün vardenafil oral süspansiyonuna karşı biyodağılım ve cGMP serum seviyesinin ölçülmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Pastillere vardenafil saf etken madde ve katı dispersiyonları olmak üzere iki farklı şekilde yüklenmiş ve karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Vardenafil katı dispersiyonları 1:1 oranında tartarik asit kullanılarak çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Belirli miktarlarda tartılan vardenafil ve tartarik asit metanol içinde çözülmüş ve daha sonra metanol 40°C sıcaklıkta vakum altında uzaklaştırılmıştır. Buharlaştırma sabit bir ağırlık elde edilinceye kadar devam ettirilmiş ve oluşan katı dispersiyonlar vakumlu fırında kurutularak toz edilmiş ve elekten geçirilmiştir. Pastiller ise eritme ve sıkıştırma tekniği ile hazırlanmıştır. Tozlar düzgün bir karışım oluşturmak üzere karıştırıldıktan sonra PEG karışımı bir beher içinde eritilmiş ve hazırlanan toz karışımı içerisine ilave edilip karıştırılmıştır. Karışım 50° C'nin altına soğutulmuş ve hazırlanacak formülasyona göre ya vardenafil ya da vardenafil katı dispersiyonu ilave edilip karıştırılmıştır. Formülasyonlara sedimantasyonu önlemek için silika jel ilave edilmiştir. Son olarak hazırlanan karışım kalıplara dökülmüş ve soğumaya bırakılmıştır. Pastillerde in vitro salım çalışmaları USP aparat II kullanılarak 100 mL pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde 50 rpm ve 37±0.5 °C'de 1 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Salım çalışması sonucunda vardenafil katı dispersiyonlarıyla hazırlanan pastillerden serbest vardenafil içeren pastillere göre artmış bir salım gözlenmiştir. Çalışmanın sonucunda vardenafil katı dispersiyon pastillerinin PAH tedavisi için oral vardenafil süspansiyonuna potansiyel bir alternatif olabileceği kanısına varılmıştır. Hazırlanan pastiller vardenafilin oral emilimini artırarak ve ilk geçiş etkisini önleyerek biyoyarlanımının artmasını ve akciğerlerde lokalize olmasını sağlamışlardır [24].

Rad ve arkadaşları yaptıkları çalışmada sistemik yan etkileri azaltmanın yanı sıra biyoyarlanımı ve tedavi etkinliğini artırmak için pulmoner yol ile uygulanmak üzere tadalafil nanokompozitlerini püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlamışlardır. Hazırlanan nanokompozitlerde, partikül boyutu, morfolojisi, kristallliği, yoğunluğu, çözünürlüğü, yeniden dağılılabirliği ve in-vitro inhalasyon performansı açısından karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Optimum formülasyon küresele yakın şekle ve 13.7 kat artmış çözünme oranı, % 57.2 ± 6.5 ince partikül fraksiyonu, 1.4 g/cm³ yoğunluk, 3.2 µm aerodinamik çapa sahip stabil amorf partikülleri içermektedir. Farmakokinetik parametreler intratrakeal insüflasyondan sonra sıçanların plazma ve akciğer dokusunda değerlendirilmiş ve piyasada bulunan oral tadalafil preparatı ile karşılaştırılmıştır. In-vivo çalışmalar, intratrakeal insüflasyondan sonra tedavi edilen grupta elde edilen AUC_{0-24saat} akciğer/AUC_{0-24saat} plazma oranının kontrol grubundan anlamlı derecede daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca, plazma veri analizi ile belirlenen ve geleneksel oral yolla karşılaştırıldığında tadalafil nanokompozitlerin intratrakeal insüflasyonundan

sonra elde edilen yüksek MRT (2.3 kat) ve t_{max} (3.7 kat) değerleri akciğerlerde tadalafil moleküllerinin daha uzun süre tutulduğunu ve sistemik kan dolaşımına daha yavaş katıldığını göstermiştir. Yapılan çalışma, tadalafil nanokompozitlerin kullanıldığı inhalasyon tedavisinin, hızlı etki başlangıcı, daha yüksek bir lokal ilaç konsantrasyonu, daha uzun bir ilaç retansiyonu ve sonuç olarak, tadalafilin geleneksel oral uygulamasına kıyasla akciğerlere etkili bir ilaç iletimi avantajları sunduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, önerilen formülasyonun etkinliğinin doğru bir şekilde değerlendirilmesi için daha fazla toksikolojik, farmakolojik ve klinik çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür [25].

PAH'da Kombinasyon Tedavileri

PAH'ın başlangıç tedavisinden sonra yapılan klinik değerlendirmede klinik yanıt yeterli değilse kombinasyon tedavisi alternatif olarak kullanılabilir. Kombinasyon tedavisinde iki ya da daha fazla sınıftan ilaç birlikte kullanılmaktadır [22]. PAH tedavisinde kullanılan ilaçların değişik yollardan etki etmesi ile sinerjistik etki sağlanabilmesi açısından kombinasyon tedavileri avantaj sağlayabilmektedir [26]. Kombinasyon tedavisi; endotelin reseptör antagonistleri, fosfodiesteraz-5 inhibitörleri, prostanoidler ve yeni bileşikler gibi PAH hedefli birden fazla ilaç sınıfının eş zamanlı kullanımını içermektedir. Farklı randomize ve kontrollü çalışmalarda; bosentan-epoprostenol, bosentan-iloprost, bosentan-sildenafil, sildenafil-epoprostenol gibi kombine tedavilerin etkinlikleri gösterilmiştir. Yeni keşfedilen bileşiklerle yapılan çalışmalar devam etmektedir [27].

Kombinasyon tedavisinde iki yaklaşım mevcuttur. İlki tek bir grup ilaçla tedaviye başlanmasını ancak tedavi hedeflerine ulaşılmadığında ikinci grup ilacın tedaviye eklenmesini içermektedir. Diğer yaklaşım ise tedaviye doğrudan kombine ilaç kullanımı ile başlanmasıdır [28]. Kombinasyon tedavisiyle tedavi etkinliğinin artması sağlanmakla birlikte birçok ilaç-ilaç etkileşimi de görülebilmektedir. Örneğin bosentan sitokrom P450 izoenzimleri CYP3A4 ve CYP2C9'u indükleyici etki yapmakta ve bu izoenzimler tarafından metabolize olan ilaçların bosentan ile birlikte verilmesi durumunda plazma konsantrasyonlarında düşüş görülmektedir [29].

PAH'da Güncel Tedavi Yaklaşımları

PAH patofizyolojisinden sorumlu hücrel ve moleküler mekanizmalar hakkındaki bilgiler gün geçtikçe artmaktadır. PAH'da pulmoner vasküler yatakta ilerleyen mekanik tıkanmanın, mPAP'ın yükselmesinden büyük ölçüde sorumlu olduğu belirlenmiştir. Pulmoner vasküler yeniden şekillenmenin altında yatan temel fizyopatolojik mekanizmalar arasında pulmoner vazokonstriksiyon, in situ tromboz, medial hipertrofi ve kompleks vasküler lezyonların oluşumu bulunmaktadır. PAH'ta bu aşırı yeniden şekillenmeye katkıda bulunan; artan hücre proliferasyonu ve pulmoner arteriyel düz kas hücrelerinin, endotel hücrelerinin, fibroblastların ve miyofibroblastların azalmış apoptozu, pulmoner endotelial disfonksiyon, sürekli enflamasyon, metabolik değişiklikler ve oksidatif stres ve farklı sinyal yollarının aşırı aktivasyonu gibi mekanizmalar ortaya çıkmıştır [30].

Anti-PAH ilaçları bazı durumlarda etkisiz veya daha az terapötik potansiyele sahip olabilmektedir. Bu nedenlerle ve yukarıda bahsedildiği gibi patogeneizde elde edilen yeni bilgiler ışığında PAH tedavisinde yeni terapötik yaklaşımlar oluşmaktadır. Bu yaklaşımlar içinde; rho-kinaz yolu, tirozin kinaz, vazoaktif intestinal peptitler, endotelin progenitör hücreleri ve miRNA'ların kullanımı üzerinde en çok çalışılan yaklaşımlardır [6].

Rho-kinaz yolu

Son yıllarda, PAH tedavisi için belirlenen ümit verici hedefler arasında rho-kinaz bulunmaktadır. 1990'larda tanımlanan rho-kinazların ROCK-1 ve ROCK-2 olmak üzere iki izoformu tanımlanmış ve arterlerde eksprese edildiği bulunmuştur [31, 32]. Rho-kinaz, proliferasyon, apoptoz, kasılma ve gen ekspresyonu gibi çeşitli hücre fonksiyonların düzenlenmesinde rol almaktadır. Rho-kinazlar, düz kas hücrelerinin kasılmasında Ca^{+2} duyarlılığının düzenlenmesindeki temel rolleri sayesinde arteriyel tonunun önemli bir belirleyicisi olarak kabul edilmektedirler. Ayrıca, endotelial nitrik oksit sentaz ekspresyonunu ve aktivitesini negatif olarak kontrol etmekte ve trombosit agregasyonuna katılmaktadırlar [32]. Birçok çalışma ROCK'un uyarılmasının PAH'da meydana gelen sürekli vazokonstriksiyon, vasküler yeniden şekillenme ve iltihaplanmada rol aldığını göstermiştir [33]. Rho-kinaz inhibitörleri, fasudil ve aminofurozan türevleri gibi ROCK'u doğrudan inhibe edenler ve statinler gibi dolaylı inhibitörler olmak üzere iki kategoride sınıflandırılabilir [6].

Gupta ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, aerosolize lipozomlara yüklenmiş fasudilin PAH'da uzun süreli ve pulmoner olarak seçici vazodilatasyon sağlamak amacıyla uygulanabilirliğini araştırmışlardır. Lipozomlar film hidrasyon ve ekstrüzyon yöntemleriyle hazırlanmıştır. Lipozom formülasyonlarında, 1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfokolin ve kolesterol 7:3 mol oranında ve toplam lipit konsantrasyonu 30 mM olacak şekilde kullanılmıştır. Fasudil lipozomlara pasif veya aktif olarak yüklenmiştir. Pasif yükleme durumunda, fosfat tamponu içerisinde 15 mg/mL oranında bulunan fasudil çözeltisi ile lipitlerden oluşan film tabakası rehidrate edilmiş ve 25 °C'de bir saat sonike edilmiştir. Bunun sonucunda oluşan büyük çok tabakalı veziküller 65 °C'de ekstrüzyon işlemine tabi tutulmuş ve küçük tek tabakalı veziküller elde edilmiştir. Yüklenmemiş ilaç ise lipozomların kolondan geçirilmesiyle ayrılmıştır. Aktif yükleme durumunda ise, film tabakası değişik pH'larda (3.0, 5.4, 7.0 ve 8.0) 250 mM amonyum sülfat çözeltisi ile rehidrate edilmiş ve lipozomlar pasif yüklemede olduğu gibi ekstrüde edilmiştir. Ardından fasudil, 65 °C'de 30 dakika boyunca amonyum sülfat içeren lipozomlar ile inkübe edilerek yüklenmiş ve yüklenmeyen fasudil yine bir kolondan geçirilerek uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan lipozomlar çeşitli fizikokimyasal özellikleri için karakterize edilmiştir. Optimize edilen formülasyonlar, monokrotalin ile indüklenmiş PAH sıçan modelinde pulmoner absorpsiyon ve farmakolojik etkinliği açısından test edilmiştir. Lipozomların ortalama vezikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli Malvern Zetasizer kullanılarak belirlenmiş ve lipozomal formülasyonların morfolojisi TEM ile incelenmiştir. İn vitro salım çalışmaları, diyaliz yöntemiyle

gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda, lipozomların fasudilin pulmoner yoldan verilmesi için bir taşıyıcı olarak kullanılabilmesi ve lipozomal fasudilin in vivo olarak sıçanlara uygulandığında uzatılmış bir yarı ömür gösterdiği bulunmuştur. İntravenöz fasudil ile karşılaştırıldığında optimize edilmiş lipozomal formülasyonların tek bir dozu yaklaşık 3 saat boyunca sürekli pulmoner vazodilatasyon sağlamıştır. Sonuç olarak aerosol haline getirilmiş fasudil lipozomlarının düşük dozlama sıklığında sürekli ve seçici pulmoner vazodilatasyon için PAH tedavisinde kullanılabilmesi düşünülmüştür [34].

Tirozin kinaz

Protein kinazın bir alt sınıfı olan tirozin kinaz, ATP'nin terminal fosfatını bir proteine aktararak tirozin kalıntılarının fosforilasyonunu tetikleyen bir enzimdir [6]. Reseptör tirozin kinazlar büyüme faktörleri ve hücre dışı sinyal molekülleri için reseptör görevi gören transmembran glikoproteinlerdir. Reseptör tirozin kinazlar çoğalma, hücre sel göç, metabolizma, farklılaşma ve hücre sel hayatta kalma olaylarında önemli bir rol oynarlar [35]. Çalışmalar, tirozin kinaz reseptörlerinin PAH patogenezinde önemli bir rol oynadığını ve bazı spesifik reseptör tirozin kinaz sinyallerinin inhibisyonunun PAH tedavisinde etkin olduğunu göstermiştir. 2007 yılında FDA tarafından metastatik meme kanseri tedavisi için onaylanmış olan lapatinib ile hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda, uyarılmış pulmoner hipertansiyonu azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, insanlardaki etkisi için klinik veri bulunmamaktadır [36]. Bir diğer tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib (Gleevec®), hücre sel proliferasyonu inhibe ederek ve pulmoner arteriyel düz kas hücrelerinin apoptozunu artırıp vasküler yeniden şekillenmeyi tersine çevirerek anti-PAH aktivitesi göstermiştir. Bu etkinin PDGF reseptörü için inhibitör etkisinden kaynaklandığı varsayılmaktadır. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve c-kit reseptörlerinin PAH patogenezinde kritik bir rol oynadığı ve vasküler endotelial hücrelerin ve düz kasların aşırı proliferasyonunda ve migrasyonunda yer aldıkları bildirilmiştir [6].

PDGF-reseptör tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib, PAH tedavisinde hemodinamiği iyileştirmekle birlikte ciddi yan etkiler görülmektedir. Nanopartikül kullanımı, etkin maddenin etkilerini korurken yan etkilerin azaltılmasını sağlamıştır. Akagi ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada sıçan modelinde ve insan PAH-pulmoner arteriyel düz kas hücrelerinde (PASMC) imatinib yüklü nanopartiküllerin etkinliğini incelemiştir. Flurosein izotiyonat (FITC) ve imatinib yüklü poli(laktik-koglikolik asit) (PLGA) nanopartikülleri emülsifikasyon-çözücü difüzyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Nanopartiküllerin hazırlanmasında molekül ağırlığı 22 900 ve 75:25 laktik asit-glikolik asit kopolimer oranına sahip PLGA kullanılmıştır. PLGA, aseton-metanol karışımı içerisinde çözülüp içerisine FITC/imatinib ilave edilmiştir. Fosfat tamponu ve FITC nanopartiküllerinin MCT kaynaklı PAH sıçan modellerine tek bir intratekal uygulanmasını takiben sağ ventrikül sistolik basıncında ve sağ ventrikül hipertrofinde bir artış gözlenirken imatinib yüklü nanopartiküller ile sağ ventrikül sistolik basıncındaki artışın ve sağ ventrikül hipertrofinin önlenmesi görülmüştür. Ayrıca imatinib yüklü

nanopartiküllerin uygulanması küçük damarların oluşum yüzdesini de azaltmıştır. FITC nanopartiküllerinin MCT kaynaklı sıçan modellerindeki dağılımı incelendiğinde ise pulmoner arterlere dağılım gözlenirken; karaciğer ve böbrekte dağılım gözlenmemiştir. İmatinib ve imatinib yüklü nanopartiküllerin PAH'lı pulmoner arteriyel düz kas hücrelerindeki proliferasyonu değerlendirilmiştir. Her iki uygulama da proliferasyonu inhibe etmiştir. Ancak nanopartikül uygulanması daha uzun süreli bir inhibisyon sağlamıştır. Ayrıca, imatinibin nanopartiküllere yüklenmesi daha düşük dozda terapötik etki elde edilebilmesini sağlamıştır. İmatinib yüklü nanopartiküller sayesinde PAH-PASMC'lerin proliferasyonu ve MCT kaynaklı pulmoner hipertansiyon gelişiminin bastırıldığı gözlenmiştir [37].

Vazoaktif intestinal peptit

Molekül ağırlığı 3326 Da olan ve 28 aminoasitten oluşan vazoaktif intestinal peptit (VIP) bağırsaktaki su ve elektrolit sekresyonunda önemli bir rol oynayan nöroendokrin bir hormondur. VIP güçlü bir sistemik vazodilatör etkiye sahiptir. Monokrotaline bağlı pulmoner hipertansif tavşanlarda ve sağlıklı bireylerde pulmoner arter basıncını ve pulmoner vasküler direnci azaltmış, ayrıca trombosit aktivasyonunu ve vasküler düz kas hücresi proliferasyonunu inhibe etmiştir [38]. PAH hastalarında serumda VIP konsantrasyonunun düşük olduğu ama VIP reseptörlerinin ekspresyonunda artış olduğu bulunmuştur. Bu nedenle VIP'in PAH tedavisinde kullanılmasına ilgi gün geçtikçe artmaktadır [39].

VIP'lerin pulmoner yol ile uygulanması, astım ve PAH gibi çeşitli akciğer hastalıkları için umut verici bir tedavi seçeneğidir. Ancak, peptitlerin solunum yollarındaki hızlı enzimatik bozunmaya bağlı olarak kısa yarı ömrüne sahip olmaları bu tedavinin kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu sorunun üstesinden gelmek için Hajos ve arkadaşları, tek tabakalı nano boyutlu VIP yüklü lipozomlar (VLL) geliştirerek inhalasyon yolu ile uygulanabilirliğini araştırmışlardır. Boş ve VIP yüklü lipozomlar, konjuge polietilenglikol (PEG)-fosfatidil etanolamin, lizosteril-fosfatidilgliserol ve palmitoil-oleil-fosfatidilkolin kullanılarak ince film rehidrasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Yüzeğe bağlı VIP moleküllerini solunum yolundaki enzimatik bozulmaya karşı korumak ve partikül agregasyonunu engellemek için lipozomlar PEG ile kaplanmıştır. VIP'in damarlar üzerindeki vazodilatör etkisini araştırmak için sıçanlardan alınan arterler üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Serbest VIP ve VIP yüklü lipozomlar karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, lipozomlardan VIP salımı daha uzun süre sürmüş ve buna bağlı olarak arterlerde oluşturdukları vazodilatasyon süresi daha uzun gözlenmiştir [40].

Endotelin progenitör hücreleri

Prostanoidler, endotelin-1 antagonistleri ve fosfodiesteraz inhibitörleri gibi pulmoner vazodilatörlerin, akciğer dolaşımında gelişmiş vazokonstriksiyonu hedefleyerek PAH hastalığının ilerlemesini yavaşlatabileceği ve hastalarda belirgin şekilde iyileşme sağlayabileceği düşünülmektedir. Ancak bu tedavi yolları pulmoner yeniden şekillenmeyi veya hastalığın altında yatan nedenleri tedavi etmezler. Endotelial progenitör hücrelerin (EPC'lerin) ise vasküler hasar bölgelerine girerek ve kan damarlarını yenileyerek vasküler homeostazın korunmasında önemli bir role sahip olduğu

düşülmektedir [41]. EPC'ler, endotelial hücelere farklılaşabilen, hasarlı pulmoner kan damarlarını onarma ve yenileme yeteneğine sahip kemik iliği kaynaklı hücelerdir [42]. Kemik iliğinden harekete geçirilen ve akciğerlerde lokal olarak bulunan EPC'lerin PAH tedavisinde kullanımına duyulan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Dolaşımdaki EPC'lerin eksikliğinin PAH'ta pulmoner vasküler patolojisinde rol oynayabileceği ve EPC'lerin transfüzyonunun yeni hücre bazlı bir tedavi sunabileceği düşünülmektedir [43,44].

EPC'ler, doku iskemisine veya travmatik yaralanmaya yanıt olarak kemik iliğinden periferik kan içine mobilize edilip hasarlı endotel bölgelerine göç etmekte ve in situ olgun endotel hücelerine farklılaşmaktadır. Bu özellik sayesinde EPC'lerin gen iletimi için kullanılabilirliği düşünülmüştür. Nagaya ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, insan kordon kanından elde ettikleri EPC'lerini, vazodilatör etkiye sahip bir peptid olan andrenomedulinin (AM) akciğerlere iletimini sağlayarak PAH tedavisi için kullanmışlardır. AM cDNA'sı için non-viral vektör olarak biyolojik olarak bozunabilen jelatin mikroküreleri hazırlanmıştır. Jelatin mikroküreleri, jelatinin glutaraldehit ile çapraz bağlanmasıyla oluşturulmuştur. İnsan AM cDNA'sını kodlayan vektör oluşturulup, mikroküreler ile 4°C'de 24 saat inkübe edilerek DNA-jelatin kompleksleri elde edilmiştir. Oluşturulan bu kompleks EPC'lerin fagositoz yeteneği ile hücelerin içine yüklenmiştir. Normal EPC'ler ve AM DNA-jelatin kompleksi içeren EPC'ler monokrotalin ile indüklenmiş PAH'lu sıçanlara uygulanmış ve sonuçları karşılaştırılmıştır. AM ekspresyon eden EPC'lerin, pulmoner hipertansiyon ve vasküler yeniden şekillenmede tek başına EPC'ye göre önemli ölçüde daha fazla iyileşmeye neden olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, EPC'lerin fagositoz etkisine dayanan hibrit hücre-gen tedavisinin PAH'un tedavisi için yeni bir terapötik strateji olabileceğini düşündürmüştür [45].

miRNA

MicroRNA'lar (miRNA), gen ekspresyonu, proliferasyon, metabolizma ve hücre ölümü gibi çeşitli biyolojik işlemlere katılan, kodlayıcı olmayan 21-23 nükleotit uzunluğundaki RNA'lardır [46]. İlk miRNA'lar 1990'ların başında karakterize edilmişlerdir ve çok sayıda hastalık da dahil olmak üzere birçok biyolojik olayda yer aldıkları bulunmuştur. miRNA'lar, mRNA molekülleri içindeki tamamlayıcı dizilere bağlanarak işlev görür ve genellikle translasyonel baskılama veya hedef degradasyonu yoluyla gen susturulması ile sonuçlanır [47]. Moleküler düzeyde miRNA'ların iyon kanallarının ve mitokondriyal fonksiyonun kontrolünde ve ayrıca PAH'da akciğer bozukluğuna katkıda bulunan BMPR2 sinyal yolunun düzenlenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir [48]. miRNA ekspresyon anormallikleri, pulmoner arteriyel düz kas hücelerinin anormal çoğalmasına ve pulmoner arteriyel endotel hücelerinin işlev bozukluğuna neden olmaktadır [49]. Yapılan çalışmalarda; MiR-21'in hipoksiye bağlı pulmoner arteriyel düz kas hüceleri proliferasyonunu ve migrasyonunu etkilediği, MiR-17/92'nin ise PAH ile güçlü bir şekilde ilişkili olan kemik morfojenik reseptör Tip II'nin düzensiz ekspresyonuna neden olduğu bulunmuştur [46].

Mclendon ve arkadaşları yaptıkları çalışma ile microRNA-145 inhibitörlerinin PAH üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada non-viral vektör olarak lipozom kullanılmıştır. Lipozom formülasyonlarının hazırlanmasında lipit olarak bir lipopoliamin çekirdek yapısı olan staramin (Star) ve buna metoksipolietilen glikolün (mPEG) kovalent bağlanması ile modifiye edilmiş Star-mPEG kullanılmıştır. Star:Star-mPEG lipitleri kloroform içerisinde çözülmüş ve bir gece boyunca çözücü buharlaştırılarak film tabakası elde edilmiştir. Daha sonra film tabakası su ile hidrate edilip 30 dakika sonike edilmiştir. Hazırlanan lipozomlar ve antimiR-145 %5 dekstroz ile seyreltilmiş ve 0,2 mg/mL antimiR-145 konsantrasyonuna sahip bir formülasyon elde etmek için eşit hacimlerde karıştırılmıştır. Hazırlanan bu lipozom formülasyonları PAH oluşturulmuş sıçanlara intravenöz yol ile uygulanmıştır. Lipozomların vücuttaki dağılımı incelendiğinde, antimiR-145 seviyeleri akciğerlerde, sağ ve sol ventriküle oranla daha yüksek bulunmuştur. Akciğerlerde antimiR-145'in tutulması akciğerlerde bulunan endojen miR-145 seviyelerini önemli ölçüde düşürmüştür. Ayrıca kalp dokusunda bulunan miR-145 seviyelerinde de düşüş gözlenmiştir. Yapılan toksisite çalışmalarında da hepatik, kardiyak, metabolik veya hematolojik toksisite gözlenmemiştir. AntimiR-145 tedavisinin pulmoner damarlardaki kalınlaşmayı azalttığı görülmüştür. Elde edilen bu sonuç PAH'da oluşan yeniden şekillenmenin antimiR-145 tedavisi ile kısmen onarıldığını düşündürmüştür. AntimiR-145 lipozomlarının PAH'lı sıçanlarda sağ ventrikül hipertrofisinin kısmi onarımı ile sonuçlanan faydalı kardiyak etkilere sahip olduğu gözlenmiştir. Hazırlanan lipozom formülasyonlarının akciğerlere etkin madde taşınması, düşük toksisitesi ve iyi bir tedavi etkinliği sayesinde hastanın yaşam kalitesini ve sağ kalımını iyileştirmek, PAH'ın pulmoner arteriyopatisini ve sağ ventrikül hipertrofisini düzeltmek için miRNA tedavisinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır [50].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Genel olarak, PAH'da uygulanacak tedavi stratejisi hastanın klinik durumunun ağırlığına göre belirlenmektedir. PAH için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış tedavi stratejileri prostasiklin, endotelin ve nitrik oksit yolaklarını hedeflemektedir. Bu tedavi stratejileri hastaların yaşam kalitesini artırmakla birlikte, tedaviye karşı hasta uyuncunun düşük olması ve yan etkilerin görülmesi PAH'ı hastaların büyük bir kısmı için hayatı sınırlandıran bir hastalık haline getirmektedir. PAH'ın patofizyolojisi ile ilgili bilgilerin gün geçtikçe artması, tedavide rhoA/rho kinaz, tirozin kinaz, endotel progenitör hücreleri, vazoaktif bağırsak peptidi ve miRNA gibi yeni moleküler yolakların kullanımını gündeme getirmiştir. Ayrıca, tedavide kullanılmak üzere onaylanmış ve inceleme aşamasında olan etkin maddelerin etkinliğini artırmak için hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı, optimum etkinin elde edilmesi ve yan etki görülme potansiyelinin azaltılması açısından umut verici olmuştur.

YAZAR KATKILARI

Kavram: C.Y., B.D.; Tasarım: B.D.; Denetim: B.D.; Kaynaklar: C.Y., B.D.; Malzemeler: C.Y., B.D.; Veri toplama ve/veya işleme: C.Y., B.D.; Analiz ve/veya yorumlama: C.Y., B.D.; Literatür taraması: C.Y.; Makalenin yazılması: C.Y., B.D.; Kritik inceleme: B.D.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Zolty, R. (2020). Pulmonary arterial hypertension specific therapy: The old and the new. *Pharmacology & Therapeutics*, 214(2020), 1-18.
2. Galie, N., Humbert, M., Vachiery, J., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A., Simonneau, G., Peacock, A., Noordegraaf, A.V., Beghetti, M., Ghofrani, A., Sanchez, M.A.G., Hansmann, G., Klepetko, W., Lancellotti, P., Matucci, M., McDonagh, T., Pierard, L.A., Trindade P.T., Zompatori, M., Hoeper, M. (2016). Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *European Heart Journal*, 37, 67-119.
3. Türk Toraks Derneği Web site. Retrieved February 5, 2020. from <https://www.toraks.org.tr/halk/News.aspx?detail=2180>
4. Öztürk, Ö., Şahin, Ü. (2009). Pulmoner hipertansiyon: Tanı ve tedavisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 16 (1), 39-47.
5. Demir, R., Küçüköğlü, M.S. (2010). Pulmoner arter hipertansiyonunda egzersiz kapasitesinin değerlendirilmesi. *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi*, 38(8), 580-588.
6. Vaidya, B., Gupta, V. (2015). Novel therapeutic approaches for pulmonary arterial hypertension: Unique molecular targets to site-specific drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 211, 118-133.
7. Gunt, C., Çekmen, N. (2016). Pulmoner hipertansiyon ve weaning. *Türk Yoğun Bakım Dergisi*, 14, 68-79.
8. Spiekerkoetter, E., Kawut, S.M., de Jesus Perez, V.A. (2019). New and emerging therapies for pulmonary arterial hypertension. *Annual Review of Medical*, 70, 45-59.
9. Çörtük, M., Çetinkaya, E. (2017). Pulmoner arteriyel hipertansiyonda prostasiklin analogları ve prostaglandin reseptör agonistleri. *Türkiye Klinikleri Akciğer Arşivi*, 18(1), 17-24.
10. Kılıçkesmez, K., Küçüköğlü, M.S. (2010). Pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisinde fosfodiesteraz-5 inhibitörleri. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*, 10(2), 16-18.

11. Gessler, T. (2018). Inhalation of repurposed drugs to treat pulmonary hypertension. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 133, 34-44.
12. O'Connell, C., Amar, D., Boucly, A., Savale, L., Jais, X., Chaumais, M., Montani, D., Humbert, M., Simonneau, G., Sitbon, O. (2016). Comparative safety and tolerability of prostacyclins in pulmonary hypertension. *Drug Safety*, 39, 287-294.
13. Ishihara, T., Hayashi, E., Yamamoto S., Kobayashi, C., Tamura, Y., Sawazaki, R., Tamura, F., Tahara, K., Kasahara, T., Ishihara, T., Takenaga, M., Fukuda, K., Mizushima, T. (2015). Encapsulation of beraprost sodium in nanoparticles: Analysis of sustained release properties, targeting abilities and pharmacological activities in animal models of pulmonary arterial hypertension. *Journal of Controlled Release*, 197, 97-104.
14. Leifer, F.G., Konicek, D.M., Chen, K., Plaunt, A.J., Salvail, D., Laurent, C.E., Corboz, M.R., Li, Z., Chapman, R.W., Perkins, W.R., Malinin, V.S. (2018). Inhaled treprostinil-prodrug lipid nanoparticle formulations provide long-acting pulmonary vasodilation. *Drug Research*, 68 (11), 605-614.
15. Jain, P.P., Leber, R., Nagaraj, C., Leitinger, G., Lehofer, B., Olschewski, H., Olschewski, A., Prassl, R., Marsh, L.M. (2014). Liposomal nanoparticles encapsulating iloprost exhibit enhanced vasodilation in pulmonary arteries. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 3249-3261.
16. Alwan, R.M., Raja, N.A., Alhagiesia, A.W. (2020). Formulation and optimization of lyophilized selexipag nanocrystals to improve the saturation solubility and dissolution rate. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(11), 596-605.
17. Mirici, A., Gönlügür, U. (2011). Pulmoner hipertansiyonda medikal tedavi. *Nobel Medicus*, Cilt 7(1), 5-11.
18. Segura-Ibarra, V., Wu, S., Hassan, N., Moran-Guerrero, J.A., Ferrari, M., Guha, A., Karmouty-Quintana, H., Blanco, E. (2018). Nanotherapeutics for treatment of pulmonary arterial hypertension. *Frontiers in Physiology*, 9:890, 1-16.
19. Anjaneyulu, V., Gnanaprakash, K., Chandrasekhar, K.B. (2014). Development and evaluation of bosentan pulsincap formülasyon for controlled release. *International Journal of Pharmaceuticals and Health Care Research*, 2(2), 109-114.
20. Deshmane, S., Deshmena, S., Shelke, S., Biyani, K. (2018). Enhancement of solubility and bioavailability of ambrisentan by solid dispersion using *Daucus carota* as a drug carrier: formulation, characterization, in vitro, and in vivo study. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(6), 1001-1011.
21. Hill, N.S., Preston, I.R., Roberts, K.E. (2015). Inhaled therapies for pulmonary hypertension. *Respiratory Care*, 60(6), 794-805.
22. Selimoğlu Şen, H. (2015). İdyopatik pulmoner arter hipertansiyonu tedavisi: Güncel durum ve gelecekteki yönelişler. *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi*, 3(1), 100-118.
23. Shahin, H.I., Vinjamuri, B.P., Mahmoud, A.A., Shamma, R.N., Mansour, S.M., Ammar, H.O., Ghorab M.M., Chougule, M.B., Chablani, L. (2019). Design and evaluation of novel inhalable sildenafil citrate spray-dried microparticles for pulmonary arterial hypertension. *Journal of Controlled Release*, 302, 126-139.

24. Lila, A.S.A., Gomaa, E., Ghazy, F.E.S., Hasan, A.A. (2020). Treatment of pulmonary arterial hypertension by vardenafil-solid dispersion lozenges as a potential alternative drug delivery system. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 55:101444, 1-7.
25. Rad, R.T., Dadashzadeh, S., Vatanara, A., Alavi, S., Ghasemian, E., Mortazavi, S.A. (2019). Tadalafil nanocomposites as a dry powder formulation for inhalation, a new strategy for pulmonary arterial hypertension treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 133, 275-286.
26. Başkurt, M., Küçüköğlü, M.S. (2010). Pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisinde prostanoidler. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*, 10(2), 2-8.
27. Galiè, N., Palazzini, M., Leci, E., Manes, A. (2010). Current therapeutic approaches to pulmonary arterial hypertension. *Revista Española de Cardiología*, 63(6), 708-24.
28. Hoepfer, M.M., Dinh-Xuan, A.T. (2004). Combination therapy for pulmonary arterial hypertension: Still more questions than answers. *European Respiratory Journal*, 24, 339-340.
29. Okutucu, S., Tokgözoğlu, L. (2010). Güncel kılavuzlar ışığında pulmoner hipertansiyonda tedavi algoritmaları. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*, 10(2), 19-26.
30. Huertas, A., Tu, L., Guignabert, C. (2017). New targets for pulmonary arterial hypertension: Going beyond the currently targeted three pathways. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 23(5), 377-385.
31. Duong-Quy, S., Bei, Y., Liu, Z., Dinh-Xuan, A.T. (2013). Role of rho-kinase and its inhibitors in pulmonary hypertension. *Pharmacology & Therapeutics*, 137, 352-364.
32. Pacaud, P., Loirand, G. (2010). Rho kinase inhibitors for pulmonary hypertension: Waiting for clinical evidence. *European Respiratory Journal*, 36, 709-711.
33. Barman, S.A., Zhu, S., White, R.E. (2009). RhoA/Rho-kinase signaling: A therapeutic target in pulmonary hypertension. *Vascular Health and Risk Management*, 5, 663-671.
34. Gupta, V., Gupta, N., Shaik, I.H., Mehvar, R., McMurtry, I.F., Oka, M., Nozik-Grayck E., Komatsu, M., Ahsan, F. (2013). Liposomal fasudil, a rho-kinase inhibitor, for prolonged pulmonary preferential vasodilation in pulmonary arterial hypertension. *Journal of Controlled Release*, 167(2), 189-199.
35. Godinas, L., Guignabert, C., Seferian, A., Perros, F., Bergot, E., Sibille Y., Humbert, M., Montani, D. (2013). Tyrosine kinase inhibitors in pulmonary arterial hypertension: A double-edge sword?. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 34, 714-724.
36. Alkhatib, Y., Albashaireh, D., Al-Aqtash, T., Awdish, R. (2016). The role of tyrosine kinase inhibitor “lapatinib” in pulmonary hypertension. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 37, 81-84.
37. Akagi, S., Nakamura, K., Miura, D., Saito, Y., Matsubara, H., Ogawa, A., Matoba, T., Egashira, K., Ito, H. (2015). Delivery of imatinib-incorporated nanoparticles into lungs suppresses the development of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *International Heart Journal*, 56, 354-359.

38. Petkov, V., Mosgoeller, W., Ziesche, R., Raderer, M., Stiebellehner, L., Vonbank, K., Funk, G., Hamilton, G., Novotny, C., Burian, B., Block, L. (2003). Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *The Journal of Clinical Investigation*, *111*, 1339-1346.
39. Leuchte, H.H., Baezner, C., Baumgartner, R.A., Bevec, D., Bacher, G., Neurohr, C., Behr, J. (2008). Inhalation of vasoactive intestinal peptide in pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*, *32*, 1289-1294.
40. Hajos, F., Stark, B., Hensler, S., Prassl, R., Mosgoeller, W. (2008). Inhalable liposomal formulation for vasoactive intestinal peptide. *International Journal of Pharmaceutics*, *357*, 286-294.
41. Chen, H., Strappe, P., Chen, S., Wang, L. (2014). Endothelial progenitor cells and pulmonary arterial hypertension. *Heart, Lung and Circulation*, *23*, 595-601.
42. Sun, H., Li, G., Du, Z., Bing, Z., Ji, Z., Luo, G., Pan, S. (2019). The relationship between endothelial progenitor cells and pulmonary arterial hypertension in children with congenital heart disease. *BMC Pediatrics*, *19*(1), 1-6.
43. Diller, G., Thum, T., Wilkins, M.R., Wharton, J. (2010). Endothelial progenitor cells in pulmonary arterial hypertension. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *20*, 22-29.
44. Fadini, G.P., Avogaro, A., Ferraccioli, G., Agostini, C. (2010). Endothelial progenitors in pulmonary hypertension: New pathophysiology and therapeutic implications. *European Respiratory Journal*, *35*, 418-425.
45. Nagaya, N., Kangawa, K., Kanda, M., Uematsu, M., Horio, T., Fukuyama, N., Hino, J., Harada-Shiba, M., Okumura, H., Tabata, Y., Mochizuki, N., Chiba, Y., Nishioka, K., Miyatake, K., Asahara, T., Hara, H., Mori, H. (2003). Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation*, *108*, 889-895.
46. Rothman, A., Restrepo, H., Sarukhanov, V., Evans, W.N., Wiencek, R.G., Williams, R., Hamburger, N., Anderson, K., Balsara, J., Mann, D. (2017). Assessment of microRNA and gene dysregulation in pulmonary hypertension by endoarterial biopsy. *Pulmonary Circulation*, *2017*, *7*(2), 455-464.
47. Sun, M., Yang, Q. (2013). Role of microRNAs in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Cardiovascular Pharmacology*, *3*(1), 1-3.
48. Santulli, G. (2015). *microRNA: Medical Evidence From Molecular Biology to Clinical Practice*. Volume 888, Springer International Publishing, Switzerland, p.237.
49. Miao, C., Chang, J., Zhang, G. (2018). Recent research progress of microRNAs in hypertension pathogenesis, with a focus on the roles of miRNAs in pulmonary arterial hypertension. *Molecular Biology Reports*, *45*, 2883-2896.
50. McLendon, J.M., Joshi, S.R., Sparks, J., Matar, M., Fewell, J.G., Abe, K., Oka, M., McMurtry, I.F., Gerthoffer, W.T. (2015). Lipid nanoparticle delivery of a microRNA-145 inhibitor improves experimental pulmonary hypertension. *Journal of Controlled Release*, *210*, 67-75.