

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: Experimentální chirurgie



MUDr. Roman Mizera

Experimentální embolie plicního řečiště – patofyziologické mechanismy

Experimental pulmonary embolism – pathophysiological aspects

Disertační práce

Školitel:

prof. MUDr. Jan Herget DrSc.

Praha 2015

OBSAH:

ABSTRAKT.....	4
ABSTRACT.....	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	6
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
1.1. Mechanická obstrukce.....	10
1.2. Vazokonstrikce.....	11
1.2.1. Neurogenní složka vazokonstrikce.....	12
1.2.2. Trombocytární složka vazokonstrikce.....	13
1.2.3. Endoteliální složka vazokonstrikce.....	15
1.3. Volné kyslíkové radikály (ROS).....	17
1.3.1. Vznik ROS při plicní embolii.....	17
1.3.2 Podíl ROS na vazokonstrikci po PE.....	19
1.4. Závěr teoretické části.....	21
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	23
2.1. Úvod experimentální části.....	23
2.2. SCAVENGER KYSLÍKOVÝCH RADIKÁLŮ TEMPOL SNIŽUJE PERFUZNÍ TLAK, VAZOKONSTRIKCI A AKTIVITU NO SYNTÁZY V PLICNÍ CIRKULACI PO AKUTNÍ PE.....	25
2.2.1. Cíle studie.....	25
2.2.2. Metoda.....	25
2.2.3. Výsledky.....	30
2.2.4. Zhodnocení výsledků a dílčí závěr.....	34

2.3. SILDENAFIL SNIŽUJE PLICNÍ HYPERTENZI PO AKUTNÍ PLICNÍ EMBOLII PŘI CHRONICKÉ HYPOXII	35
2.3.1. Cíle studie.....	35
2.3.2. Metoda	36
2.3.3. Výsledky	38
2.3.4. Zhodnocení výsledků a dílčí závěr.....	41
<u> 2.4. AKTIVACE KCNQ KANÁLŮ BRÁNÍ ROZVOJI HYPOXICKÉ PLICNÍ HYPERTENZE</u>	<u>42</u>
<u> 2.4.1. Cíle studie</u>	<u>42</u>
<u> 2.4.2. Metoda</u>	<u>43</u>
<u> 2.4.3. Výsledky.....</u>	<u>45</u>
<u> 2.4.4. Zhodnocení výsledků a dílčí závěr.....</u>	<u>47</u>
3. CELKOVÉ SHRUTÍ VÝSLEDKŮ, ZÁVĚR.....	49
REFERENCE.....	54
PŘÍLOHA 1.....	61
PŘÍLOHA 2.....	71

ABSTRAKT

Teoretická část disertační práce se zabývá mechanismy vzniku plicní hypertenze po plicní embolii (PE) a shrnuje poznatky z literárních pramenů v této problematice. Okrajově se věnuje mechanické obstrukci plicního cévního řečiště, podrobně rozebírá vazokonstrikční odpověď plicních cév na PE. Důraz je kladen na roli reaktivních sloučenin kyslíku (ROS) a NO při vzniku vazokonstrikce po PE. V experimentální části jsou popsány tři samostatné experimenty. První experiment testoval vliv ROS a preventivní podání jejich scavengeru – inhibitoru superoxiddismutázy tempolu na bazální perfuzní tlak, vazokonstrikci, aktivitu NO syntázy a produkci NO_x po akutní PE. Výsledky dokazují, že po PE roste aktivita NO syntázy i produkce NO_x, podání Tempolu snižuje bazální perfuzní tlak i vazokonstrikci po PE. Ve druhém experimentu jsme měřili bazální perfuzní tlak a vazokonstrikci po PE, které předcházela 5denní chronická hypoxie, za těchto podmínek jsme testovali ovlivnění poddajnosti plicních cév po podání inhibitoru PDE-5 sildenafilu. Sildenafil snížil bazální perfuzní tlak po PE při chronické hypoxie, jeho podání neovlivňuje vazokonstrikci plicních cév, ale zvyšuje jejich poddajnost. Poslední pokus testoval vliv aktivátoru K⁺ kanálů flupirtinu na hypoxickou plicní hypertenzi. Analýzou P/Q křivky jsme zjistili, že flupirtin snižuje plicní cévní rezistenci, ale neovlivňuje kritický otevírací tlak plicních cév. Disertační práce shrnuje dosavadní poznatky v oblasti plicní hypertenze po PE a rozšiřuje je o výsledky experimentů autora.

ABSTRACT

Theoretical part of the thesis deals with mechanisms of pulmonary hypertension after pulmonary embolism (PE) and summarizes the knowledge of literary sources in this issue. Peripherally deals with the mechanical obstruction of pulmonary vessels, particularly discusses vasoconstriction after the PE. In the experimental part are described three separate experiments. The first experiment tested effect of reactive oxygen species (ROS) and preventive administration their scavenger - superoxide dismutase inhibitor tempol on basal perfusion pressure, vasoconstriction, NO synthase activity and the production of NO_x after acute PE. Results show that after PE grows NO synthase activity and the production of NO_x, the administration of tempol reduces basal perfusion pressure and vasoconstriction after PE. In the second experiment, we measured basal perfusion pressure and vasoconstriction after PE in lungs exposed to 5 day chronic hypoxia. We tested influence of PDE-5 inhibitor sildenafil on the pulmonary vessels tone. Sildenafil decreased basal pressure after PE in chronic hypoxia, its administration does not affect the pulmonary vasoconstriction of pulmonary vessels, but increases their compliance. The last project tested effect of K⁺ channels activator flupirtin in hypoxic pulmonary hypertension. Analysis of P/Q line, we found that flupirtin reduces pulmonary vascular resistance. The thesis summarizes existing knowledge in the field of pulmonary hypertension after PE and upgrades them by results of author's experiments.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ET-1 – endothelin 1

HPV – hypoxická plicní vazokonstrikce

cGMP – cyklický guanosinmonofosfát

CHOPN – chronická obstrukční plicní nemoc

METC – transportní elektronový řetězec na membráně mitochondrií

MMP – matrix-metalo-proteinázy

NAD(P)H – nikotinamid adenin dinukleotid fosfát

NO – oxid dusný

NO_x – oxidační formy NO

PAF – destičky aktivující faktor

PAP – arteriální plicní tlak

PDE-5 – fosfodiesteráza 5

PE – plicní embolie

PEEP – pozitivní endexpiratorní tlak

PG-I₂ – prostacyklin

PIP – pozitivní inspirační tlak

PMN – polymorfonukleární leukocyty

ROS – reaktivní sloučeniny kyslíku

SOD – superoxiddismutáza

tPA – aktivátor tkáňového plasminogenu

Tx-A₂ – tromboxan A₂

5-HT – 5-hydroxytryptamin

1. TEORETICKÁ ČÁST

Akutní plicní embolie je život ohrožující onemocnění s incidencí 0,5-1/1000/rok a představuje po infarktu myokardu a cévní mozkové příhodě třetí nejčastější příčinu úmrtí na kardiovaskulární onemocnění v Evropě. Patří mezi nejzávažnější pooperační komplikace zejména po operacích velkých kloubů a dlouhých kostí. PE patří mezi významné příčiny morbidit a mortality hospitalizovaných pacientů (10 % všech úmrtí v nemocnici), zejména v důsledku vzestupu tlaku v plicním cévním řečišti s následným akutním pravostranným srdečním selháním (Torbicki, 2008; Widimský J., 2011). Déletrvající sukcesivní mikroembolizace vede k nárůstu plicní cévní rezistence a vzniku plicní hypertenze s následkem chronického pravostranného srdečního selhávání. Na vzniku a rozvoji plicní hypertenze po PE se podílí 2 hlavní mechanismy - mechanická obstrukce embolem a vazokonstrikce plicních cév (Stratmann And Gregory, 2003).

Obvyklé terapeutické zásahy se zaměřují na ovlivnění obstrukční složky plicní hypertenze. Metodou první volby při PE, pokud není pacient kontraindikován, je trombolýza tPA kombinovaná s antikoagulační terapií nízkomolekulárním heparinem. V indikovaných případech je možné připojit chirurgické řešení – embolektomii (Torbicki, 2008). Přes četné experimentální výsledky s inhalací NO či podáváním sildenafilu (Gries et

al., 1997; Tanus-Santos et al., 1999) nebyla dosud do klinické praxe zavedena terapie vazokonstrikční složky plicní hypertenze. Jedinou léčebnou metodou, která mimo jiné ovlivňuje i vazokonstrikční složku plicní hypertenze je oxygenoterapie.

Mimo zvýšení plicní cévní rezistence narušuje akutní PE funkci plic i jinými mechanismy. Při plicní embolii vzniká plicní edém a atelektázy, což vede ke snížení plicní poddajnosti a také k poruchám výměny plynů na alveolokapilární membráně - snižuje se difúzní kapacita plic (Elliot, 1992). Dále dochází ke zvýšení odporu dýchacích cest, popsán byl vliv uvolněného serotoninu na odpor dýchacích cest při PE (Thomas et al., 1964). Zároveň se při počátečních fázích masivní plicní embolie rozvíjí významná hyperventilace, která ustává až po vyčerpání respiračních svalů. Patrně nejvýznamnější změnou plicních funkcí po PE je narušení ventilačně perfuzní rovnováhy. V alveolech kolem embolizované části plicního řečiště se nachází mrtvý prostor, zatímco v neembolizované části řečiště vlivem hypercirkulace vzniká venózní příměs. Dále dochází k otevírání intrapulmonálních a intrakardiálních zkratů. (Elliott, 1992) Výsledkem všech těchto změn je arteriální hypoxemie (Haynes, Iseman, 1979), která PE provází. Koncentrace CO_2 v krvi je při plicní embolii nezměněná, stoupá až v terminálních fázích pravostranného srdečního selhání.

1.1. Mechanická obstrukce

Nejčastější příčinou PE je trombóza hlubokých žil dolních končetin nebo pánevních žilních pletení, embolizace trombu z jiných oblastí žilního řečiště je vzácná (Torbicki, 2008). Druhou nejčastější, i když nepoměrně vzácnější, je embolie tuková, která se vyskytuje jako komplikace fraktur dlouhých kostí a velkých ortopedických operací (náhrady kloubů, nitrodřeňové osteosyntézy). Dále je popisována embolie vzduchová, embolie nádorových hmot, embolie plodové vody a embolie cizích těles (katétrů). Plicní hypertenze následující prostou mechanickou obstrukci plicního řečiště embolem má jednoduchý mechanismus vzniku – při zachování srdečního výdeje dochází před překážkou (embolem) ke zvyšování tlaku v dané cévě. Celkové zvýšení PAP nastává již při obstrukci 25-30 %, pokud je obstrukce způsobena tromboembolem (Wood, 2002). Při embolizaci hmoty netrombogenního původu (tuk, sephadex v experimentu) je třeba obstrukce 60-70 % plicního cévního řečiště ke zvýšení PAP (Nelson, Smith, 1959). Z tohoto vyplývá, že látky uvolněné z tromboembolu hrají významnou roli při vzniku plicní hypertenze a že plicní hypertenze po PE vzniká i jinými mechanismy než jen prostou mechanickou obstrukcí.

1.2. Vazokonstrikce

Tonus plicních cév je v klidovém stavu velmi nízký, cévy jsou maximálně dilatovány. Tento stav je způsoben jednak specifickou stavbou plicních cév a dále převahou vazodilatačních faktorů nad vazokonstrikčními. Stavba stěny prekapilárních plicních cév se výrazně liší od stěny prekapilárních cév stejného rozměru v systémovém oběhu. U větších plicních tepen se mezi subendoteliální elastickou laminou a adventicií nachází pouze jedna tenká vrstva hladké svaloviny, směrem k periférii se lamina muscularis stává neúplnou a neobklopuje celý obvod cévy. Tato morfologická odlišnost zaručuje plicním cévám zdravého jedince vysokou poddajnost a nízký hemodynamický odpor. Z vazodilatačních faktorů tlumících vazokonstrikční reaktivitu plicních cév a udržujících nízký cévní tonus je třeba zmínit zejména oxid dusný a prostacyklin.

Poprvé se o vazokonstrikci v souvislosti s PE zmiňuje Comroe v roce 1953 (Comroe, 1953), její podstata však doposud nebyla plně objasněna. Mechanizmů, které ji způsobují, je celá řada a vzájemně spolu interagují. Vazokonstrikce po PE má 3 hlavní složky: neurogení, endoteliální a tromboticko-leukocytární (popis jejich patofyziologického mechanismu viz níže). Propojení mezi posledními dvěma jmenovanými je velmi úzké – působky uvolněné z trombocytů a leukocytů ovlivňují

endotel plicních cév a naopak funkční endotel brání rozvoji trombu v plicní cévě. Nedílnou součástí akutní PE je také hypoxie (vznik viz výše), která způsobuje vznik hypoxické plicní vazokonstrikce. Ta za normálních podmínek snižuje průtok v plicních cévách hůře ventilovaných oblastí plic a zefektivňuje výměnu plynů zlepšením ventilačně perfuzního poměru. Při PE jsou hypoxické neembolizované části plic a HPV tak nevede k redistribuci, ale pouze ke zvýšení perfuzního tlaku.

1.2.1. Neurogení složka vazokonstrikce

Akutní PE vyvolává tzv. Bezold-Jarischův reflex (apnoe, bradykardie, hypotenze), který může být jednou z příčin úmrtí na masivní plicní embolii. Reflex vzniká podrážděním chemoreceptorů, šíří se cestou n. vagus a reflexně vyvolává výše uvedené příznaky (Chen, Kou, 2000). Zablokování tohoto reflexu však nevede k poklesu tlaku v plicnici po PE a také preventivní vagotomie nedokáže zabránit vzestupu PAP po PE (Chen, Kou, 2000). Naproti tomu preventivní sympatektomie (blokáda ganglion stellatum) snižuje vazokonstrikční odpověď po akutní plicní embolii (Bageant, Raper, 1947). Vazokonstrikce na neurogením podkladě se tedy šíří cestou sympatiku, celá řada pokusů na izolovaných

a tedy denervovaných plicích však prokazuje minoritní význam reflexní složky plicní vazokonstrikce.

1.2.2. Trombocytární složka vazokonstrikce

Jedním z hlavních vazokonstrikčních činitelů, uvolňovaných z denzních granulí aktivovaných trombocytů, je 5-hydroxytryptamin (Thomas, Vane, 1967). Ten je v plicním řečišti metabolizován. Při PE dochází k redukci perfundované části plicního řečiště, a tedy i k redukci plochy určené pro metabolizaci 5-HT, plazmatická hladina 5-HT stoupá. 5-HT působí jednak zvýšenou agregaci a adherenci trombocytů a také tlumí uvolňování prostacyklinu (PG-I₂) – důležitého vazodilatačního působku (Thomas, Vane, 1967; Utsunomiya et al., 1981).

Dalším vazokonstrikčním agens uvolňovaným z trombocytů v embolu je tromboxan A₂ (Tx-A₂). Tx-A₂ má proagregační efekt, zvyšuje hladinu 5-HT a ovlivňuje produkci endoteliálních vazodilatačních faktorů – zejména PG-I₂ (Szabo et al., 1983). V aktivovaných trombocytech se při PE tvoří ADP, který cestou G proteinu aktivuje membránovou fosfolipázu. Ta tvoří z fosfatidylcholinu arachidonovou kyselinu, která je substrátem pro cyklooxygenázou tvořené prostaglandiny, které mají vazokonstrikční vliv na plicní cévní řečiště (Tanus-Santos et al., 2000).

Trombocytární růstový faktor (PDGF) je dalším z řady vazokonstrikčních faktorů pocházejícím z trombocytů. Sám je vazokonstriktorem, aktivuje ostatní vazokonstrikční látky a podílí se na remodelaci stěny cév (Deuel et al., 1985, Coughlin et al., 1980).

Dalším z řady vazokonstrikčních agens vyskytujících se v embolu je trombin, jeho úloha v procesu vazokonstrikce plicních cév je dvojitá: přímá – trombin působí vazokonstrikčně (Glusa et al., 1996) a nepřímá – trombin aktivuje fosfolipázy A₂ a C v trombocytech a endoteliích plicních cév, což vede k produkci prostaglandinů a leukotrienů s převažujícím vazokonstrikčním efektem (Perlman et al., 1989). V literatuře je však zmiňováno i vazodilatační působení trombinu, zejména ovlivněním produkce PG-I₂ a NO (Sato et al., 1999), vazokonstrikční efekt však převažuje. Významnou roli hraje i produkce destičky aktivujícího faktoru (PAF) v trombocytech a polymorfonukleárních leukocytech. PAF aktivuje zároveň trombocyty i PMN, zvyšuje produkci endotelinu a snižuje produkci NO endotelem plicních cév, čímž významně přispívá k jejich vazokonstrikční odpovědi na PE (Clavijo et al., 2000).

1.2.3. Endoteliální složka vazokonstrikce

Endotel plicních cév hraje při PE klíčovou roli. Pokud je nepoškozen, působí vazodilatačně a antikoagulačně. Naopak každé poškození endotelu vede k vazokonstrikci a ke vzniku trombů na stěně plicních cév. K poškození endotelu plicních cév po PE dochází zejména díky zvýšenému střížnému napětí v neembolizovaných částech plicního řečiště, paradoxně i sníženému střížnému napětí v řečišti za embolem, aktivaci neutrofilů a hypoxii.

Nejsilnějším vazokonstrikčním agens uvolňovaným z endotelových buněk plicních cév je endotelin-1 (ET-1). Jeho hladina po PE stoupá vlivem hypoxie, střížného napětí, uvolňovaného angiotenzinu II a dalších faktorů – zvyšuje se jeho exprese a klesá clearance, která probíhá v plicním cévním řečišti. Jeho prekurzor, big endotelin, působí vazokonstrikci koronárních arterií a zhoršuje kardiovaskulární stabilitu po PE (Dschietzig et al., 1998). Ke zvýšení hladiny ET-1 přispívá i štěpení big endotelinu na ET-1 pomocí matrixových metaloproteináz (MMP) (Van den Steen et al., 2002; Fernandez-Patron et al., 2001), jejichž aktivaci způsobuje zvýšená koncentrace ROS po PE (Grote et al., 2003). Vazokonstrikční účinek ET-1 je jednak přímý přes receptory ET-A a ET-B a nepřímý – ET-1 zvyšuje aktivitu cyklooxygenázy, která produkuje Tx-A₂ (Schmeck et al., 1998).

Dalším z důležitých funkcí endotelu plicních cév je produkce NO a PG-I₂. NO se za klidových podmínek prakticky neprodukuje, jeho produkce se zvyšuje při zvýšení střížného napětí, hypoxii atd. NO působí vazodilatačně pomocí aktivace guanylátcyklázy, která zvyšuje hladinu c-GMP v cytosolu hladkých svalových buněk stěny plicních cév. Při vzestupu hladiny c-GMP klesá hladina Ca²⁺ a dochází k vazodilataci (Gries et al., 1997). V experimentech se opakovaně prokázalo, že inhalace NO snižuje plicní cévní rezistenci po PE (Gries et al., 1997; Tanus-Santos et al., 1999). Následkem zvýšené produkce NO může být však i vazokonstrikční efekt – při reakci NO s ROS dochází ke vzniku peroxinitritu, který je silným vazokonstriktoem plicního cévního řečiště. Je-li tedy produkováno více NO, může být důsledkem zvýšení hladiny peroxynitritu s převažujícím vazokonstrikčním efektem. PG-I₂ působí vazodilatačně na rozdíl od NO prostřednictvím c-AMP. PG-I₂ snižuje také hladinu vazokonstrikčně působícího 5-HT (Utsunomiya et al. 1981).

1.3. Volné kyslíkové radikály (ROS)

1.3.1. Vznik ROS při plicní embolii

Na vzniku kyslíkových radikálů při plicní embolii se podílí všechny buněčné elementy zainteresované v procesu vzniku plicní hypertenze po PE (trombocyty, leukocyty, endotelové a hladké svalové buňky stěny plicních cév). V literatuře jsou popsány celkem 4 různé mechanismy tvorby ROS po akutní PE:

1. zvýšení střížného napětí na stěnu plicních cév
2. snížení střížného napětí v embolizované části plicního cévního řečiště
3. uvolnění z aktivovaných leukocytů
4. hypoxie

Ad 1.:

Ke zvýšení mechanického napětí na stěnu plicních cév dochází při zachovaném srdečním výdeji v neembolizovaných částech plicního cévního řečiště. Následkem zvýšeného střížného napětí je upregulace Nox-1 podjednotky NAD(P)H oxidázy, která se nachází v cytosolu hladkých svalových buněk stěny plicních cév. Dochází rovněž ke zvýšení

exprese p47phox membránové podjednotky a její translokaci na membráně hladké svalové buňky (Grote et al., 2003). NAD(P)H oxidáza produkuje superoxid, kyslíkový radikál.

Ad 2.:

V oblastech, které jsou embolizací vyřazeny z cirkulace, klesá střížné napětí. Poté dochází opět k upregulaci NAD(P)H oxidázy a produkci superoxidu stejně jako v oblasti se zvýšeným průtokem (Fisher et al., 2002). Dále se v hladkých svalových buňkách neperfundovaných plicních cév zvyšuje intracelulární hladina Ca^{2+} , což vede ke konverzi xantin-dehydrogenázy na xantin-oxidázu, která produkuje ROS (Test et al., 1984; Fisher et al., 2002).

Ad 3.:

Zvýšená produkce PAF (destičky aktivujícího faktoru) a dalších cytokinů (viz výše) přispívá k aktivaci polymorfonukleárních a neutrofilních leukocytů, která vede k produkci ROS.

Ad 4.:

Při akutní plicní embolii se rozvíjí hypoxie. Četné experimentální studie prokázaly zvýšenou hladinu ROS při hypoxii (Liu et al., 2003). Dále bylo prokázáno, že z části za vzestup hladiny ROS při hypoxii

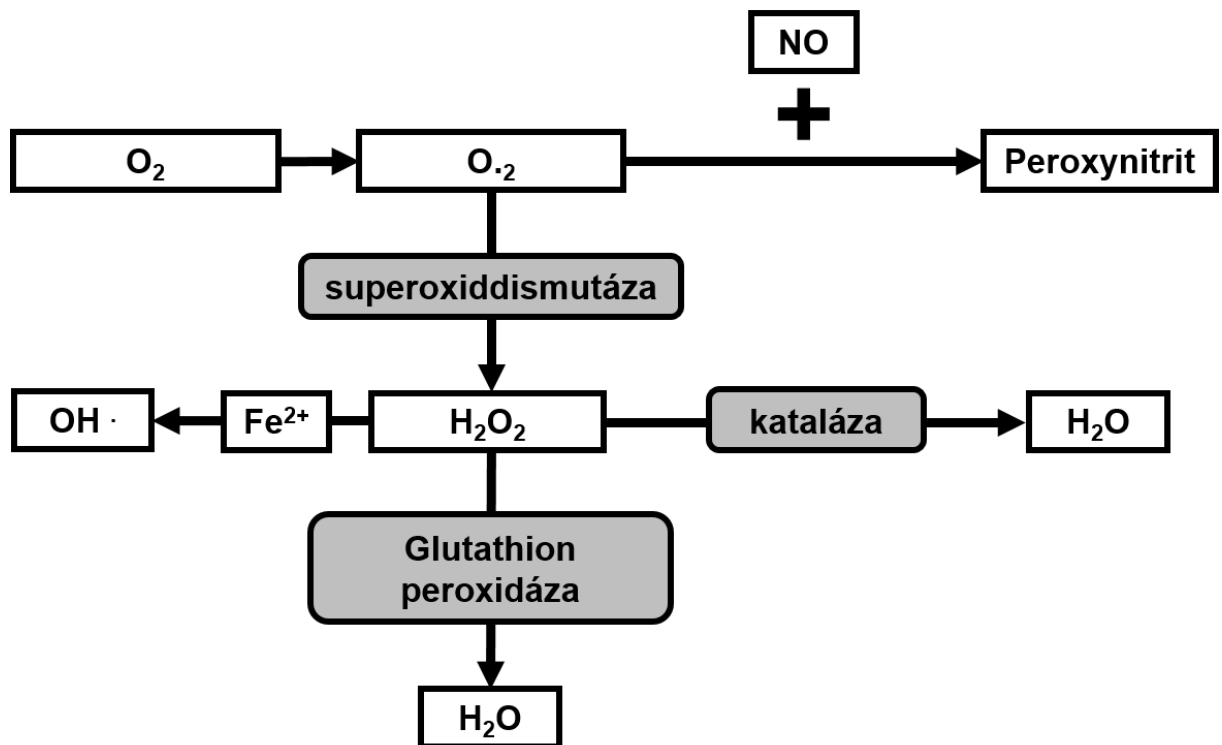
odpovídá upregulace NAD(P)H oxidázy (Gupte et al., 2005). Dalším zdrojem ROS při hypoxii je elektronový transportní řetězec na membráně mitochondrií – METC (Waypa, Schumacker, 2005).

1.3.2 Podíl ROS na vazokonstrikci po PE

Samotnou podstatou vazokonstrikce cév je kontrakce hladkých svalových buněk cévní stěny. Důležitou úlohu v udržení nízkého tonu plicních cév mají napětově řízené draslíkové kanály (např. Kv7) na membráně hladkých svalových buněk. Experimentální blokáda těchto kanálů vede v plicní cirkulaci k vazokonstrikci (Joshi et al. 2006). Kyslíkové radikály mají oxidační potenciál, oxidují cysteinové a methioninové zbytky napětově řízených K^+ kanálů, a tak způsobují jejich konformační změny. Inhibice těchto kanálů způsobuje depolarizaci buněčné membrány hladkých svalových buněk stěny plicních cév s následnou aktivací L-typu Ca^{2+} kanálů. Následuje influx Ca^{2+} iontů a vazokonstrikce plicních cév (Moudgil et al., 2005).

Při vzniku vazokonstrikce hraje také klíčovou roli vztah kyslíkových radikálů a NO. Superoxid reaguje s NO za vzniku peroxynitritu. Tato reakce probíhá velmi rychle, 4× rychleji než reakce superoxidu se superoxidodismutázou za vzniku peroxidu vodíku. Vytvořený peroxinitrit

má velmi silný vazokonstrikční efekt (Belik et al., 2004). Peroxid vodíku se za působení glutathionperoxidázy a katalázy rozpadá na vodu, za přítomnosti Fe^{2+} vzniká další z rodiny ROS – hydroxylový radikál.

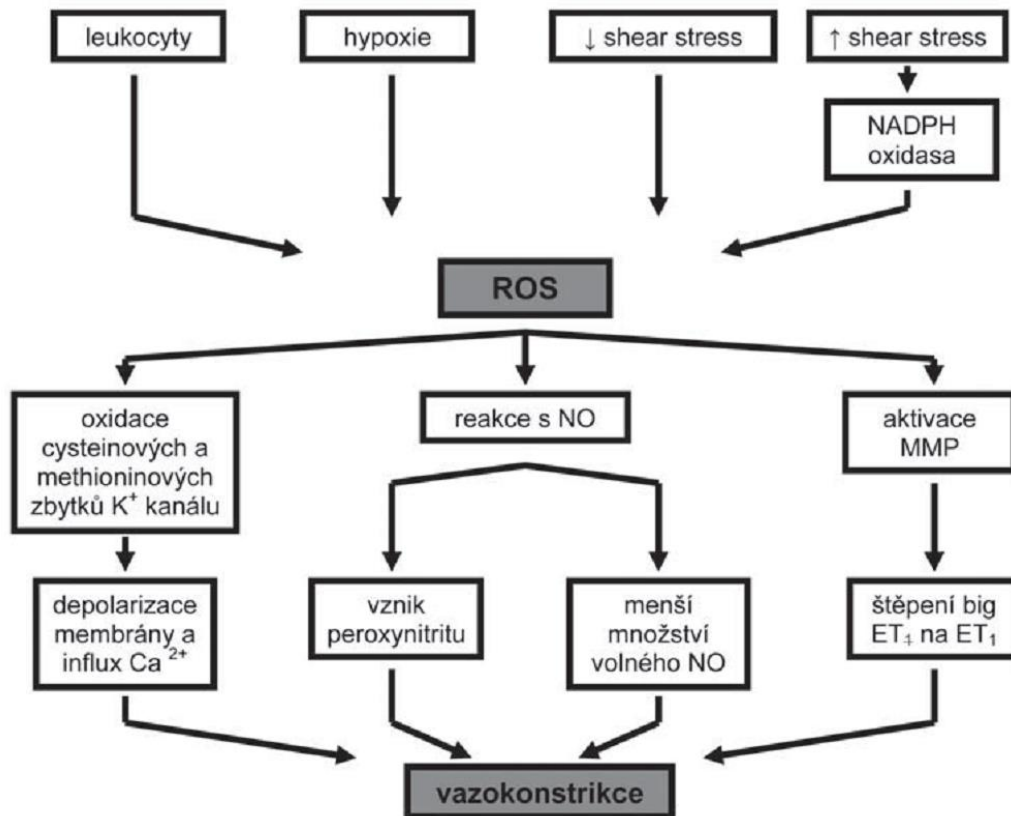


Obr. 1: Metabolismus ROS

Další z možností, jak ROS přispívají k vazokonstrikci po plicní embolii je aktivace systému RhoA/Rho kináz, která vede k senzitivaci Ca^{2+} kanálů (Jernigan *et al.* 2008, Shimokawa and Satoh 2014).

Kyslíkové radikály aktivují matrix-metalo-proteinázy (Grote et al., 2003). MMP mají význam zejména při chronickém působení – vedou k přestavbě stěny plicních cév a ke vzniku plicní hypertenze. Po akutní PE mohou aktivované MMP štěpit big endotelin na funkční endotelin-1, který působí vazokonstrikčně i v akutní fázi oxidačního stresu. Preventivní

podání inhibitoru MMP dokáže zmírnit hemodynamické změny po akutní PE (Palei et al., 2005).



Obr. 2: Vznik ROS po PE a jejich vliv na vazokonstrikci

1.4. Závěr teoretické části

Na vzniku plicní hypertenze po akutní plicní embolii se podílí celá řada patofyziologických mechanismů – od prosté mechanické obstrukce

plicních cév až po vazokonstrikci podmíněnou uvolněním výše uvedených vazokonstrikčních působků. Řada experimentálních prací ukazuje, že ovlivnění vazokonstrikční složky plicní hypertenze po akutní plicní embolii by se mohlo stát novým koadjuvantním terapeutickým postupem a rozšířit tak současné omezené možnosti léčby tohoto závažného onemocnění.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Úvod experimentální části

Jak bylo zmíněno v teoretickém úvodu disertační práce, klíčovou a dosud málo terapeuticky ovlivňovanou součástí plicní hypertenze po PE je vazokonstrikce plicních cév. Proto jsme se na snížení této vazokonstrikční složky zaměřili ve 3 experimentech.

První z nich vychází z poznatků, že plicní embolii provází u laboratorních zvířat oxidační poškození plicní tkáně (Dias-Junior *et al.* 2010). Klíčovým kyslíkovým radikálem přítomným u různých typů poškození plicní tkáně včetně PE je superoxid. Superoxid reaguje s NO za vzniku silně vazokonstrikčního peroxinitritu. Proto jsme použili Tempol (4 hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidin-1-oxyl), aktivátor superoxid dismutázy, který snižuje hladinu superoxidu.

Druhý experiment simuloval podmínky akutní PE v terénu chronické hypoxie. V klinické praxi by se dal přirovnat k pacientovi, který trpí chronickým plicním onemocněním (např. CHOPN) a prodělá akutní PE. Některé publikace naznačovali pozitivní efekt inhibitoru fosfodiesterázy 5 sildenafilu na zvýšení plicní poddajnosti po akutní PE (Dias-Junior *et al.* 2005). Sildenafil (1-((3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-

propyl-1H-pyrazolo-(4,3-d)-pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyfenyl)sulfonyl)-4-methylpiperazin) je selektivním inhibítozem PDE-5, snižuje odbourávání cGMP a tak potencuje vazodilatační účinek NO. Je součástí preparátu používaného na léčbu erektilní dysfunkce (Viagra[®]) a dále léčivých přípravků ovlivňujících primární plicní hypertenzi. Při preventivním podávání Sildenafilu jsme měřili vzestup poddajnosti plicních cév a tedy pokles plicní hypertenze po PE u zvířat vystavených 5denní chronické hypoxii.

Ve třetím experimentu jsme se snažili ovlivnit plicní cévní rezistenci a potažmo i vazokonstrikci způsobenou chronickou 5denní hypoxií aktivací KCNQ napěťově řízených draslíkových kanálů. Předpokládali jsme, že podávání selektivního aktivátoru KCNQ flupirtinu (ethyl(2-amino-6-((4-fluorobenzyl)amino)pyridin-3-yl)carbamát) v průběhu hypoxie sníží plicní cévní rezistenci.

2.2. SCAVENGER KYSLÍKOVÝCH RADIKÁLŮ TEMPOL SNIŽUJE PERFUZNÍ TLAK, VAZOKONSTRIKCI A AKTIVITU NO SYNTÁZY V PLICNÍ CIRKULACI PO AKUTNÍ PE

2.2.1. Cíle studie

Cílem experimentu bylo ověřit, zda se superoxid podílí na plicní vazokonstrikci po mikroembolizaci plic sephadexovými částicemi a zda aktivátor SOD Tempol sníží plicní hypertenzi po PE. Zaměřili jsme se na změny v perfuzním tlaku, přítomnosti vazokonstrikce, aktivitu NO syntázy a produkci oxidačních forem NO (NO_x) po PE.

Výsledky této studie byly zveřejněny v publikaci, která tvoří součást disertační práce (Příloha 1).

2.2.2. Metoda

V experimentu jsme použili 30 samců laboratorního potkana kmene Wistar (věk 7-8 týdnů, váha 240±20g). Práce se zvířaty byla prováděna v souladu s doporučeními European Community guidelines a US National Institute of Health guidelines for the use of experimental

animals. Všechny součásti experimentu byli předem konzultovány s Komisí pro práci s laboratorními zvířaty 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

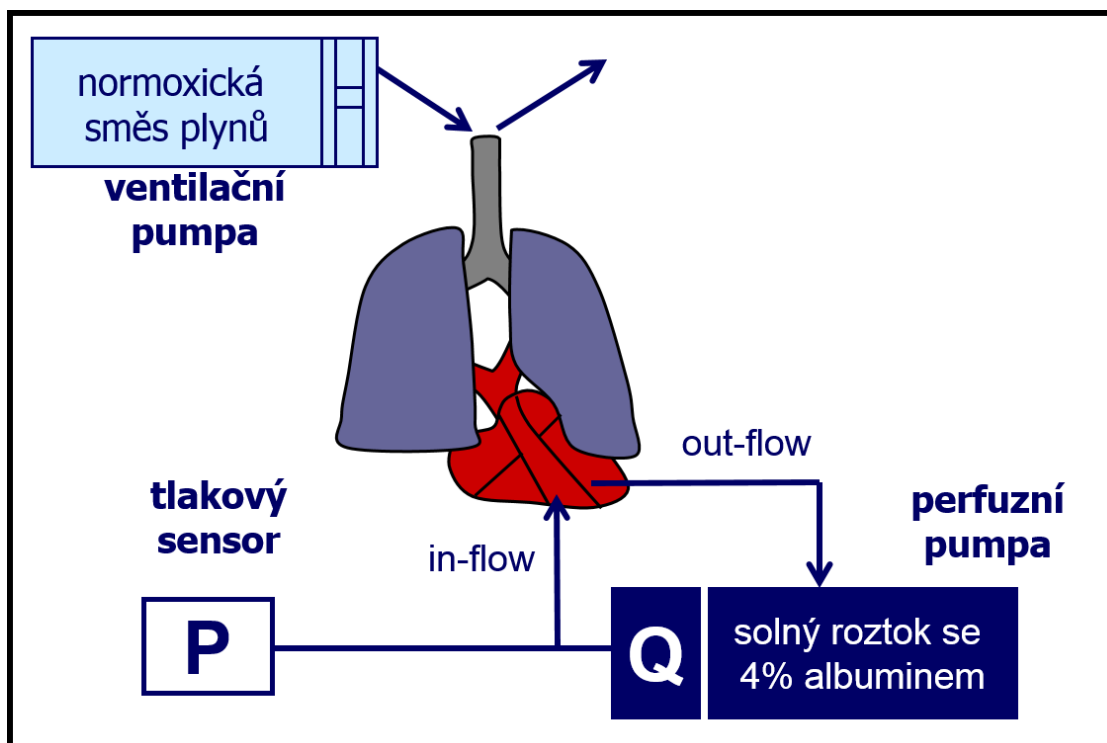
2.2.2.1. Mikroembolizace plicních cév

V celkové anestezii za použití intraperitoneální aplikace thiopentalu sodného v dávce 40mg/kg byla vypreparována pravá vena jugularis interna. Do této žíly bylo podáno 0,2 ml fyziologického roztoku, obsahujícího 320mg sephadexových mikrosferul (G-26). Sephadexové částice byly rozpuštěny v pufrovaném fyziologickém roztoku po dobu 12 hodin před samotným experimentem tak, aby nabobtnáním zvětšili svůj rozměr na definitivních 15 – 50 μm . Otevření hrudníku pro izolaci bloku srdce-plíce následovalo 20 minut po embolizaci. (Herget *et al.* 1982).

2.2.2.2. Preparace izolovaných plic laboratorního potkana

Po otevření hrudníku střední torakotomií jsme vypreparovali tracheu a zavedly tracheální kanylu. Plíce byly ventilovány normoxickou směsí plynů (21% O₂, 5% CO₂, 74% N₂) prostřednictvím implantované tracheální kanyly s následujícími ventilačními parametry: PEEP 2cm

H₂O, PIP 10 cm H₂O. Vtoková kanyla byla vložena do plícnice, výtoková do levé srdeční komory, následně byla plicní cirkulace perfundována solným roztokem s albuminem (4g/100 ml) za konstantního průtoku (4ml/min/100g). Celý blok srdce-plíce byl umístěn do vyhřívané vlhké komůrky. Perfuzát z výtokové kanyly volně odkapával do zásobníku, po kalibraci byl perfuzní tlak měřen na vtokové kanyle. Celý okruh byl vyhříván na teplotu 37°C. Funkční plicní cirkulaci jsme tonizovali podáním angiotenzinu II a dvojitou expozicí akutní hypoxii – obé s výraznou vazokonstrikční odpovědí. Po 20 minutách stabilizace odpovídají změny tlaku při konstantním průtoku změnám plicní cévní rezistence. (Herget and MC Murtry 1987, Hampl and Herget 1990).



Obr. 3: Preparát izolovaných perfundovaných plic laboratorního potkana

2.2.2.3. Experimentální protokol

Experimentální protokol byl rozdělen na 4 části (obr. 4):

a) Měření bazálního perfuzního tlaku

V této části experimentu byla zvířata rozdělena do 3 skupin: C – kontroly (n=10), E – zvířatům byla provedena před izolací plic mikroembolizace podle výše uvedeného popisu (kap. 2.2.2.1.) (n=10), ET – stejný postup jako ve skupině E, potkanům byl navíc před mikroembolizací aplikován Tempol intraperitoneálně v dávce 50mg/kg (n=10). Bazální perfuzní tlak byl měřen po 20 minutách stabilizace.

b) Přítomnost vazokonstrikce

Rozdělení zvířat do skupin bylo analogické jako v první části experimentu: CN – kontrolní skupina (n=5), EN – mikroembolizace předcházela izolaci plic (n=5), ETN - tempol byl aplikován ve stejné dávce před mikroembolizací jako v předchozí části experimentu (n=5). Po odečtení bazálního perfuzního tlaku jsme přidali do perfuzátu 0.5 ml 20uM roztoku nitroprusidu sodného v každé z výše uvedených skupin. Po 10 minutách působení nitroprusidu jsme znovu odečetli perfuzní tlak. Nitroprusid sodný je velmi silný vazodilatátor plicních cév, odbourá prakticky veškerou vazokonstrikci, rozdíl mezi hodnotami tlaku před a po

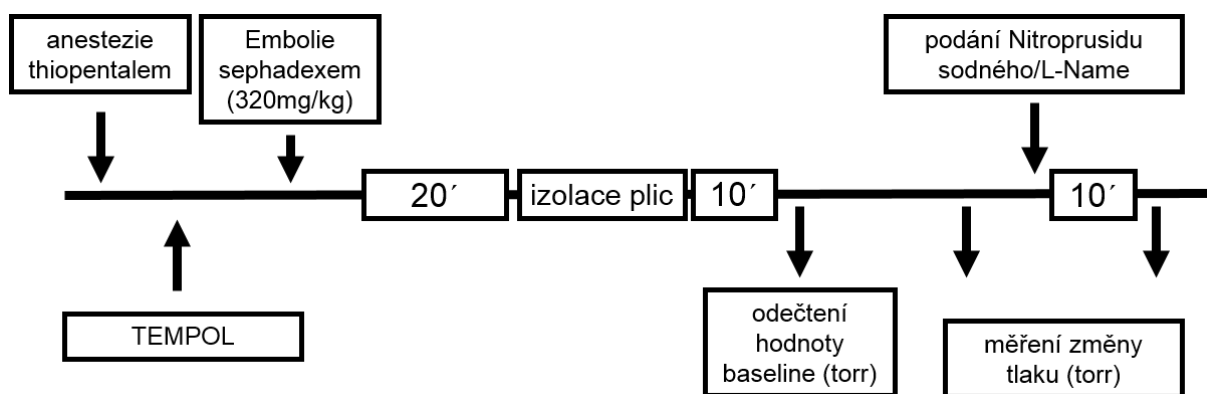
podání nitroprusidu tedy odpovídá plicnímu cévnímu tonu a přeneseně i vazokonstrikci plicních cév.

c) Produkce NO – aktivita NO syntázy

Zvířata byla opět rozdělena do 3 skupin: CL – kontrolní skupina (n=5), EL - mikroembolizace předcházela izolaci plic (n=5), ETL – tempol byl podán v dávce 50mg/kg před mikroembolizací (n=5). Po izolaci a stabilizaci plic byl do perfuzátu přidán L-Name (inhibitor NO syntázy) – koncentrace L-Name v perfuzátu byla 50uM. 10 minut po podání L-Name byl opět změřen perfuzní tlak – rozdíl mezi hodnotami před a po podání L-Name odpovídal efektu blokády produkce NO na plicní cirkulaci.

d) Koncentrace oxidačních produktů NO v plazmě

Z levé vena jugularis interna byla před mikroembolizací odebrána žilní krev u 11 potkanů, následovala mikrombolizace plicní cirkulace stejně jako u výše uvedených experimentů. Po 20 minutách stabilizace byl opět stejnou technikou ze stejného místa odebrán vzorek žilní krve. Vzorky jsme centrifugovali po dobu 3 minut na 5000 otáček/min, oddělená plasma byla hluboce zamražena. Takto zpracované vzorky jsme analyzovali na NO analyzátoru a stanovovali plasmatickou koncentraci nitritů a nitrátů (Sun *et al.* 2010, Hodyc *et al.* 2012).



Obr. 4: Schéma protokolu experimentu 1

2.2.2.4. Statistické zpracování výsledků

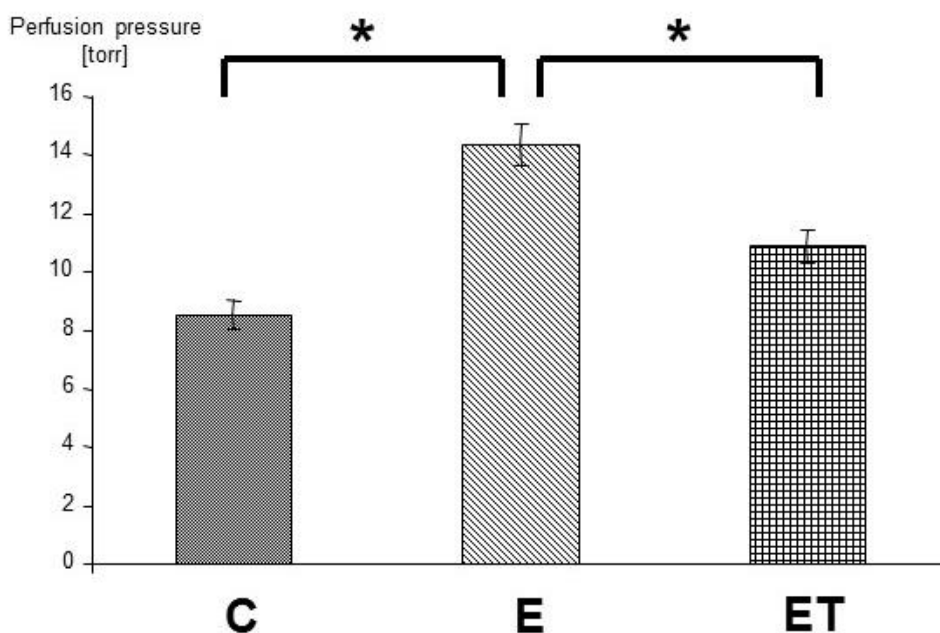
Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Office Excel s následnými testy dle Fishera (Fisher PLSD post hoc) a Scheffe. K vyhodnocení byl použit software StatView 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Výsledky jsou číselně vyjadřovány jako střední hodnoty \pm SE.

2.2.3. Výsledky

2.2.3.1. Tempol snižuje bazální perfuzní tlak po PE

V plicích izolovaných ze zvířat, která prodělala plicní embolii (E), je signifikantně vyšší perfuzní tlak než u kontrolní skupiny (C). Zvířata,

kterým byl aplikován tempol před provedením plicní embolie (ET) mají prokazatelně nižší perfuzní tlak než skupina s PE tempolem neléčená (E). Mezi kontrolní skupinou (C) a skupinou léčenou tempolem (ET) nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v perfuzním tlaku.

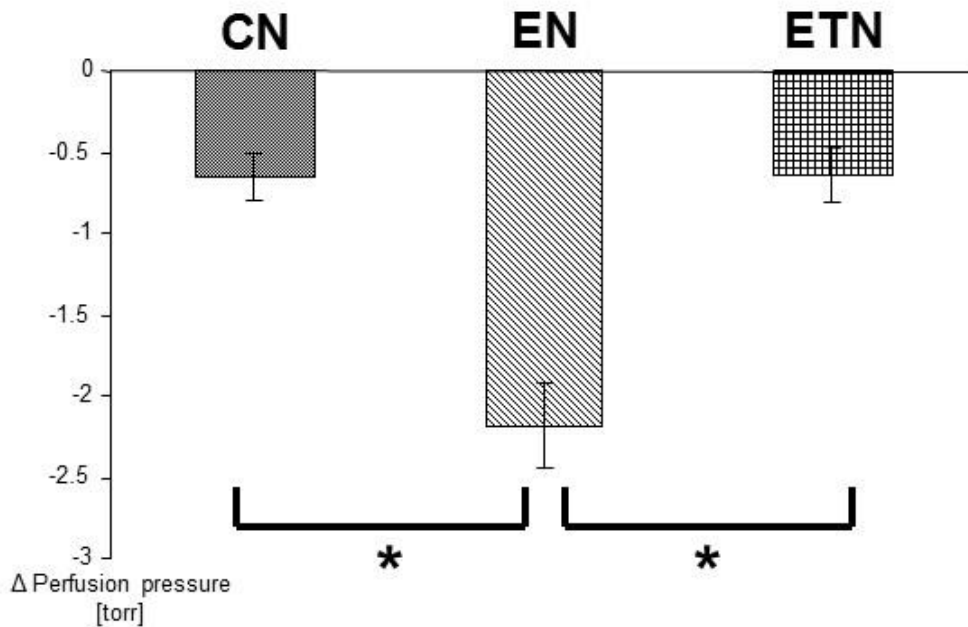


graf 1.: Tempol snižuje bazální perfuzní tlak po PE ($p < 0,01$)

2.2.3.2. Přítomnost vazokonstrikce

Ve skupině s plicní embolií (EN) jsme pozorovali signifikantně vyšší pokles perfuzního tlaku po přidání nitroprusidu sodného do perfuzátu než v kontrolní skupině (C). Vazodilatace navozená nitroprusidem se nelišila

mezi skupinou kontrolní (C) a skupinou, ve které byl tempol podán před PE (ETN).

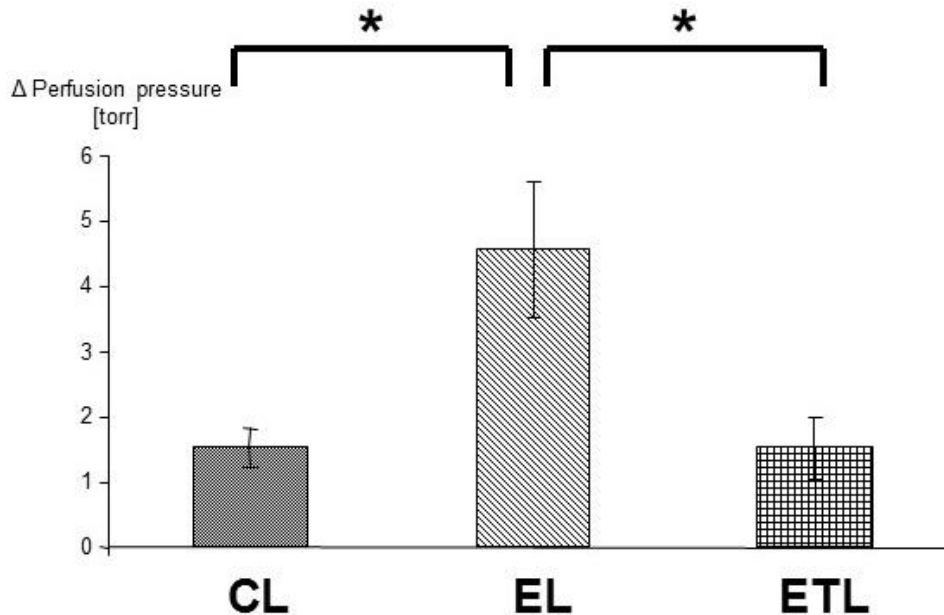


graf 2.: Efekt podání nitroprusidu sodného na perfuzní tlak (vyšší vazodilatace EN proti CN) dokládá vzestup vazokonstrikce po PE ($p < 0,05$)

2.2.3.3. Zvýšená aktivita NO syntázy po PE

Za použití obdobných skupin jako v předchozím experimentu jsme měřili změny perfuzního tlaku 10 minut po podání L-Name. Signifikantně vyšší vzestup tlaku po přidání L-Name byl naměřen ve skupině zvířat

vystavených plicní embolii (EL) proti kontrolní skupině (CL) a skupině s aplikovaným tempolem před PE (ETL).



graf 3.: Příčinnou vyššího vzestupu tlaku po podání L-Name ve skupině po PE (EL) je vyšší aktivita NO syntázy po PE ($p < 0,01$)

2.2.3.4. Zvýšená koncentrace NO_x v plazmě po PE

U všech zvířat vystavených plicní embolii byla koncentrace NO_x v plazmě vyšší po plicní embolii (průměr 24.62 μM) než před ní (průměr 22.3 μM). Koncentrace NO_x před a po embolii byla srovnávána samostatně pro každé zvíře a vyhodnocena párovým t-testem.

2.2.4. Zhodnocení výsledků a dílčí závěr

Hlavní závěry z tohoto experimentu jsou následující:

- vazokonstrikce, která se rozvíjí po akutní PE, je částečně způsobena vzestupem produkce ROS
- po PE roste aktivita NO syntázy a produkce NOx
- scavenger ROS tempol snižuje plicní hypertenzi i aktivitu NO syntázy po PE

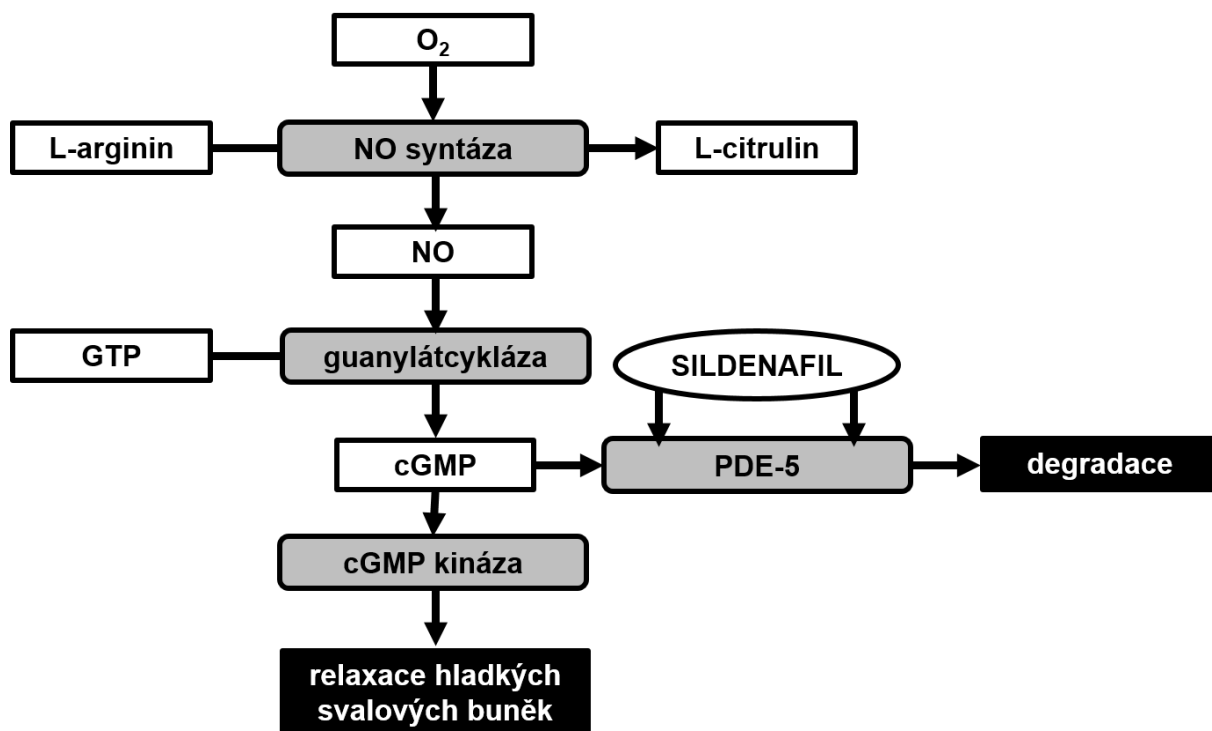
Výsledky studií zabývajících se problematikou plicní hypertenze ukazují na významnou roli ROS v plicní hypertenzi, doposud však nebylo spolehlivě prokázáno, jak ROS po PE vznikají a který z nich konkrétně způsobuje vazokonstrikci po PE. Jak bylo v našem pokusu prokázáno, po PE se zvyšuje jak produkce NO NO syntázou, tak i produkce superoxidu. Tyto dvě látky spolu reagují za vzniku peroxinititu, který má silný vazokonstrikční potenciál a mohl by tak být jednou z příčin vazokonstrikce po akutní PE.

2.3. SILDENAFIL SNIŽUJE PLICNÍ HYPERTENZI PO AKUTNÍ PLICNÍ EMBOLII PŘI CHRONICKÉ HYPOXII

2.3.1. Cíle studie

Zatímco při akutním působení hypoxie na stěnu plicních cév dochází k vazokonstrikci mechanismem dobře popsáným v literatuře jako hypoxická plicní vazokonstrikce, vliv dlouhodobé expozice hypoxií vede k remodelaci cévní stěny. Klíčové změny probíhají v tunika media – dochází k množení hladkých svalových buněk a ke snížení poddajnosti plicních cév. V našem experimentu jsme se snažili odpovědět na otázku, jaký vliv má akutní PE za podmínek již remodelované plicní cirkulace chronickou hypoxií. Dále jsme ověřovali účinnost inhibitoru fosfodiesterázy 5 sildenafilu na plicní hypertenzi po akutní plicní embolii. NO produkovaný NO syntázou endotelových buněk plicních cév udržuje nízký tonus plicních cév prostřednictvím cGMP. cGMP je však kontinuálně odbouráváno PDE-5 a tak vazodilatační účinek NO klesá (viz obr. 5).

Předpokládali jsme, že inhibice PDE-5 sníží plicní cévní tonus a tím i perfuzní tlak po akutní PE u zvířat vystavených chronické hypoxii.



Obr. 5: Vznik a působení NO, efekt inhibice PDE-5 sildenafilem

2.3.2. Metoda

V experimentu jsme použili 30 samců laboratorního potkana kmene Wistar. Práce s laboratorními zvířaty probíhala za stejných podmínek jako v prvním experimentu – opět byla schválena Komisí pro práci s laboratorními zvířaty 2. lékařské fakulty UK v Praze. Zvířata byla rozdělena do 5 skupin:

C – kontrolní skupina, (n=6)

H – zvířata byla vystavena 5 dní trvající chronické hypoxii v hypoxické komoře (10% O₂), (n=6)

E – po uvedení do celkové anestezie byla provedena mikroembolizace sephadexovými partikulami dle protokolu experimentu 1 (n=6)

EH – po expozici 5 denní chronické hypoxii následovala mikroembolizace plicní cirkulace (n=6)

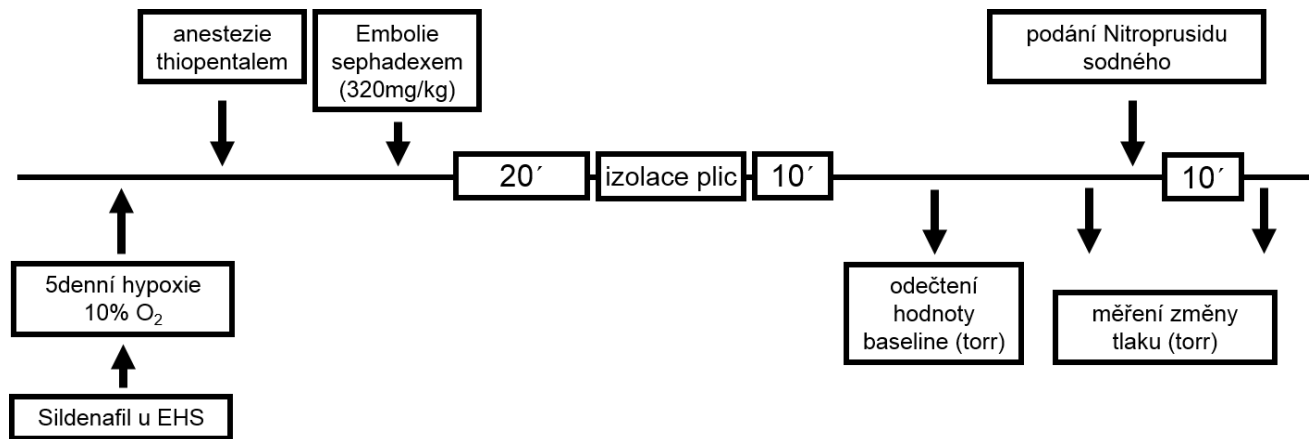
EHS – zvířatům byl v průběhu 5 denní chronické hypoxie podáván sildenafil v denní dávce 25mg/kg perorální formou, poté byla vystavena mikroembolizaci (n=6)

skupina	sildenafil 25mg/kg	5denní hypoxie	embolie	počet zvířat
C	-	-	-	6
E	-	-	+	6
H	-	+	-	6
EH	-	+	+	6
EHS	+	+	+	6

Tab. 1: Skupiny experimentu 2

Další postup pokusu byl pro všechny skupiny totožný. Ze všech zvířat byl vypreparován orgánový blok srdce-plíce, ventilovány a perfundovány jako v experimentu 1. Po 20 minutách stabilizace byl změřen bazální perfuzní tlak, poté následovalo podání nitroprusidu sodného a s odstupem 10 minut další měření perfuzního tlaku. Rozdíl mezi těmito hodnotami perfuzního tlaku odpovídal vazodilataci

způsobené nitroprusidem sodným a tedy aktuální míře vazokonstrikce plicní cirkulace.



Obr. 6: Schéma protokolu experimentu 2

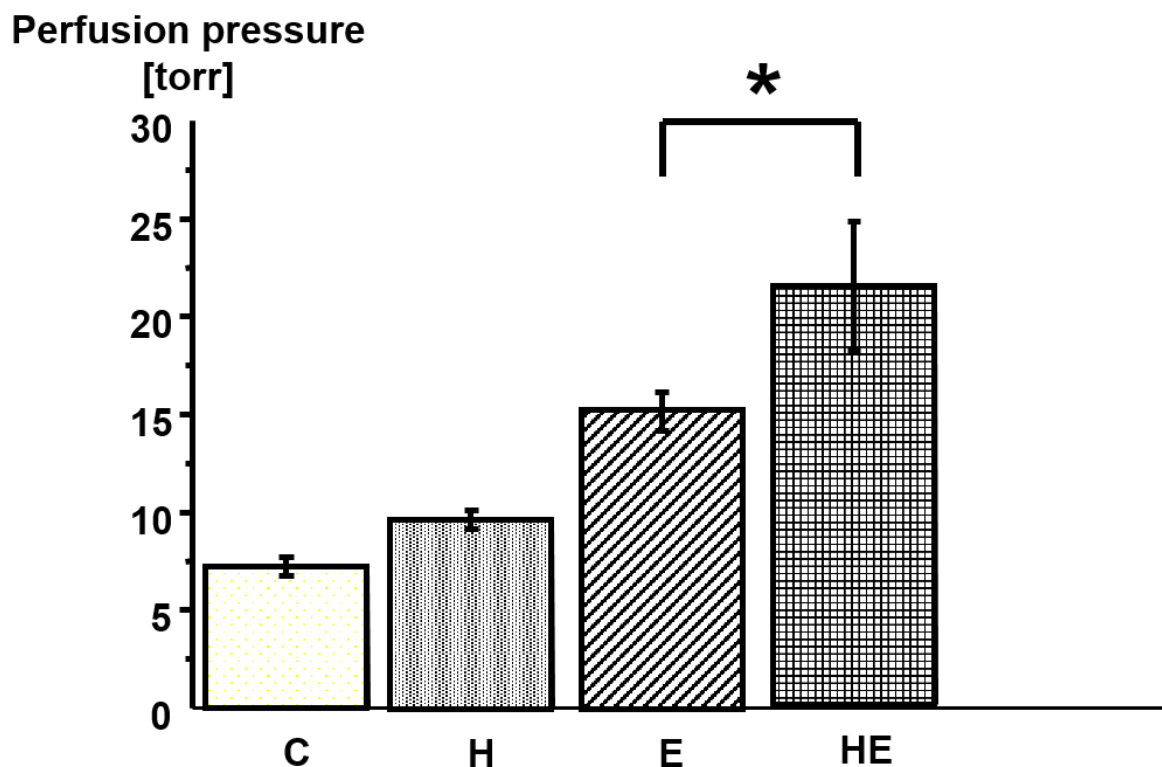
Výsledky byly stejně jako v experimentu I zpracovány v programu Microsoft Office Excel a vyhodnoceny za použití StatView 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Výsledky jsou číselně vyjadřovány jako střední hodnoty \pm SE.

2.3.3. Výsledky

2.3.3.1. Vyšší perfuzní tlak po PE při chronické hypoxii

Bazální perfuzní tlak po akutní PE byl signifikantně vyšší ve skupině, která byla před mikroembolizací vystavena chronické hypoxii

(HE) oproti skupině normoxických embolizovaných potkanů (E). Dle očekávání jsme naměřili vyšší perfuzní tlaky u skupiny po PE (E) i po chronické hypoxii (HE) ve srovnání s kontrolní skupinou (C).

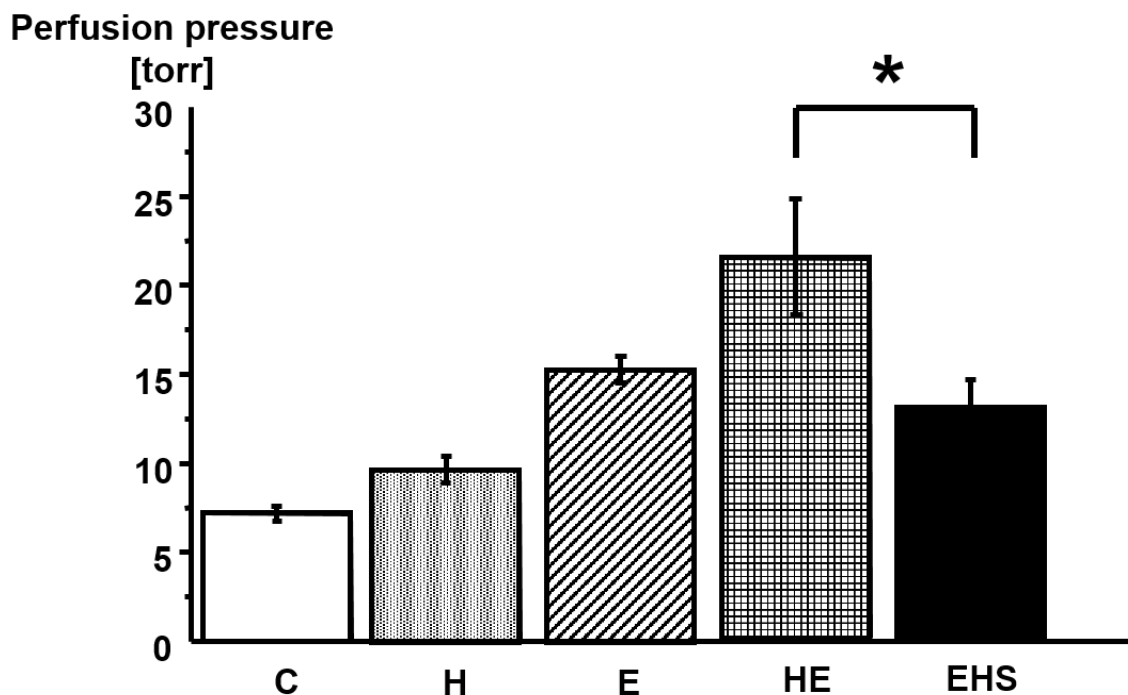


graf 4.: Signifikantně vyšší perfuzní tlak po akutní plicní embolii v terénu chronicky hypoxických plicních cév ($p < 0,01$)

2.3.3.2. Sildenafil snižuje perfuzní tlak po PE při chronické hypoxii

Ve skupině zvířat, které užívali Sildenafil po dobu 5 denní chronické hypoxie (EHS) byl naměřen signifikantně nižší perfuzní tlak po PE než ve skupině hypoxické sildenafilem neléčené (HE). Perfuzní tlak

sildenafilem léčené skupiny (EHS) se statisticky významně nelišil oproti ostatním skupinám (C, H, E).

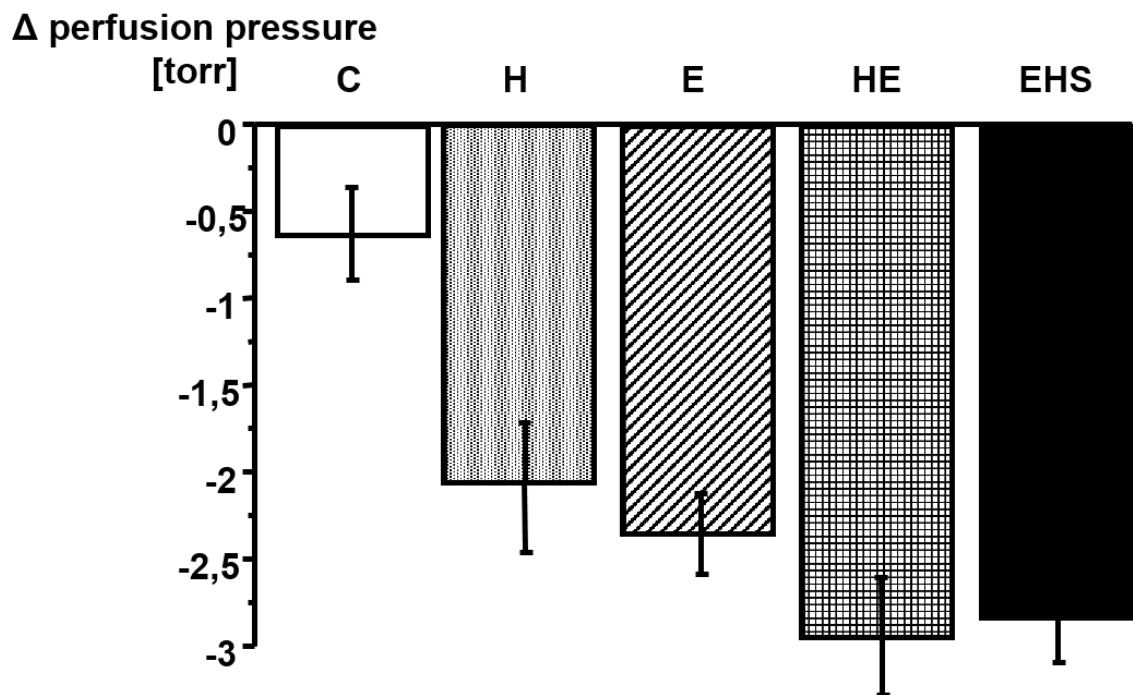


graf 5.: Signifikantně nižší perfuzní tlak po akutní plicní embolii v terénu chronicky hypoxických plicních cév u zvířat, které užívali Sildenafil ($p < 0,01$)

2.3.3.3. Nevýznamné rozdíly mezi skupinami ve vazokonstrukci po PE při chronické hypoxii

Mezi jednotlivými skupinami (E, H, HE, EHS) vyjma kontrol (C) nebyl staticky významný rozdíl v poklesu perfuzního tlaku po podání

nitroprusidu sodného. Míra vazokonstrikce se tedy u jednotlivých skupin prakticky nelišila.



graf 6.: Jednotlivé skupiny vyjma kontrol se nelišily v míře vazokonstrikce po akutní plicní embolii při chronické hypoxii

2.3.4. Zhodnocení výsledků a dílčí závěr

Z uvedených výsledků experimentu II vycházejí následující závěry:

- Po akutní plicní embolii je vyšší perfuzní tlak v plicních cévách u laboratorních potkanů vystavených 5denní hypoxii než u normoxických kontrol.

- Sildenafil snižuje plicní hypertenzi po akutní plicní embolii v terénu chronické hypoxie.
- Vazokonstrikce se neliší mezi skupinou léčenou a neléčenou sildenafilem.

Akutní plicní embolie způsobuje v plicním cévním řečišti změněném chronickou hypoxií vyšší vzestup perfuzního tlaku proti normoxickým kontrolám. Spíše než vyšší vazokonstrikcí je tento rozdíl zapříčiněn nižší poddajností stěny plicních cév způsobenou proliferací hladkých svalových buněk. Inhibice PDE-5 sildenafilem dokáže účinně zvýšit tuto poddajnost a vede tak ke snížení plicní hypertenze po akutní plicní embolii u potkanů vystavených chronické hypoxii.

2.4. AKTIVACE KCNQ KANÁLŮ BRÁNÍ ROZVOJI HYPOXICKÉ PLICNÍ HYPERTENZE

2.4.1. Cíle studie

Cílem experimentu bylo ověřit, zda podávání aktivátoru KCNQ kanálů v průběhu chronické hypoxie sníží plicní cévní rezistenci a tedy i plicní hypertenzi. ROS vznikající např. na podkladě hypoxie oxidují

cysteinové a methioninové zbytky KCNQ a mohou způsobit jejich uzavření. Aktivace napěťového draslíkového kanálu flupirtinem by měla zabránit depolarizaci buněčné membrány hladkých svalových buněk ve stěně plicních cév, udržet uzavřené Ca^{2+} kanály a následným snížením influxu Ca^{2+} do buněk zabránit vazokonstrikci a snížit tak hypoxickou plicní hypertenzi.

Výsledky tohoto experimentu jsou součástí článku publikovaného v časopise American Journal of Physiology (příloha 2).

2.4.2. Metoda

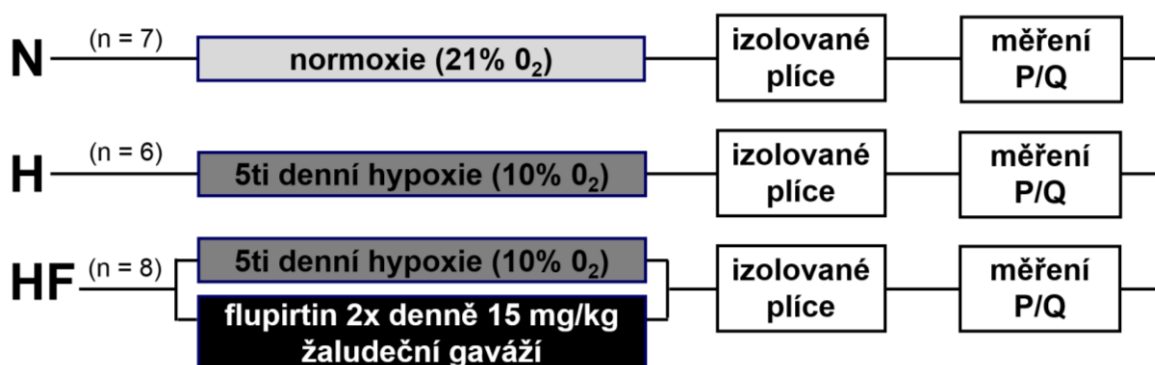
V tomto experimentu jsme použili 21 samců laboratorního potkana kmene Wistar. Práce s laboratorními zvířaty probíhala za stejných podmínek jako v předchozích experimentech – projekt byl schválen Komisí pro práci s laboratorními zvířaty 2. lékařské fakulty UK v Praze. Zvířata byla rozdělena do 3 skupin:

C – kontroly (n=7)

H – zvířata byla vystavena 5denní hypoxii v hypoxické normobarické komoře s 10% koncentrací O_2 (n=6)

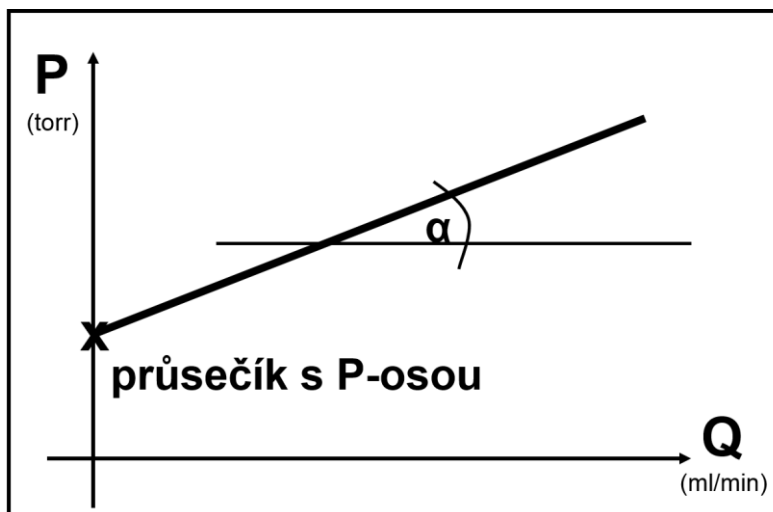
HF – během expozice 5 denní hypoxii podávání flupirtinu žaludeční gaváží 2xdenně v dávce 15mg/kg (n=8)

Obdobně jako v předcházejících experimentech byl ze zvířat všech skupin vypreparován orgánový blok srdce-plíce, ventilován normoxickou směsí plynů a perfundován solným roztokem s albuminem. Po 20 minutách stabilizace následovalo měření změny perfuzního tlaku v závislosti na lineárně stoupajícím průtoku (P/Q).



Obr. 7: Schéma protokolu experimentu 3

Výsledkem měření je P/Q přímka, charakterizovaná 2 parametry: průsečíkem s tlakovou osou, který odpovídá kritickému otevíracímu tlaku a sklonem přímky odpovídajícím plicní cévní rezistenci (obr. 8).



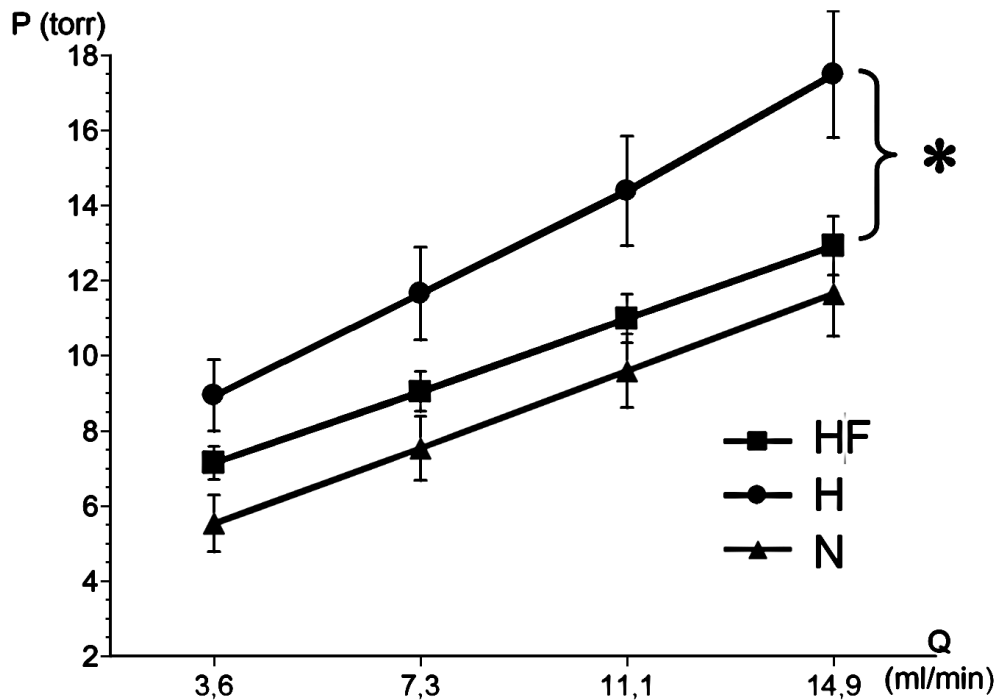
Obr. 8: Přímka závislosti tlaku na stoupajícím průtoku (P/Q), α = sklon P/Q přímky

Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Office Excel a vyhodnoceny testem ANOVA pro opakovaná měření s použitím softwaru StatView 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Výsledky jsou číselně vyjadřovány jako střední hodnoty \pm SE.

2.4.3. Výsledky

2.4.3.1. Flupirtin snižuje plicní cévní rezistenci po chronické hypoxii

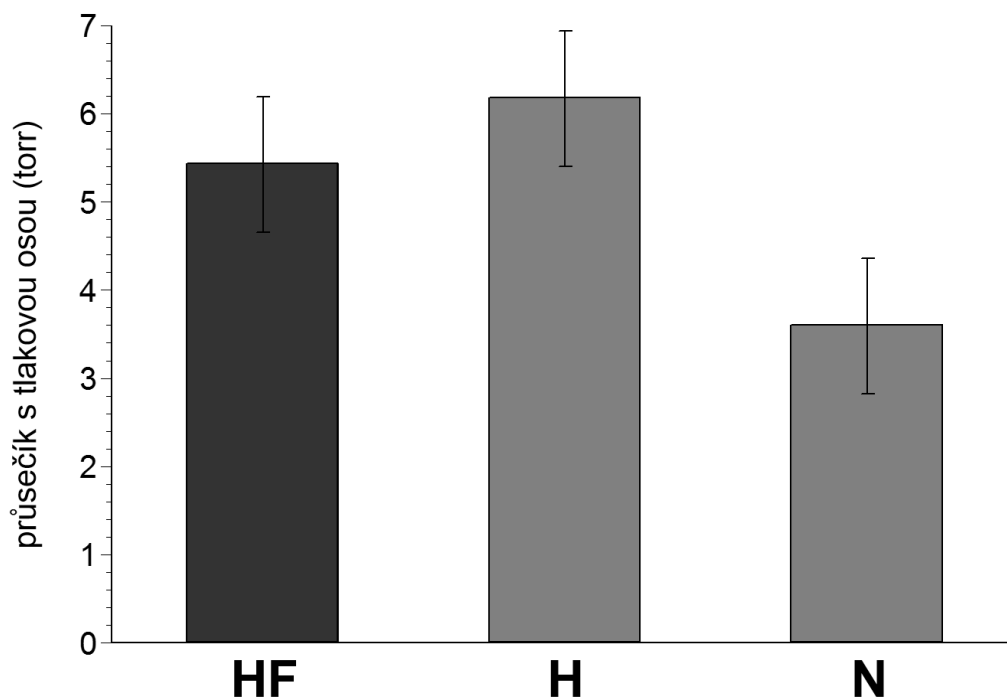
Sklon P/Q přímky skupiny vystavené 5ti-denní hypoxii (H) se statisticky významně liší od sklonu P/Q přímky skupiny léčené v průběhu hypoxie flupirtinem (HF). Mezi skupinou léčenou flupirtinem a kontrolami nebyl ve sklonu P/Q přímky signifikantní rozdíl.



graf 7.: Signifikantně nižší sklon P/Q přímky u skupiny léčené flupirtinem (HF) proti skupině neléčené (H) odpovídá nižší plicní cévní rezistenci ($p < 0,05$)

2.4.3.2. Flupirtin neovlivňuje kritický otevírací tlak plicních cév

Průsečík P/Q přímky s tlakovou osou, který vyjadřuje hodnotu kritického otevíracího tlaku plicních cév se mezi jednotlivými skupinami (N, H, HF) signifikantně neliší.



graf 8.: Statisticky nevýznamné rozdíly v hodnotě kritického otevíracího tlaku plicních cév mezi jednotlivými skupinami.

2.4.4. Zhodnocení výsledků a dílčí závěr

Prezentovaný experiment se dá shrnout do následujících tezí:

- podávání aktivátoru KCNQ kanálů flupirtinu v průběhu chronické 5denní hypoxie snižuje plicní cévní rezistenci
- flupirtin neovlivňuje kritický otevírací tlak plicních cév po chronické hypoxii

Z výsledků našeho experimentu vyplývá, že se v počátečních stádiích chronické hypoxie podílí na rozvoji plicní hypertenze inhibice

napěťově řízených draslíkových kanálů (v našem případě typu KCNQ). Tato inhibice, vyvolaná např. oxidací cysteinových a methioninových zbytků KCNQ kanálů působením ROS, vede k depolarizaci membrány hladkých svalových buněk a prostřednictvím L-typu Ca^{2+} kanálů ke kontrakci hladké svalové buňky a zvýšení plicní cévní rezistence.

3. CELKOVÉ SHRnutí VÝSLEDKŮ, ZÁVĚR

Všechny uvedené experimenty se zabývaly možnostmi ovlivnit plicní hypertenzi po akutní plicní embolii. Na rozdíl od klinické praxe, která dominantně ovlivňuje obstrukční složku PE (embolektomie, trombolýza, antikoagulační terapie) jsme se věnovali vazokonstrikční složce plicní hypertenze po PE, která dosud nebyla terapeuticky ovlivňována.

V první experimentu byla v návaznosti na teoretickou část práce ověřována role ROS při vzniku plicní hypertenze po PE a možnosti jejího farmakologického ovlivnění. Závěry z experimentu jsou následující:

- **zvýšení perfuzního tlaku a vazokonstrikce, rozvíjející se po akutní PE, jsou částečně způsobeny vzestupem produkce ROS**
- **po PE roste aktivita NO syntázy a produkce NOx**
- **scavenger ROS tempol snižuje plicní hypertenzi i aktivitu NO syntázy po PE**

Rostoucí aktivita NO syntázy a s ní i zvýšená hladina NO spolu s produkcí ROS po PE umožňuje vzájemnou interakci superoxidu a NO za vzniku silně vazokonstrikčního peroxinitritu. Tato reakce je pravděpodobně jednou z příčin vazokonstrikce po PE. Zvýšená

koncentrace NO může mít kromě pozitivního vazodilatačního efektu i zcela opačný účinek. Vzniku ROS po PE je komplexní proces, na kterém se podílí změna střížného napětí stěny plicních cév, aktivované granulocyty i působení hypoxie na endoteliální výstelku, příčiny vzniku ROS jsou široce diskutovány v teoretické části. V našem experimentu jsme použili jako scavenger ROS tempol – zejména pro jeho dobře zmapovaný mechanismus účinku – inhibuje SOD a tak snižuje množství volného vysoce reaktivního superoxidu. Jeho nevýhodou je omezená použitelnost v případném klinickém experimentu, dosud není zaveden do klinické praxe pro celou řadu nežádoucích účinků. V lékařské praxi jsou však běžně používány jiné antioxidační látky (např. askorbát, vitamín E), které by se dali použít namísto tempolu. Dosud ne zcela jasný mechanismus účinku vitamínu E a askorbátu na jedné straně je vyvážen jejich bezpečností a dlouholetou klinickou zkušeností. Použití scavengerů ROS v prevenci a léčbě vazokonstriční složky plicní hypertenze po akutní plicní embolii se jeví jako potenciálně vhodná koadjuvantní terapie, je však třeba jejich vliv nadále testovat jak na zvířecím modelech, tak i v klinickém experimentu.

Cílem druhého experimentu bylo ověřit chování plicního cévního řečiště po PE u potkanů, kteří byly vystaveni 5denní chronické hypoxii. Ke zvýšení plicní poddajnosti a snížení plicního perfuzního tlaku byl použit inhibitor PDE-5 sildenafil. Zjistili jsme, že:

- **po akutní plicní embolii je vyšší perfuzní tlak v plicních cévách u krys vystavených 5denní hypoxii než u normoxických kontrol**
- **sildenafil snižuje plicní hypertenzi po akutní plicní embolii v terénu chronické hypoxie**
- **vazokonstrikce se neliší mezi skupinou léčenou a neléčenou sildenafilem, snížení plicní hypertenze tedy odpovídá zvýšení poddanosti plicních cév**

Plicní cirkulace pacientů s celou řadou plicních onemocnění (např. CHOPN, cystická fibróza apod.) je vystavena chronické hypoxii. V plicních cévách dochází vlivem hypoxie k remodelaci cévní stěny, při které dominuje proliferace hladkých svalových buněk. V takto remodelovaných plicních cévách dochází k poklesu plicní poddajnosti. Náš experiment prokázal, že plicní embolie v takto remodelovaném řečišti vyvolá vyšší vzestup perfuzního tlaku. Z výsledků však také vyplývá, že důvodem ke zvýšení bazálního perfuzního tlaku není zvýšená vazokonstrikce, ale zřejmě nižší plicní cévní poddajnost. Sildenafil, který je běžně klinicky využíván k léčbě erektilní dysfunkce a zejména ke zmírnění následků primární plicní hypertenze, se v experimentu ukázal jako efektivní prostředek ke zvýšení plicní cévní poddajnosti po PE v terénu chronicky hypoxických plic. Na efekt sildenafilu na snížení plicní hypertenze po PE ukazují i další publikace

(Dias-Junior et al., 2005). Ovlivnění metabolismu NO sildenafilem je dalším z řady nadějných postupů, které by mohli po ověření pozitivního efektu v klinickém experimentu rozšířit paletu terapeutických možností v léčbě plicní hypertenze po akutní PE.

V třetím experimentu jsme se zaměřili na samotný mechanismus vazokonstrikce plicních cév, sledovali jsme změny hypoxické plicní hypertenze po podávání aktivátoru napěťově řízených draslíkových kanálů z rodiny KCNQ flupirtinu.

Výsledky experimentu potvrzují následující hypotézu:

- **flupirtin snižuje rezistenci plicních cév vyvolanou chronickou hypoxií, ale nemění kritický otevírací tlak.**

Při chronické hypoxii dochází mimo remodelaci stěny plicních cév zmíněné výše také k vazokonstrikci. Hypoxie je i nedílnou součástí plicní embolie a také jednou z možných příčin vyvolávajících při PE zvýšenou produkci ROS s následnou vazokonstrikcí. Jedním z možných mechanismů vzniku vazokonstrikce plicních cév je změna konformace napěťově řízených draslíkových kanálů na podkladě oxidace cysteinových a methionivých zbytků. Tato změna vede k jejich inhibici, depolarizaci membrány následované otevřením Ca^{2+} napěťově řízených kanálů. Influx iontů Ca^{2+} způsobí kontrakci hladké svalové buňky a vazokonstrikci. Tento mechanismus se nám podařil v experimentu ovlivnit působením aktivátoru KCNQ kanálů flupirtinu, snížit plicní cévní

rezistenci a tak i hypertenzi vyvolanou chronickou hypoxií. Flupirtin se v některých zemích používá k léčbě bolesti, patří do skupiny neopiodních analgetik. Mechanismus jeho analgetického účinku nebyl dosud plně objasněn a v České republice není registrován pro použití k léčebným účelům. Efekt flupirtinu v našem experimentu naznačuje další možnosti jeho využití v léčbě hypoxické plicní hypertenze.

Z výsledků všech experimentů vyplývá, že vazokonstrikce resp. snížení plicní poddajnosti je významnou součástí plicní hypertenze po akutní PE, tento závěr je ve shodě s citovanou literaturou. Farmakologické ovlivnění vazokonstrikční složky plicní hypertenze se jeví v experimentálních podmínkách jako vhodný koadjuvantní terapeutický postup, je však potřeba nadále podrobně studovat možnosti ovlivnění produkce reaktivních sloučenin kyslíku na všech úrovních jejich metabolismu, interakci s NO a další vazokonstrikčními mechanismy a zkoumat nové způsoby farmakologické intervence v terapii plicní hypertenze po akutní PE.

REFERENCE

1. **Bageant WE, Raper LA.** The treatment of pulmonary embolus by stellate block. *Anesthesiology* 8: 500-5, 1947
2. **Belik J, Jankov RP, Pan J, Tanswell AK.** Peroxynitrite inhibits relaxation and induces pulmonary artery muscle contraction in the newborn rat. *Free Radic Biol Med* 37: 1384-92, 2004
3. **Chen HF, Kou YR.** Vagal and mediator mechanisms underlying the tachypnea caused by pulmonary air embolism in dogs. *J Appl Physiol* 88: 1247-53, 2000
4. **Clavijo LC, Carter MB, Matheson PJ, Wills-Frank LA, Wilson MA, Wead WB, Garrison RN.** Platelet-activating factor and bacteremia-induced pulmonary hypertension. *J Surg Res* 88: 173-80, 2000
5. **Comroe JH Jr., Van Lingen B, Stroud RC, Roncoroni A.** Reflex and direct cardiopulmonary effects of 5-OH-tryptamine (serotonin); their possible role in pulmonary embolism and coronary thrombosis. *Am J Physiol* 173: 379-86, 1953
6. **Coughlin SR, Moskowitz MA, Zetter BR, Antoniades HN, Levine L.** Platelet-dependent stimulation of prostacyclin synthesis by platelet-derived growth factor. *Nature* 288: 600-2, 1980
7. **Deuel TF, Tong BD, Huang JS.** Platelet-derived growth factor: structure, function, and roles in normal and transformed cells. *Curr Top Cell Regul* 26: 51-64, 1985

8. **Dias-Junior CA, Souza-Costa DC, Zerbini T, da Rocha JB, Gerlach RF, Tanus-Santos JE.** The effect of sildenafil on pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension. *Anesth Analg* 101: 115-20, table of contents, 2005

9. **Dias-Junior CA, Neto-Neves EM, Montenegro MF, Tanus-Santos JE.** Hemodynamic effects of inducible nitric oxide synthase inhibition combined with sildenafil during acute pulmonary embolism. *Nitric Oxide* 23: 284-8, 2010

10. **Dschietzig T, Laule M, Alexiou K, Schrör K, Baumann G, Stangl K.** Coronary constriction and consequent cardiodepression in pulmonary embolism are mediated by pulmonary big endothelin and enhanced in early endothelial dysfunction. *Crit Care Med* 26: 510-7, 1998

11. **Elliott CG.** Pulmonary physiology during pulmonary embolism. *Chest* 101: 163S-171S, 1992

12. **Fernandez-Patron C, Zouki C, Whittal R, Chan JS, Davidge ST, Filep JG.** Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1. *Faseb J* 15: 2230-2240, 2001

13. **Fisher AB, Al-Mehdi AB, Manevich Y.** Shear stress and endothelial cell activation. *Crit Care Med* 30: S192-7, 2002

14. **Garcia Szabo RR, Minnear FL, Bizios R, Johnson A, Malik AB.** Role of thromboxane in the pulmonary response to pulmonary microembolization. *Chest* 83: 76S-78S, 1983
15. **Glusa E, Paintz M, Bretschneider E.** Relaxant and contractile responses of porcine pulmonary arteries to thrombin and thrombin receptor activating peptides. *Semin Thromb Hemost* 22: 261-5, 1996
16. **Gries A, Böttiger BW, Dörsam J, Bauer H, Weimann J, Bode C, Martin E, Motsch J.** Inhaled nitric oxide inhibits platelet aggregation after pulmonary embolism in pigs. *Anesthesiology* 86: 387-93, 1997
17. **Grote K, Flach I, Luchtefeld M, Akin E, Holland SM, Drexler H, Schieffer B.** Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res* 92: e80-6, 2003
18. **Gupte SA, Kaminski PM, Floyd B, Agarwal R, Ali N, Ahmad M, Edwards J, Wolin MS.** Cytosolic NADPH may regulate differences in basal Nox oxidase-derived superoxide generation in bovine coronary and pulmonary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H13-21, 2005
19. **Hampel V, Herget J.** Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia. *Am Rev Respir Dis* 142: 619-24, 1990
20. **Herget J, Suggett AJ, Palecek F, Slavik Z.** Effect of alpha-methyldopa on lung microembolism in the rat. *Bull Eur Physiopathol Respir* 18: 687-92, 1982

21. **Herget J, Mc Murtry IF.** Dexamethasone potentiates hypoxic vasoconstriction in salt solution-perfused rat lungs. *Am J Physiol* 253: H574-81, 1987
22. **Hodyc D, Johnson E, Skoumalová A, Tkaczyk J, Maxová H, Vízek M, Herget J.** Reactive oxygen species production in the early and later stage of chronic ventilatory hypoxia. *Physiol Res* 61: 145-51, 2012
23. **Haynes JB, Iseman MD.** Massive pulmonary embolism. Presenting with hypercapnia and minimal intrapulmonary shunting. *Rocky Mt Med J* 77: 135-7, 1979
24. **Jernigan NL, Walker BR, Resta TC.** Reactive oxygen species mediate RhoA/Rho kinase-induced Ca²⁺ sensitization in pulmonary vascular smooth muscle following chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L515-529, 2008
25. **Joshi S, Balan P, Gurney AM.** Pulmonary vasoconstrictor action of KCNQ potassium channel blockers. *Respir Res* 7: 31, 2006
26. **Liu JQ, Sham JS, Shimoda LA, Kuppusamy P, Sylvester JT.** Hypoxic constriction and reactive oxygen species in porcine distal pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L322-33, 2003
27. **Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* 98: 390-403, 2005

28. **Nelson JR, Smith JR.** The pathologic physiology of pulmonary embolism. A physiologic discussion of the vascular reactions following pulmonary arterial obstruction by emboli of varying size. *Am Heart J* 58: 916-32, 1959
29. **Palei AC, Zaneti RA, Fortuna GM, Gerlach RF, Tanus-Santos JE.** Hemodynamic benefits of matrix metalloproteinase-9 inhibition by doxycycline during experimental acute pulmonary embolism. *Angiology* 56: 611-7, 2005
30. **Perlman MB, Johnson A, Jubiz W, Malik AB.** Lipoxygenase products induce neutrophil activation and increase endothelial permeability after thrombin-induced pulmonary microembolism. *Circ Res* 64: 62-73, 1989
31. **Sato T, Sawada S, Tsuda Y, Komatsu S, Akamatsu N, Kono Y, Higaki T, Imamura H, Tada Y, Yamasaki S, Tamagaki T, Nagakawa K, Tsuji H, Nagakawa M.** The mechanism of thrombin-induced prostacyclin synthesis in human endothelial cells with reference to the gene transcription of prostacyclin-related enzymes and Ca²⁺ kinetics. *J Pharmacol Toxicol Methods* 41: 173-82, 1999
32. **Schmeck J, Koch T, Patt B, Heller A, Neuhof H, van Ackern K.** The role of endothelin-1 as a mediator of the pressure response after air embolism in blood perfused lungs. *Intensive Care Med* 24: 605-11, 1998
33. **Shimokawa H, Satoh K.** Light and Dark of Reactive Oxygen Species for Vascular Function. *J Cardiovasc Pharm*, 2014

34. **Stratmann G, Gregory GA.** Neurogenic and humoral vasoconstriction in acute pulmonary thromboembolism. *Anesth Analg* 97: 341-54, 2003
35. **Sun Y, Zhu Z, Langnas AN, Grant WJ, Botha JF, Zhao Y, Sudan DL, Mercer DF.** Plasma nitrite and nitrate levels as a noninvasive marker of pathology after human small bowel transplantation. *Transplantation* 89: 307-311, 2010
36. **Tanus-Santos JE, Moreno H JR, Moreno RA, Martins ML, Pereira R, De Nucci G.** Inhaled nitric oxide improves hemodynamics during a venous air infusion (VAI) in dogs. *Intensive Care Med* 25: 983-9, 1999
37. **Tanus-Santos JE, Gordo WM, Udelsmann A, Cittadino MH, Moreno H jr.** Nonselective endothelin-receptor antagonism attenuates hemodynamic changes after massive pulmonary air embolism in dogs. *Chest* 118: 175-9, 2000
38. **Test ST, Lampert MB, Ossanna PJ, Thoene JG, Weiss SJ.** Generation of nitrogen-chlorine oxidants by human phagocytes. *J Clin Invest* 74: 1341-9, 1984
39. **Thomas D, Stein M, Tanabe G, Rege V, Wessler S.** Mechanism of Bronchoconstriction Produced by Thromboemboli in Dogs. *Am J Physiol* 206: 1207-12, 1964
40. **Thomas DP, Vane JR.** 5-hydroxytryptamine in the circulation of the dog. *Nature* 216: 335-8, 1967

41. **Torbicki A, Perrier A, Konstantinides S, Agnelli G, Galiè N, Pruszczyk P, Bengel F, Brady AJ, Ferreira D, Janssens U, Klepetko W, Mayer E, Remy-Jardin M, Bassand JP.** Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: the Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 29: 2276-315, 2008
42. **Utsunomiya T, Krausz MM, Shepro D, Hetchman HB.** Prostaglandin control of plasma and platelet 5-hydroxytryptamine in normal and embolized animals. *Am J Physiol* 241: H766-71, 1981
43. **Van Den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G.** Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37: 375-536, 2002
44. **Waypa GB, Schumacker PT.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. *J Appl Physiol* 98: 404-14, 2005
45. **Widimský J.** Diagnosis and treatment of acute pulmonary embolism in 2010. *Vnitr Lek* Jan 57: 5-21, 2011
46. **Wood KE.** Major pulmonary embolism: review of a pathophysiologic approach to the golden hour of hemodynamically significant pulmonary embolism. *Chest* 121: 877-905, 2002

PŘÍLOHA 1

Mizera R, Hodyc D, Herget J. ROS scavenger decreases basal perfusion pressure, vasoconstriction and NO synthase activity in pulmonary circulation during pulmonary microembolism. *Phys Res*, přijato k publikaci 11/2014

ROS scavenger decreases basal perfusion pressure, vasoconstriction and NO synthase activity in pulmonary circulation during pulmonary microembolism

Mizera Roman^{1,2}, Hodyc Daniel¹, Herget Jan¹

¹ Department of Physiology, Second Medical School, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic, ² Traumatology-orthopaedic center, Regional Hospital Liberec, Liberec, Czech Republic

Short title: ROS scavenger decreases perfusion pressure during pulmonary embolism

Corresponding author:

MUDr. Roman Mizera

Traumatologicko-ortopedické centrum KNL a.s.

Husova 10, Liberec 1, 46063

Email: roman.mizera@nemlib.cz

Summary:

Two mechanisms contribute in the development of pulmonary hypertension in pulmonary embolism (PE) - obstruction of pulmonary blood vessels and vasoconstriction. We hypothesize that hypoxia, increased shear stress and/or activation of gathered leukocytes in the PE may cause a release of reactive oxygen species (ROS). Therefore our aim was to

determine the influence of the ROS scavenger Tempol on pulmonary hypertension and to describe NO synthase activity and production of NO oxidative products (NO_x) after PE. In general anaesthesia sephadex microspheres suspended in PSS were applied in right jugular vein as the pulmonary microembolism. Then we measured in isolated salt solution-perfused lungs the changes in perfusion pressure, activity of NO synthase and NO_x plasma concentration in 7 groups of rats: **C:** control group (n=5), **CN:** C + sodium nitroprusside (SN) (n=5), **EN:** PE + SN (n=5), **ETN:** Tempol + PE + SN (n=5), **CL:** C + L-NAME (n=5), **EL:** PE + L-NAME (n=5), **ETL:** Tempol + PE + L-NAME (n=5).

Tempol was applied intraperitoneally before PE. Animals that received Tempol (groups TN, TL) had significantly lower basal perfusion pressure than those which didn't receive Tempol (EN, EL). Overall we measured a higher decrease of perfusion pressure than in the control group (C) after application of SN. Administration of LNAME after PE (EL) increased the pressure more than in the control group (NL). NO_x concentration was higher after PE. We found that preventive administration of Tempol decreases the increase in perfusion pressure after PE. PE increased NO release and concentration of NO_x.

Key words: ROS scavenger, pulmonary hypertension, pulmonary embolism, nitric oxide, free radicals

Introduction

Acute pulmonary embolism (PE) is a serious condition with an incidence of 20/1000 per year and is the third most common cause of death from cardiovascular disease after heart attacks and strokes in Europe. It is the most serious post-operative complication, particularly after long bone and joint surgeries. Pulmonary embolism is a significant cause of mortality and morbidity in hospitalized patients (10% deaths during hospitalization) (Torbicki et al. 2008). Successive pulmonary embolism which develops for a longer time leads to an increase in pulmonary vessel resistance, pulmonary hypertension and chronic right side heart failure. There are two important mechanisms in the development of pulmonary hypertension after PE - obstruction of pulmonary vessels by the embolus and vasoconstriction. Our hypothesis is that radical substances released in the lungs after PE may participate in some cases of PE induced increase of vascular resistance. Hypoxia, increased shear stress and activation of gathered leukocytes may cause the release of reactive oxygen species (ROS). ROS may be responsible for pulmonary vasoconstriction after PE (Stratmann and Gregory 2003). Therapy of PE is based mainly on the release of the obstruction by thrombus. The first choice of therapy is tPA thrombolysis combined with heparin anticoagulation. In certain cases a surgical method – embolectomy – is indicated (Torbicki et al. 2008). Though experiments with vasodilatation by NO inhalation or by Sildenafil have been performed (Tanus-Santos et al. 1999, Dias-Junior et al. 2010), the vasodilatory therapy of PE induced pulmonary hypertension has not been implemented in clinical practice. Experimental evidence indicates that models of PE in laboratory animals are accompanied by oxidant stress of lung tissue (Dias-Junior et al. 2010). The key oxygen radical present in various types of lung injury including PE is superoxide. In our experiments we used Tempol (4 hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidin-1-oxyl), which acts as a superoxide dismutase mimetics, for vasodilatation after experimental lung microembolism. Superoxide dismutase decreases the level of superoxide. In the presence of NO and superoxide these substances readily combine, yielding the biologically very reactive peroxynitrite.

In the present study we questioned the hypothesis that superoxide participates in lung vasoconstriction after pulmonary microembolism by Sephadex particles. In the first part of our study we focused on changes in perfusion pressure and the presence of vasoconstriction after PE with preventive application of Tempol. The second part describes observed changes in NO synthase activity and production of NO metabolic products after PE.

Methods

We used 30 male Wistar rats (aged 7-8 weeks, weight $240\pm 20\text{g}$). Work with animals was performed in accordance with European Community guidelines and US National Institute of Health guidelines for the use of experimental animals. All parts of the experiment were approved by the Commission for Work with Laboratory Animals of the Second Medical School, Charles University in Prague.

Pulmonary microembolism

The right internal jugular vein was dissected in general anesthesia using a 40 mg/kg intraperitoneal injection of sodium thiopental. Then 0.2 ml saline solution, which contained 320 mg of Sephadex microspheres (G-26, Superfine per kilogram of body weight), was applied into the exposed jugular vein. The microspheres had been suspended in the PSS for 12 hours before the application in order to enlarge their diameter by swelling (final particle size was 15 – 50 μm). The heart-lung block was isolated twenty minutes after embolization and the preparation of isolated perfused lung was established (Herget et al. 1982).

Preparation of isolated perfused rat lungs

After thoracotomy, the lungs were ventilated by a normoxic gas mixture (21% O₂, 5% CO₂, 74% N₂) by tracheal tube with the following ventilation parameters: PEEP 2 cm H₂O, peak inspiratory pressure 10 cm H₂O. An inflow cannula was inserted into the pulmonary artery and an outflow cannula into the left heart chamber, the lungs had been perfused with saline perfusate containing albumin (4g/100 ml) at a constant flow rate (4ml/min/100g). Isolated lungs were placed into a heated humid chamber. The outflow cannula was set up into a circle through a perfusate reservoir. The perfusion pressure was measured in the inflow cannula. After 20 minutes of stabilization, the changes in pressure corresponded to changes in the pulmonary vascular resistance (Herget and MC Murtry 1987, Hampl and Herget 1990).

Experimental protocol (Fig. 1)

Experimental protocol included 4 parts:

1. Basal perfusion pressure

In this part of the experiment, animals were divided into 3 groups: C – control group (n=10), E – pulmonary embolization had been induced in the animals before the isolation of the lungs (n=10), ET – similar as E but the animals had received 50mg/kg of Tempol intraperitoneally before the embolization (n=10). The basal perfusion pressure was measured after 20 minutes of stabilization.

2. Presence of vasoconstriction

Groups of animals were analogous to the previous part: CN – control group (n=5), EN - pulmonary embolization had been performed on the animals before the isolation of the lungs (n=5), ETN - the animals had received 50mg/kg of Tempol intraperitoneally before the embolization (n=5). The isolation of the lungs was followed by a stabilization period of 20 minutes. After reading basal perfusion pressure, 0.5 ml 20uM solution of sodium nitroprusside was added to the perfusate in each group and the basal perfusion pressure rate was noted after 10 minutes. The difference between perfusion pressure before and after sodium nitroprusside reflects the pulmonary vascular tonus.

3. NO release

Rats were divided again into 3 groups: CL – control group (n=5), EL - pulmonary embolization had been performed on the animals before the isolation of the lungs (n=5), ETL - the animals had received 50mg/kg of Tempol intraperitoneally before the embolization (n=5). After the isolation of the lungs and stabilization, the L-Name NO synthase inhibitor was added to the lung perfusate (final concentration 50uM in perfusate). After 10 minutes, perfusion pressure was measured again – the difference between these pressures reflects the effect of block of NO production on pulmonary vasculature.

4. NO oxidation products (NO_x) concentration in plasma

Before the embolization, venous blood samples from the left subclavian vein were taken from 11 animals. PE was performed exactly as described in the protocol above, followed by 20 minutes stabilization. Subsequently, similar venous blood samples were obtained. They were centrifuged for 3 minutes at the speed of 5000 RPM and the acquired plasma was deeply frozen. An NO analyser was used to analyse NO_x (Sun et al. 2010, Hodyc et al. 2012).

Statistical Analysis

All data are shown as mean ± SE and analysed by Statview software with ANOVA or ANOVA repeated measures and Fisher's PLSD posthoc test. Where indicated a paired t test was used. Differences were considered statistically significant when p<0.05.

Results

Tempol decreases basal perfusion pressure after PE

In lungs isolated from rats that had PE (E), the perfusion pressure was significantly higher than in the control group (C). Animals that received Tempol before the embolization (ET) had significantly lower basal pressure than the animals with PE without a previous Tempol application (E). Basal perfusion pressure did not differ significantly between the control group (C) and animals treated with Tempol (ET) (Fig.2).

Presence of vasoconstriction

In the group with PE (EN), we observed a significantly higher decrease in perfusion pressure after application of sodium nitroprusside than in the control group (CN). Vasodilatation

induced by nitroprusside in the group with Tempol application (ETN) was similar as in controls (C) (Fig. 3).

Increased activity of NO synthase after PE

Using similar groups as in the previous experiments, the changes of perfusion pressure were measured 10 minutes after application of L-Name. Significantly bigger increase in perfusion pressure after L-Name administration was found in the group which contained PE exposed animals (EL) than in the control group (CL) and in rats that received Tempol prior to the embolization (ETL) (Fig. 4).

Increased concentration of NO_x in plasma after PE

In all the animals with PE, concentration of NO_x measured after PE was higher (mean 24.62 μM) than before PE (mean 22.3 μM). The concentration of NO_x before and after PE was compared separately for each animal and evaluated by paired t-test.

Discussion

The main conclusions of our study are the following:

Vasoconstriction which develops after PE is partly caused by an increase of ROS production. After PE, the activity of NO synthase increases and the production of NO rises; application of Tempol lowers the activity of NO synthase.

Our experiment clearly indicates the possible role of ROS in pulmonary hypertension after acute PE, how ROS is generated after PE has not yet been clarified as well as the actual nature of all ROS which cause vasoconstriction of pulmonary vessels.

Possibilities of ROS generation after PE

All cell elements involved in the process of pulmonary hypertension after PE (thrombocytes, leukocytes, endothelial cells and vascular smooth muscle cells) participate in the production and release of reactive oxygen species during PE. There are four hypothetical ROS generation mechanisms after acute PE: increased shear stress on the wall of pulmonary vessels in the non-embolized part of pulmonary circulation, decreased shear stress in the embolized part behind the embolus, release from activated leukocytes and finally hypoxia.

There is an increase in mechanical pressure on the wall of pulmonary vessels in nonembolized regions of pulmonary circulation by preserved cardiac output. The result of increased shear stress is the upregulation of NAD(P)H oxidase subunit Nox-1, which is found in the cytosol of smooth muscle cells of the pulmonary vessel wall. It also leads to an increase in expression of membrane subunit p47phox and its translocation on the smooth muscle cell membrane (Grote 2003). NAD(P)H oxidase produces superoxide. In the regions which have been cut out of the circulation by embolization, the level of the shear stress drops down. This leads to the upregulation of NAD(P)H oxidase and production of superoxide similarly as in the regions with increased shear stress (Fisher et al. 2002). In the smooth muscle cells of nonperfused pulmonary vessels, the intracellular level of Ca²⁺ rises, which

leads to a conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase, which produces ROS (Test et al. 1984, Fisher et al. 2002).

Numerous experimental studies have proven an increase in ROS during hypoxia (Liu 2003). Furthermore, the upregulation of NAD(P)H oxidase is partly responsible for the increase of ROS in hypoxia (Gupte et al. 2005). Another source of ROS in hypoxia is the mitochondrial electron transport chain (Waypa and Schumacker 2005).

Possible roles of ROS in vasoconstriction after PE

Reactive oxygen species have oxidation potential, they oxidize cysteine and methionine residues of voltage-gated potassium channels and so cause changes in their conformation. Inhibition of these channels leads to the depolarization of cell membranes of smooth muscle cells in the pulmonary vessel wall, which is followed by activation of L-type Ca²⁺ channels. The next step is Ca²⁺ ion influx and pulmonary vessel vasoconstriction (Moudgil et al. 2005).

The relationship between ROS and NO plays the key role in the generation of vasoconstriction. Superoxide reacts with NO to form peroxynitrite. This reaction occurs very quickly, four times faster than the reaction of superoxide with superoxide dismutase. The peroxynitrite which is created has a vasoconstrictor effect (Belik 2004).

The second possible pathway of increase in pulmonary vascular tonus after lung microembolism is the Ca²⁺ sensitization through ROS-dependent activation of RhoA/Rho kinase signaling (Jernigan et al. 2008, Shimokawa and Satoh 2014).

ROS activate matrix metalloproteinases (MMPs) (Grote 2003). MMPs have a significant effect when activated chronically – they induce remodeling of pulmonary vessel walls and finally pulmonary hypertension. After acute PE, activated MMPs are able to break down big endothelin-1 to activated endothelin-1, which has a strong vasoconstrictor potential (Van den Steen et al. 2002, Fernandez-Patron et al. 2001). The preventive application of an MMP inhibitor reduces hemodynamic changes after acute PE (Palei et al. 2005).

Conclusion

Presented results may help to obtain the insight in the pathogenesis of changes of pulmonary hypertension after the multiple pulmonary microembolism.

Acknowledgements:

The study was supported by GAUK n. 634112/2012, IGA NT 13358-4 and COST

Action “EU-ROS” (BM 11203)

References:

- BELIK J, JANKOV RP, PAN J, TANSWELL AK: Peroxynitrite inhibits relaxation and induces pulmonary artery muscle contraction in the newborn rat. *Free Radic Biol Med* **37**: 1384-92, 2004
- DIAS-JUNIOR CA, NETO-NEVES EM, MONTENEGRO MF, TANUS-SANTOS JE: Hemodynamic effects of inducible nitric oxide synthase inhibition combined with sildenafil during acute pulmonary embolism. *Nitric Oxide* **23**: 284-8, 2010
- FERNANDEZ-PATRON C, ZOUKI C, WHITTAL R, CHAN JS, DAVIDGE ST, FILEP JG: Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1 (1-32). *Faseb J* **15**: 2230-2240, 2001
- FISHER A.B., AL-MEHDI A.B., MANEVICH Y: Shear stress and endothelial cell activation. *Crit Care Med* **30**: S192-7, 2002
- GROTE K, FLACH I, LUCHTEFELD M, AKIN E, HOLLAND SM, DREXLER H, SCHIEFFER B: Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res* **92**: e80-6, 2003
- GUPTA SA, KAMINSKI PM, FLOYD B, AGARWAL R, ALI N, AHMAD M, EDWARDS J, WOLIN MS: Cytosolic NADPH may regulate differences in basal Nox oxidase-derived superoxide generation in bovine coronary and pulmonary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**: H13-21, 2005
- HAMPL V., HERGET J: Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia. *Am Rev Respir Dis* **142**: 619-24, 1990
- HERGET J, SUGGETT AJ, PALECEK F, SLAVIK Z: Effect of alpha-methyldopa on lung microembolism in the rat. *Bull Eur Physiopathol Respir* **18**: 687-92, 1982
- HERGET J., MC MURTRY I.F: Dexamethasone potentiates hypoxic vasoconstriction in salt solution-perfused rat lungs. *Am J Physiol* **253**: H574-81, 1987
- HODYC D1, JOHNSON E, SKOUMALOVÁ A, TKACZYK J, MAXOVÁ H, VÍZEK M, HERGET J: Reactive oxygen species production in the early and later stage of chronic ventilatory hypoxia. *Physiol Res* **61**: 145-51, 2012
- JERNIGAN NL, WALKER BR, AND RESTA TC: Reactive oxygen species mediate RhoA/Rho kinase-induced Ca²⁺ sensitization in pulmonary vascular smooth muscle following chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295**: L515-529, 2008
- LIU JQ, SHAM JS, SHIMODA LA, KUPPUSAMY P, SYLVESTER JT: Hypoxic constriction and reactive oxygen species in porcine distal pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**: L322-33, 2003
- MOUDGIL R., MICHELAKIS E.D., ARCHER S.L: Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* **98**: 390-403, 2005

PALEI AC1, ZANETI RA, FORTUNA GM, GERLACH RF, TANUS-SANTOS JE: Hemodynamic benefits of matrix metalloproteinase-9 inhibition by doxycycline during experimental acute pulmonary embolism. *Angiology* **56**: 611-7, 2005

SHIMOKAWA H, AND SATOH K. Light and Dark of Reactive Oxygen Species for Vascular Function. *J Cardiovasc Pharm*, 2014.

STRATMANN G., GREGORY G.A: Neurogenic and humoral vasoconstriction in acute pulmonary thromboembolism. *Anesth Analg* **97**: 341-54, 2003

SUN Y, ZHU Z, LANGNAS AN, GRANT WJ, BOTHA JF, ZHAO Y, SUDAN DL, MERCER DF: Plasma nitrite and nitrate levels as a noninvasive marker of pathology after human small bowel transplantation. *Transplantation* **89**: 307-311, 2010

TANUS-SANTOS JE, MORENO H JR, MORENO RA, MARTINS ML, PEREIRA R, DE NUCCI G: Inhaled nitric oxide improves hemodynamics during a venous air infusion (VAI) in dogs. *Intensive Care Med* **25**: 983-9, 1999

TEST ST, LAMPERT MB, OSSANNA PJ, THOENE JG, WEISS SJ: Generation of nitrogen-chlorine oxidants by human phagocytes. *J Clin Invest* **74** 1341-9, 1984

TORBICKI A, PERRIER A, KONSTANTINIDES S, AGNELLI G, GALIÈ N, PRUSZCZYK P, BENGEL F, BRADY AJ, FERREIRA D, JANSSENS U, KLEPETKO W, MAYER E, REMYJARDIN M, BASSAND JP: Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: the Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* **29**: 2276-315, 2008

VAN DEN STEEN PE, DUBOIS B, NELISSEN I, RUDD PM, DWEK RA, OPDENAKKER G: Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37**: 375-536, 2002

WAYPA G.B., SCHUMACKER P.T: Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. *J Appl Physiol* **98**: 404-14, 2005

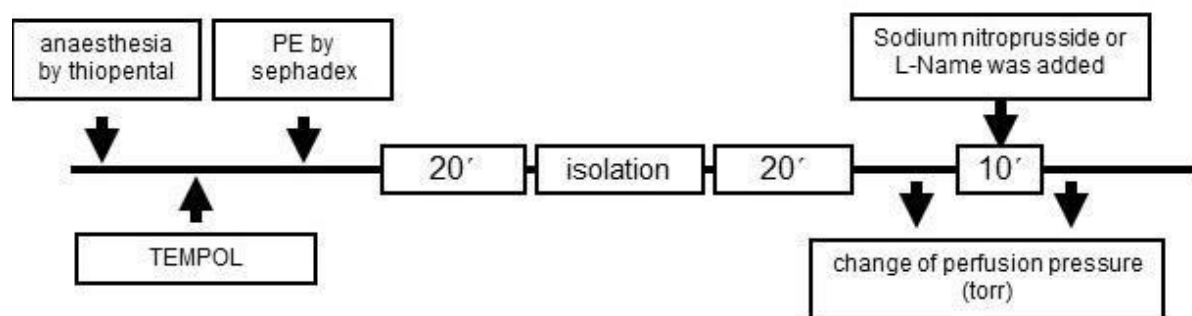


Fig. 1. Experimental protocol

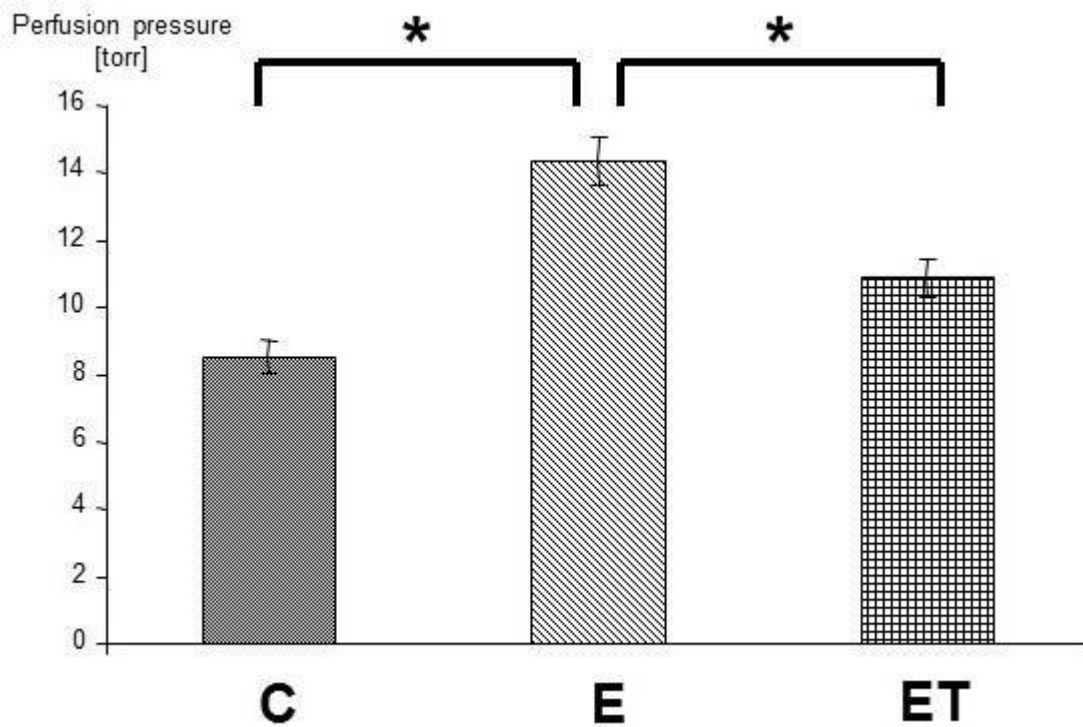


Fig. 2. Tempol decreases basal perfusion pressure after PE. (* $p < 0.01$)

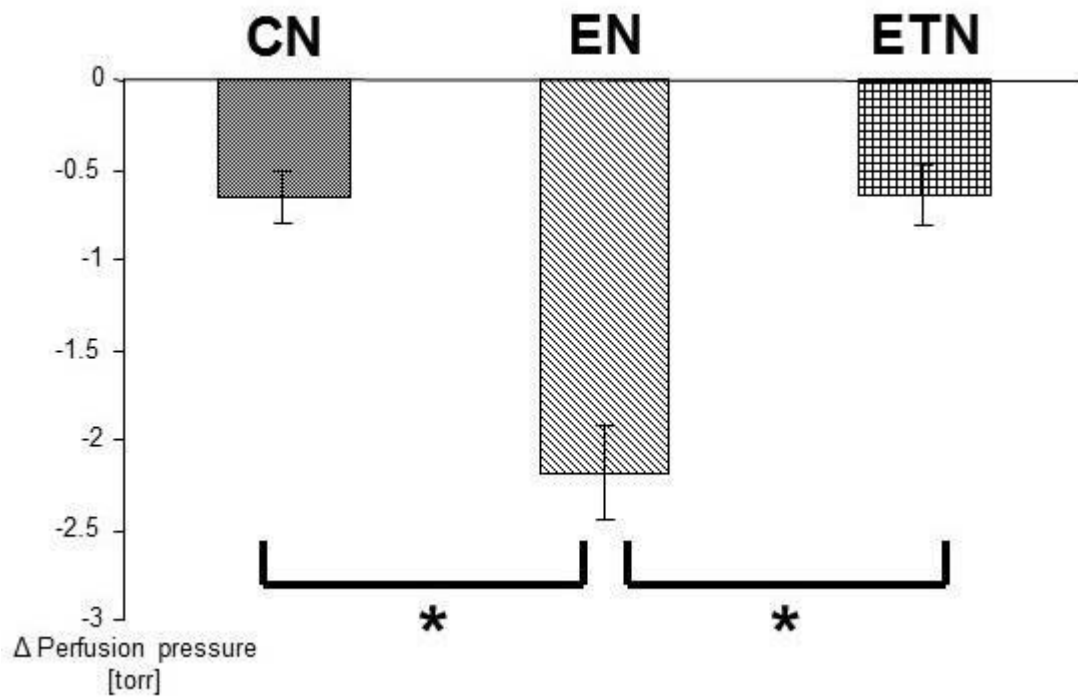


Fig. 3. Effect of sodium nitroprusside on perfusion pressure (higher vasodilatation in EN than in CN group) illustrates the increase of vasoconstriction after PE (* $p < 0.05$)

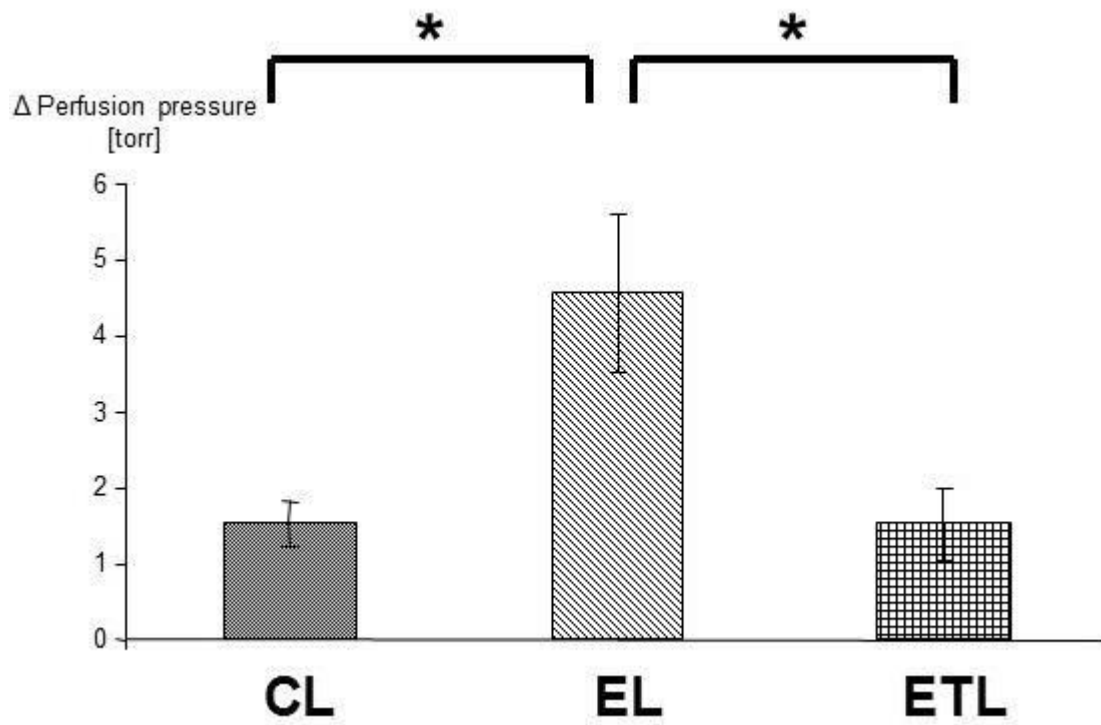


Fig. 4. Higher increase of perfusion pressure after L-Name administration in rats with PE (EL) is caused by higher activity of NO synthase after PE (* $p < 0.01$)

PŘÍLOHA 2

Sedivy V, Joshi S, Ghaly Y, Mizera R, Zaloudikova M, Brennan S, Novotna J, Herget J, Gurney AM. Role of Kv7 channels in responses of the pulmonary circulation to hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 308: L48–L57, 2015.
First published October 31, 2014; doi:10.1152/ajplung.00362.2013.

Role of Kv7 channels in responses of the pulmonary circulation to hypoxia

Vojtech Sedivy,^{1,4} Shreena Joshi,² Youssef Ghaly,¹ Roman Mizera,¹ Marie Zaloudikova,³ Sean Brennan,²

Jana Novotna,⁵ Jan Herget,¹ and Alison M. Gurney²

¹Department of Physiology, Charles University - Second Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic; ²Faculty of Life

Sciences, University of Manchester, Manchester, United Kingdom; ³Department of Pathophysiology, Charles

University Second Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic; ⁴Department of Paediatrics, Charles

University - Second Faculty of

Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; and ⁵Department of Biochemistry, Charles

University Second Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic

Submitted 11 December 2013; accepted in final form 16 September 2014

Sedivy V, Joshi S, Ghaly Y, Mizera R, Zaloudikova M, Brennan S, Novotna J, Herget J, Gurney AM. Role of Kv7 channels in responses of the pulmonary circulation to hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 308: L48–L57, 2015. First published October 31, 2014; doi:10.1152/ajplung.00362.2013.—Hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) is a beneficial mechanism that diverts blood from hypoxic alveoli to better ventilated areas of the lung, but breathing hypoxic air causes the pulmonary circulation to become hypertensive. Responses to airway hypoxia are associated with depolarization of smooth muscle cells in the pulmonary arteries and reduced activity of K channels. As Kv7 channels have been proposed to play a key role in regulating the smooth muscle membrane potential, we investigated their involvement in the development of HPV and hypoxia-induced pulmonary hypertension. Vascular effects of the selective Kv7 blocker, linopirdine, and Kv7 activator, flupirtine, were investigated in isolated, saline-perfused lungs from rats maintained for 3–5 days in an isobaric hypoxic chamber (F_{IO₂} 0.1) or room air. Linopirdine increased vascular resistance in lungs from normoxic, but not hypoxic rats. This effect was associated with reduced mRNA expression of the Kv7.4 channel -subunit in hypoxic arteries, whereas Kv7.1 and Kv7.5 were unaffected. Flupirtine had no effect in normoxic lungs but reduced vascular resistance in hypoxic lungs. Moreover, oral dosing with flupirtine (30 mg/kg/day) prevented short-term in vivo hypoxia from increasing pulmonary vascular resistance and sensitizing the arteries to acute hypoxia. These findings suggest a protective role for Kv7.4 channels in the pulmonary circulation, limiting its reactivity to pressor agents and preventing hypoxia-induced pulmonary hypertension. They also provide further support for the therapeutic potential of Kv7 activators in pulmonary vascular disease.

KCNQ; Kv7 channels; flupirtine; isolated lungs; hypoxic pulmonary vasoconstriction; P/Q relationship

HYPOXIC PULMONARY VASOCONSTRICTION (HPV) is an important physiological mechanism that helps to match ventilation with perfusion in the lungs. It reduces perfusion in poorly ventilated alveoli in order to optimize the oxygenation of arterial blood. The main sensors of O₂ and effectors of HPV are pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) (30). The cellular mechanisms leading to HPV remain unclear, but the response probably involves multiple pathways that raise the cytoplasmic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) and sensitize the smooth muscle contractile proteins to Ca²⁺ (50).

A consistent finding is that hypoxia depolarizes PASMC, at least in part by inhibiting K channels (29, 39, 43). The extent

Address for reprint requests and other correspondence: V. Sedivy, Dept. of Physiology, Charles Univ. in Prague - 2nd Faculty of Medicine, Plzenska 221/130, Prague 5, 150 00 Czech Republic (e-mail: vojtech.sedivy @seznam.cz).

to which this contributes to HPV is controversial, opinions ranging from essentially no role (46) to its being a key initiator of HPV (3, 32, 34). Whether or not depolarization is required for HPV, it is clear that it has the potential to promote or enhance the response. With a sufficiently large depolarization, the membrane potential will reach the threshold for L-type Ca^{2+} channel activation (5), causing Ca^{2+} influx and promoting vasoconstriction. The nature of the K channels contributing to hypoxia-induced depolarization is also debated. Voltage-gated Kv1.5 and Kv2.1/9.3 channels have both been implicated (2–3, 32), as have voltage-independent, two-pore domain TASK channels (12, 38). Kv7 channels are new potential candidates, because several genes encoding Kv7 channel - subunits (KCNQ1, KCNQ4, and KCNQ5) are expressed in PASMC and the channels appear to be active at the resting membrane potential (24, 25). This was demonstrated by the selective Kv7 channel inhibitors, linopirdine and XE991, causing pulmonary selective, endothelium-independent, but Ca^{2+} influx dependent vasoconstriction (24). The low voltage threshold for activation of Kv7 channels and their lack of inactivation during sustained depolarization suit Kv7 channels to a role in regulating the resting membrane potential (13). The susceptibility of Kv7 channels to pharmacological manipulation additionally makes them an attractive therapeutic drug target.

Following prolonged exposure to a hypoxic environment, for example in obstructive lung disease patients or at high altitude, the pulmonary circulation becomes hypertensive. This disease state is associated with sustained depolarization of the PASMC, along with loss of K channel activity (39, 47, 49, 55). The loss of K channel expression occurs early during the development of hypoxia-induced pulmonary hypertension (HPH), suggesting a causative role. Kv1.2, Kv1.5, and Kv2.1 were found to be downregulated within 24 h of exposure to hypoxia, while other K channel - and -subunits were unaffected (21). The expression of Kv7 channels in HPH has not been investigated, but in a mouse model of pulmonary hypertension (PH) induced by overexpression of the serotonin transporter, the ability of a Kv7 inhibitor to constrict and a Kv7 activator to dilate pulmonary arteries was markedly suppressed (35). Reduced vasodilation in response to Kv7 activators was also observed in systemic arteries from spontaneously hypertensive rats, where it was linked to loss of expression of the Kv7.4 channel subunit (23). Interestingly, despite the reduced sensitivity of pulmonary arteries to Kv7 modulators in mice with PH, the Kv7 activator, flupirtine, was able to return pulmonary artery pressure to normal, and it was able to prevent the development of HPH in mice exposed chronically to hypoxia (35).

This study investigated the role of Kv7 channel activity in the reaction of the rat pulmonary vascular bed to acute and short-term (3–5 days) hypoxia, in isolated, saline-perfused lungs. This preparation develops large pressor responses to airways hypoxia, but only if the lungs are first prestimulated, or primed, with a vasoactive substance that raises the basal perfusion pressure and overall vasoreactivity (16, 18, 33). The mechanism responsible for this priming effect is unknown, but it can be induced by the nonspecific Kv channel inhibitor 4-aminopyridine (4-AP) and other agents promoting smooth muscle depolarization and Ca^{2+} influx (15, 33). The ability of the Kv7 blocker, linopirdine, to modulate HPV was therefore investigated in both priming of the lungs to hypoxia and the steady-state HPV in preprimed, saline-perfused lungs. To assess the potential involvement of Kv7 channels in the development of HPH, we investigated how *in vivo* exposure to hypoxia for 3–5 days affects

Kv7 channel expression and the responsiveness of the pulmonary circulation to Kv7 modulators. This period corresponds to the earliest time that structural changes and a rise in mean pulmonary artery pressure can be detected (19, 44). The mechanisms investigated may differ from those operating in established PH but are likely to be important during the onset of disease. In each case pulmonary vascular resistance, which is elevated in hypoxic rats (7), was measured from the slope of the pressure-flow (P/Q) relationship. Oral dosing with flupirtine assessed its ability to prevent early changes in pulmonary vascular reactivity that take place during the development of HPH in rats.

METHODS

Experiments employed male Wistar rats aged 1–2 mo, weighing 290–310 g (Biotest, Konarovice, Czech Republic) and were approved by the Animal Studies Committee at Charles University Second Medical School, in accordance with European Community and US National Institutes of Health guidelines for using experimental animals. Experiments on isolated lungs and *in vivo* exposure to hypoxia (normobaric chamber, $\text{F}_{\text{I}\text{O}_2}$ 0.1) were carried out in Prague. Arteries from lungs excised in Prague were either snap-frozen in liquid nitrogen for later protein extraction, stored in RNAlater (Life Technologies, Paisley, UK) for mRNA analysis, or mounted in paraffin blocks for sectioning and immunolabeling. Samples were shipped to Manchester for analysis.

Isolated saline perfused rat lungs. Isolated perfused rat lungs were prepared as described previously (17). Rats were anaesthetized (50 mg/kg *ip* thiopental) and ventilated through a tracheal cannula [peak inspiratory pressure 10 cmH₂O, positive end-expiratory pressure (PEEP) 2 cm H₂O, 50 breaths/min]. The chest was opened, heparin introduced into the right ventricle, and the pulmonary artery and left ventricle cannulated. The heart-lung block was placed into a humidified chamber and maintained at 38°C. The lungs were ventilated with a normoxic gas mixture, containing 21% O₂ and 5% CO₂, balanced with N₂. The lung circulation was perfused with a physiological salt solution (PSS) containing albumin (4 g/100 ml perfusate) via the pulmonary artery, using a peristaltic pump. The perfusate dropped freely from the left ventricle cannula into a reservoir, from which it was pumped again into the pulmonary artery. PSS contained in mM: 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.16 MgSO₄, 17 NaHCO₃, 1.18 KH₂PO₄, 3.2 CaCl₂, and 5.5 D-glucose. The potentially confounding effects of endothelial

vasoactive mediators like nitric oxide (NO) and prostaglandins were prevented by including inhibitors of their synthesis [17 M meclofenamate and 50 M nitro-L-arginine-methyl-ester (LNAME)] in the perfusate. Although meclofenamate activates neuronal Kv7 channels comprising KCNQ2/3 subunits with an EC₅₀ of 20 M (40), it was reported to have no effect on vasoconstriction induced by the linopirdine analog XE991 (54). Meclofenamate is not therefore expected to interfere with the vascular action of linopirdine in isolated lungs. On the other hand, because meclofenamate can dilate isolated arteries, possibly as a consequence of activating Kv7 channels (54), we omitted this drug from the perfusate when testing the effects of the Kv7 activator, flupirtine.

Isolated lung protocols. When investigating the effects of linopirdine on the pulmonary perfusion pressure and its response to stimulation, we perfused lungs at a constant flow rate of 4 ml·min⁻¹·100 g⁻¹. Changes in perfusion pressure therefore directly reflected changes in vascular resistance. The relationship between pulmonary perfusion pressure and perfusion flow (P/Q plot) was measured by increasing flow in a stepwise manner until it reached 150% of the basal level. Lungs were not ventilated during this protocol and the alveolar pressure was 2 cmH₂O (PEEP). Before beginning P/Q measurements the lungs were perfused with PSS for 15 min to ensure a stable perfusion pressure, followed by priming with two cycles of angiotensin II application (0.2 g added into the inflow cannula) followed by ventilation for 7 min with a hypoxic gas mixture (0% O₂, 5% CO₂, 95% N₂) to induce HPV. After linopirdine or flupirtine was added to the perfusate the drugs could not be washed out to test for recovery. We therefore investigated drug effects by comparing groups of untreated lungs with treated lungs.

The effect of linopirdine on the responsiveness of the pulmonary circulation to hypoxia was first investigated in lungs that had been continually perfused with PSS for various periods but not primed with any vasoconstrictor stimulus. Linopirdine (230 g) was administered as a bolus injection into the inflow cannula at the start of the experiment to give an effective concentration of 12 M. This concentration was maximally effective at constricting rat pulmonary arteries *in vitro* (24) and within the range of EC₅₀ values reported for Kv7 channel inhibition (45), while having little effect on a wide range of other ion channels (27, 36, 52, 53). Hypoxic pressor responses were elicited after 15, 30, and 65 min of lung perfusion by switching the ventilation gas mixture. HPV was then compared between lungs exposed to linopirdine (*n* = 6) and untreated, control lungs (*n* = 5).

The effects of linopirdine on HPV were also investigated in lungs that had been equilibrated for 15 min then primed by two cycles of angiotensin II (0.2 g) injection followed by 7 min exposure to hypoxia. In this series of experiments we also investigated the effect of adding 4-AP, a nonspecific but mainly Kv1 channel blocker, in the presence of linopirdine. After priming, linopirdine was added to the reservoir to give a circulating concentration of 12 M. After allowing 10 min to reach a steady state, we repeated stimulation with angiotensin II followed by hypoxia. In a separate group of lungs, linopirdine exposure was followed 10 min later by the addition of 4-AP to the reservoir, to give a circulating concentration of 3 mM, and after another 10 min the lungs were challenged again with angiotensin II followed by hypoxia. The perfusion pressures before and during the test stimulation with angiotensin II or hypoxia were measured and compared before and after the lungs were treated with linopirdine only or linopirdine followed by 4-AP.

The effects of flupirtine were tested on isolated lungs that had been primed by two cycles of angiotensin II followed by acute airways hypoxia. Flupirtine was added to the reservoir to give a circulating concentration of 20 M. At this concentration flupirtine evokes nearly 50% of its maximum pulmonary vasodilator effect (25) and activates Kv7 channels, while having minimal effects on a number of other ion channels (26). Higher concentrations were not tested, because even at 20 M, flupirtine caused partial inhibition of Ca²⁺ channel currents in bladder smooth muscle cells (1).

In vivo treatment. This part of the study was designed to investigate the *in vivo* effects of the Kv7 activator flupirtine on hypoxic pulmonary hypertension induced by ventilatory hypoxia. Groups of rats were exposed to an hypoxic environment by maintaining them in an isobaric hypoxic chamber (F_{IO₂} 0.1) for 5 days (14). An age-matched control group of rats was kept in room air (normoxia, *n* = 6). One group of rats exposed to hypoxia was administered flupirtine 15 mg/kg twice a day by gavage (*n* = 6) throughout the exposure period. As flupirtine was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), a further group exposed to hypoxia was administered the same volume of DMSO as a vehicle control (*n* = 6). A third group (hypoxia control) was exposed to hypoxia but received no other treatment (*n* = 6). At the end of the treatment period, isolated perfused lungs were prepared as above for subsequent *in vitro* experiments. *mRNA analysis.* As many intrapulmonary arteries as possible were dissected from rat lungs and used for the extraction of total RNA with an RNeasy Micro Kit (Qiagen). Real-time quantitative PCR was performed on cDNA synthesized from the DNase-treated RNA. Primers were designed with Gene Runner software (version 3, Hasting software) and Vector NTI (Invitrogen) for KCNQ1, KCNQ4 and KCNQ5, using GenBank sequences with the respective accession numbers NM_0320773, XM_233477, and XM_237012. Where possible, primers were designed to span introns, to detect any contamination by genomic DNA. The primer sequences are listed in Table 1. Reactions were carried out in 25 l volumes containing 1 l cDNA, 12.5 l SYBR Green master mix, 10 l H₂O, and 7.5 pmol of each primer, using an Applied BioSystems 7500 PCR system, according to the manufacturer's instructions. Amplicons were 77–106 bp long. The cycling parameters were 95°C for 15 min, followed by 40 cycles at 95°C for 1 min, 58°C for 40 s, and 68°C for 40 s. A dissociation step was performed at the end of the reaction for melting curve analysis, a single peak in the curve representing specific production of the product. ABI 7500 software was used for data analysis. An absolute quantification method was used, in which we determined the input copy number by relating the PCR signal to a standard curve. Expression levels were then normalized against the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, measured simultaneously in the same samples using the primers listed in Table 1. Experiments were carried out in triplicate from the pooled RNA of three rats exposed to normoxia or hypoxia.

Protein expression. Kv7.4 protein expression was measured in arteries from control rats, rats exposed to hypoxia for 4 days, and rats administered flupirtine (30 mg/kg/day) for 1 day before and during exposure to hypoxia for 4 days (*n* = 4). As many arteries as possible were collected from each lung and homogenized with a Wheaton glass tissue grinder (VWR International, Lutterworth, UK) in ice-cold RIPA buffer, containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 1 cOmplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Burgess Hill, UK). Samples were centrifuged at 1,000 g for 2 min, and we analyzed the supernatant by Western blotting after determining the total protein concentration using a BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Cramlington, UK). Supernatant samples were incubated for 7 min at 95°C

with Laemmli loading buffer containing 25 mM Tris·HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 5% -mercaptoethanol, 2% SDS, and 0.04% bromophenol blue. Proteins were separated by 10% SDS-PAGE, transferred onto a Immobilon-P PVDF membrane [Millipore (UK), Watford, UK] and washed three times in Tris-buffered saline (TBS: 25 mM Tris·HCl, 150 mM NaCl, pH 7.3) with 0.1% Tween 20 (TTBS). The membrane was blocked for 1 h at room temperature with 5% milk powder in TTBS then cut between the 50 and 70 kDa size markers. The upper part of the membrane was incubated overnight at 4°C with a mouse monoclonal anti-Kv7.4 antibody (cat. #75-082, Neuromab) diluted in 1% milk powder in TTBS. The lower part was treated in the same way, but with an antibody directed against -tubulin (Sigma, Poole, UK) as an internal control. After being washed, the membranes were then incubated for 2 h with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), diluted in 1% milk powder in TTBS. Antibody binding was detected with SuperSignal West Femto (Kv7.4) or Pico (-tubulin) Chemiluminescent Substrate kits (Thermo Fisher Scientific) and a ChemiDoc imaging system (Bio-Rad).

We validated the Kv7.4 antibody by comparing Western blots obtained from proteins extracted from wild-type human embryonic kidney 293T (HEK-293T) cells and HEK-293T cells transfected with recombinant KCNQ4 (GenBank accession number AF105202) using the pcDNA 3.1 Expression Vector (Life Technologies) and X-tremeGENE9 (Roche Diagnostics).

Immunostaining. Lungs were removed en bloc, perfused via the trachea (12 Torr) and pulmonary artery (25 Torr) with 4% paraformaldehyde and then dipped in paraformaldehyde for 24 h. The left lung was cut into four sections and fixed in paraformaldehyde for 4 days before being washed in running water for 3–4 h. The fixed sections were then dehydrated with alcohol in increasing concentration: 80% for 24 h, 96% for 4 h, and then absolute alcohol overnight. After being dipped in cedar oil for 2 days, the sections were incubated in xylene for 10–15 min and then embedded in paraffin wax. We deparaffinized issue sections (5 m) cut with a microtome and rehydrated by dipping them in xylene and graded alcohol as follows: xylene for 5 min twice, 100% alcohol for 3 min twice, 90% alcohol for 3 min, 70% alcohol for 3 min, phosphate-buffered saline (PBS) in distilled H₂O for 3 min twice. The sections were placed in citrate buffer and heated in a microwave at medium power for 15 min before being washed three times with PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 1 h. After being blocked with 1% BSA for 1 h, tissue sections were incubated with an anti-Kv7.4 antibody (Santa Cruz, S18, 1:100 dilution) for 24 h and then probed for 1 h with secondary antibody conjugated to Alexa fluor 594 (Molecular Probes). The fluorescent DNA marker 4=,6-diamidino-2-phenylindole was added at 2 g/ml to enable visualization of cell nuclei. Duplicate sections were processed without primary antibody or after the primary antibody was incubated with excess antigen, for controls. Fluorescence was imaged using a confocal microscope with 40 water dipping objective (Nikon).

Analysis of plasma NO. Blood samples were collected from the left ventricles of rats used to study the in vivo effects of flupirtine, before the lungs were prepared for experiments. Plasma was separated from the blood, and the total plasma concentration of NO and its oxidation

Table 1. Primers used for quantitative PCR analysis of KCNQ expression

Gene	GenBank Accession Number	Primer Pair Sequences (5=–3=) Forward; Reverse	Span Region
KCNQ1	NM_032073	GGCTCTGGGTTTGCACTG; CATAGCACCTCCATGCAGTC	1131–1236
KCNQ4	XM_233477	CCCCGCTGCTCTACTGAG; ATGACATCATCCACCGTGAG	1181–1266
KCNQ5	NM_001134643	CGAGACACGACAGATGACC; TGGATTCAATGGATTGTACCTG	2012–2088
GAPDH	NM_017008	CCATCAAGGACCCCTTCATT; CACCAGCATCACCCATTT	164–343

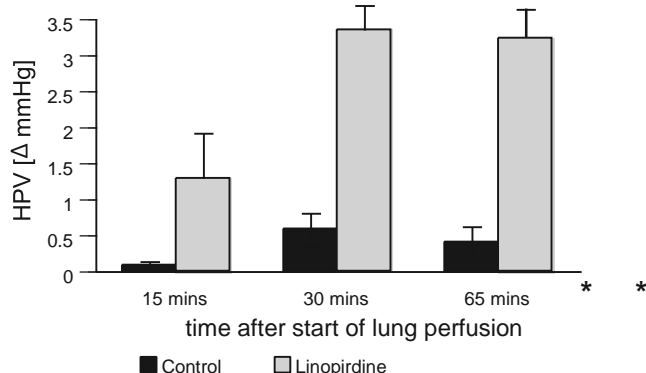


Fig. 1. Linopirdine primes hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) in saline-perfused rat lungs. HPV response measured in unprimed lungs 15, 30, or 65 min after bolus injection of 230 g linopirdine into the inflow cannula to give an effective concentration of 12 M (gray, n 6) and in timematched controls (black, n 5). *P 0.05 vs. control.

products (NO_x) was measured with a NO chemiluminescence analyzer (Sievers model 280i) as previously described (20, 22).

Drugs. Linopirdine dihydrochloride and flupirtine maleate were purchased from Tocris Bioscience and prepared as 10 mM stock solutions dissolved, respectively, in water or DMSO. Aliquots of the stock solutions were stored frozen and thawed

once for each experiment. All other drugs were from Sigma Aldrich. 4-AP was dissolved in PSS and 0.2 ml added to 40 ml of circulating perfusate for each lung preparation.

Statistical analysis. All data are shown as means \pm SE and analyzed by Statview software with ANOVA or repeated-measures ANOVA and Fisher's protected least significant difference post hoc test. Where indicated a paired *t*-test was used. Differences were considered statistically significant when *P* \leq 0.05.

RESULTS

Linopirdine primes HPV in saline-perfused rat lungs. In the absence of priming, salt-perfused lungs respond poorly to hypoxia (33), and this was seen in our study (Fig. 1). The basal perfusion pressure before each challenge with hypoxia was not found to differ significantly at any time point between the control and linopirdine-treated lungs. There was also no significant change in the basal perfusion pressure during the experiments. At 15 min it was 10 ± 1.5 mmHg in control lungs and 8.1 ± 0.57 mmHg in lungs exposed to linopirdine. The values at 30 min and 65 min were respectively (control vs. linopirdine) 9 ± 1.1 vs 7.89 ± 0.46 mmHg and 9 ± 1.1 vs 8.0 ± 0.52 mmHg. Thus, in the absence of priming, pulmonary perfusion pressure was unaffected by linopirdine. In contrast, the pressor response to acute hypoxia was found to be significantly potentiated, by approximately sevenfold, at 30 and 65 min after linopirdine injection (Fig. 1).

Linopirdine potentiates HPV in primed lungs. The effects of linopirdine on primed lungs are summarized in Fig. 2. Before Kv channel blockers were administered, the basal perfusion pressure and the reactivity to angiotensin II and hypoxia did not differ between the groups at any time point. The administration of linopirdine to primed lungs, either on its own or with 4-AP, caused an increase in basal perfusion pressure (Fig. 2A), reflecting its vasoconstrictor action. The rise in pressure caused by linopirdine alone was the same in both groups: 1.4 ± 0.24 mmHg (*n* = 6) in lungs exposed to linopirdine only and 2.0 ± 0.7 mmHg (*n* = 6) in lungs that were later exposed to 4-AP as well. The addition of 4-AP caused a further increase in perfusion pressure, of 4.3 ± 0.37 mmHg over and above that induced by linopirdine.

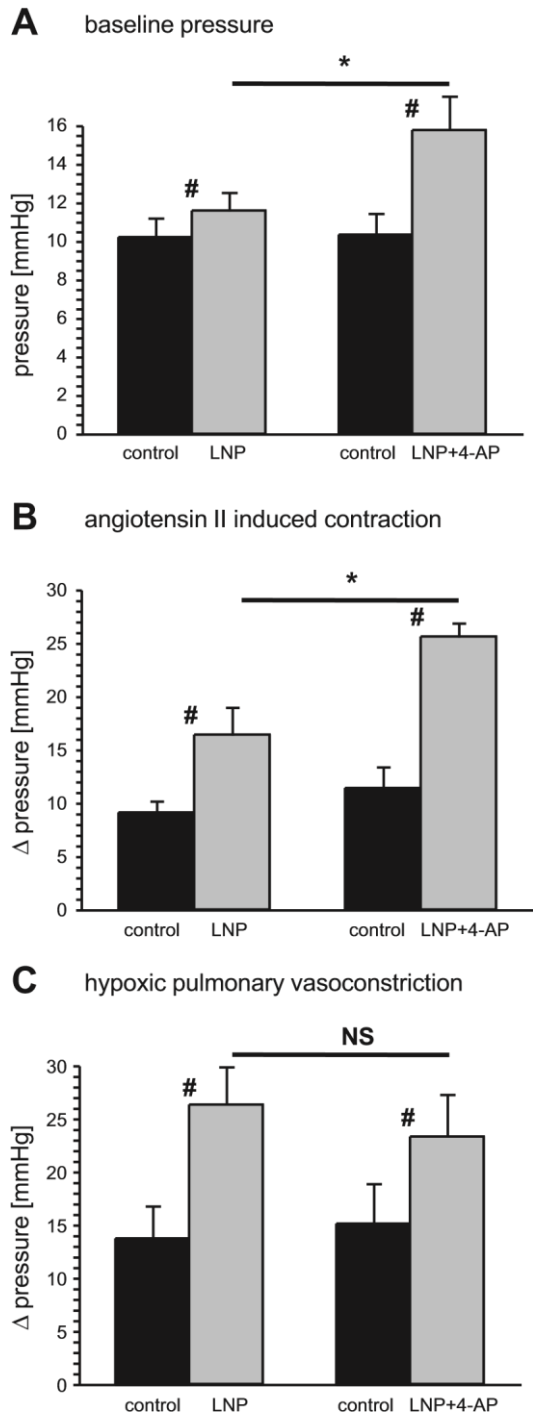
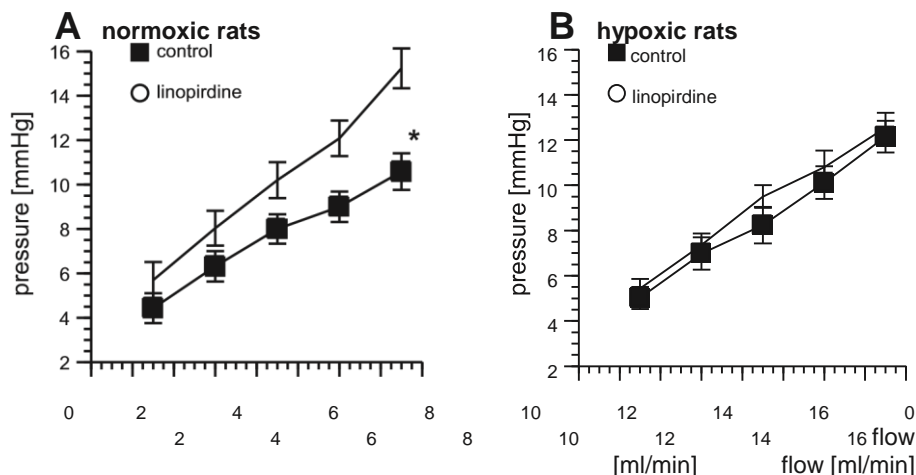


Fig. 2. Kv channel inhibition modulates pulmonary vascular responses to hypoxia and angiotensin II in primed lungs. Baseline perfusion pressure (A), angiotensin II-induced vasoconstriction (B), and HPV (C) measured in primed lungs before (control, black bars) and after exposure to 12 M linopirdine (LNP) or 12 M linopirdine plus 3 mM 4-aminopyridine (4-AP) (LNP 4-AP) (gray bars). #*P* 0.05 control vs. LNP or LNP 4-AP, **P* 0.05 LNP vs. LNP 4-AP; *n* 6 for both group. NS, not significant.

Fig. 3. Loss of response to linopirdine in chronic hypoxia. Pressure-flow (P/Q) plots measured in primed lungs from normoxic (A) and 3-day hypoxic (B) rats in control conditions and after exposure to linopirdine (10 M). * P 0.05 linopirdine vs. control; n 6 for each group.



The pressor response to angiotensin II in primed lungs was enhanced by linopirdine, and it was further enhanced when 4-AP was added (Fig. 2B). In contrast, although HPV was potentiated by the Kv channel blockers, the addition of 4-AP did not cause any greater increase than that produced by linopirdine on its own (Fig. 2C). Linopirdine caused the pressor response to hypoxia to increase from 14.3 to 26.4 mmHg (P 0.05, paired t -test). With the combined administration of linopirdine and 4-AP, the pressor response to hypoxia increased from 15.4 to 23.4 mmHg (paired t -test, P 0.05), which was not significantly different from that seen with linopirdine alone.

Loss of Kv7 channel activity early in the development of HPH. The P/Q relationships measured during stepwise increases in flow rate were linear (R^2 0.94) in all primed lungs studied, whether from rats exposed for 3–5 days to isobaric hypoxia or maintained in a normoxic environment. The slope of the line corresponds to incremental flow resistance and the pressure axis intercept to the average critical closing pressure (41, 48). The P/Q relationships measured in normoxic lungs (n 6) and 3-day hypoxic lungs (n 6) did not differ significantly (Fig. 3; compare normoxic control in A with hypoxic control in B). The ability of linopirdine to constrict pulmonary vessels in primed lungs was, however, lost in the hypoxic rats. Although linopirdine caused a significant elevation of the baseline pulmonary perfusion pressure in the lungs of rats exposed to normoxic air, it had no effect in the lungs from matched hypoxic rats. This difference is apparent in the P/Q relationships measured before and 10 min after the addition of linopirdine (10 M) to the reservoir (Fig. 3): two-factor ANOVA indicates a significant effect in control, but not hypoxic lungs. Linopirdine increased the slope of the P/Q relationship in normoxic lungs from 0.49 ± 0.01 to 0.81 ± 0.08 mmHg·min/ml (P 0.05, paired t -test), without changing the intercept with the pressure axis (Fig. 3A). Neither the slope nor the pressure intercept in hypoxic lungs were affected by linopirdine (Fig. 3B).

Effect of hypoxia on the dilator response to flupirtine. In contrast to what was found with linopirdine, flupirtine, circulating at a concentration of 20 M, had no effect on the pulmonary perfusion pressure of lungs from control rats but caused pulmonary vasodilation in the lungs from hypoxic rats. Figure 4 shows P/Q measurements (n 5) made in primed lungs, with or without the addition of flupirtine to the reservoir 10 min after priming. Two-factor ANOVA indicates a significant effect of flupirtine only on the lungs from hypoxic rats. When the slope and pressure intercept of the P/Q plot were analyzed separately, flupirtine was found to have no significant effect on either parameter in the normoxic lungs. In contrast, the lungs from the hypoxic rats displayed a significant reduc-

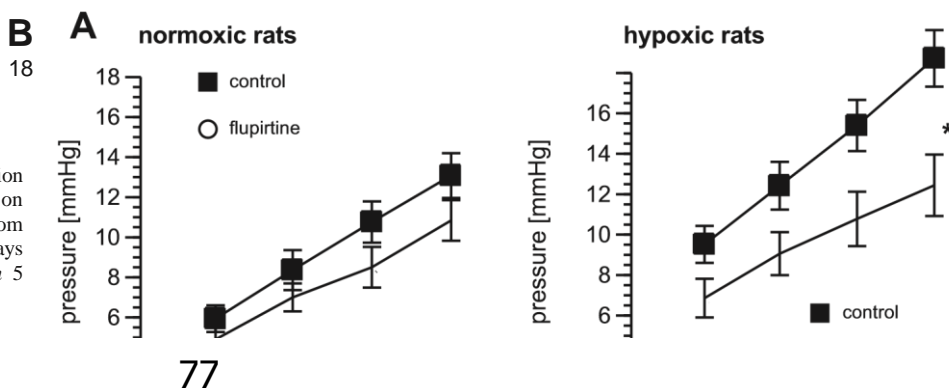


Fig. 4. Flupirtine causes pulmonary vasodilation in chronic hypoxia. Effect of flupirtine (20 M) on P/Q plots measured in primed lungs from normoxic controls (A) and rats exposed for 5 days to hypoxia (B). * P 0.05 flupirtine vs. control; n 5 for each group.

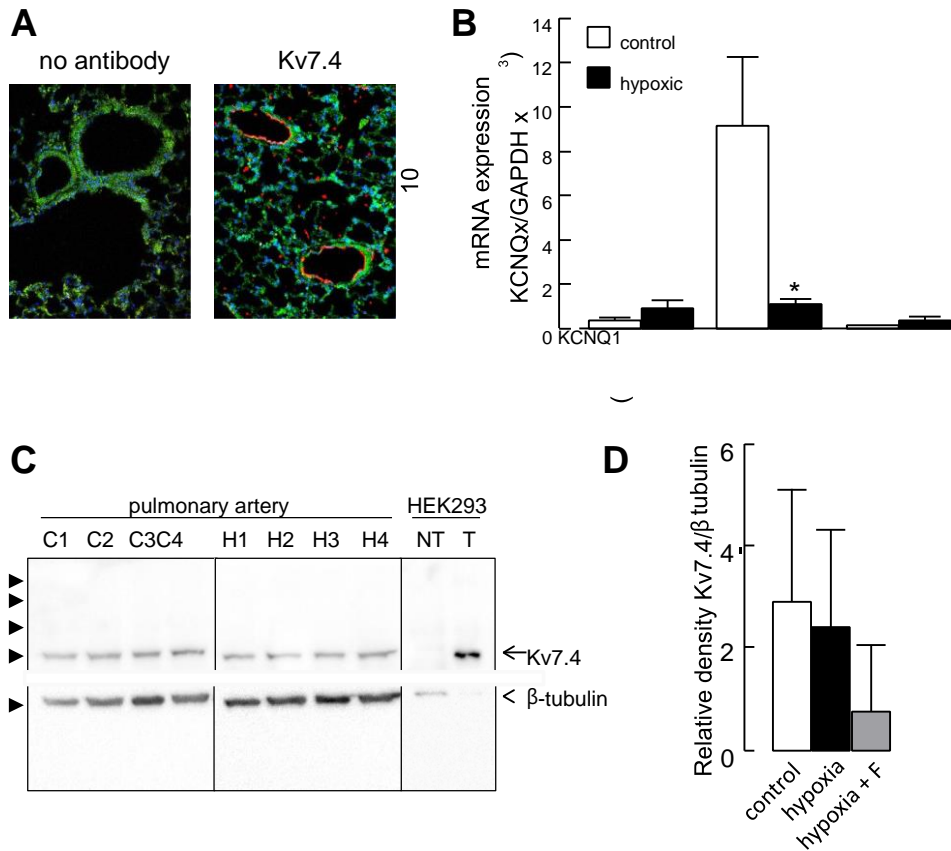


Fig.5. Hypoxia downregulates Kv7.4 mRNA expression. *A*: fluorescence images of lung sections from normoxic rats showing auto-fluorescence (green) and labeling with anti-Kv7.4 antibody (red) and the nuclear marker 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue). Sections were treated identically, except for omission of the Kv7.4 antibody in the control. Calibration bars 100 μ m. *B*: expression profile of KCNQ1, KCNQ4, and KCNQ5 subunit mRNAs in rat pulmonary artery from rats maintained in a normoxic (control) or hypoxic

environment for 3 days. Detected with quantitative RT-PCR and normalized to the expression of GAPDH ($n = 3$). * $P < 0.05$ hypoxic vs. control. *C*: Western blots of pulmonary artery proteins from 5 separate normoxic (C1–C4) and hypoxic (H1–H4) rats and proteins from nontransfected HEK-293T cells (NT) and HEK-293T cells overexpressing Kv7.4 channels (T). Proteins were separated on a 10% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane, which was cut between the 50 and 75 kDa markers and probed separately with antibodies against Kv7.4 and β -tubulin. Arrowheads indicate the positions of molecular weight markers (kDa). *D*: densitometric analysis of Western blots showing Kv7.4 expression normalized to β -tubulin in arteries from normoxic (control) and hypoxic rats, as well as rats administered flupirtine (F, 30 mg/kg/day) and exposed to hypoxia for 5 days ($n = 4$).

tion in the slope of the P/Q relationship, without a change in the pressure intercept (Fig. 4B). The slope fell from 0.75 \pm 0.07 mmHg \cdot min/ml in control conditions to 0.49 \pm 0.05 mmHg \cdot min/ml ($P < 0.05$) after addition of flupirtine, indicating a drop in incremental flow resistance.

Altered expression of KCNQ4 mRNA in hypoxic pulmonary arteries. Immunostaining of fixed lung sections showed that Kv7.4-positive cells are mainly localized to blood vessels and form a ring around the blood vessel lumen (Fig. 5A). Figure 5B shows the relative expression of KCNQ1, KCNQ4, and KCNQ5 mRNAs in pulmonary arteries from age-matched rats maintained for 3 days in a hypoxic or normoxic environment. While no significant differences were detected in the expression of KCNQ1 or KCNQ5 mRNA between hypoxic and normoxic lungs, there was a significant loss of KCNQ4 mRNA expression in the hypoxic lungs. Western blots confirmed the expression of Kv7.4 protein in pulmonary arteries from normoxic and hypoxic lungs (Fig. 5C). Densitometric analysis of the protein bands did not detect a significant change in Kv7.4 protein (measured relative to β -tubulin) in vessels from hypoxic rats, whether or not they were administered flupirtine (Fig. 5D).

Flupirtine inhibits hypoxic pulmonary hypertension. Table 2 shows the effects of 5-day hypoxia and oral flupirtine treatment (30 mg/kg/day) on the P/Q relationship and vascular reactivity measured in isolated lungs. Five-day exposure to hypoxia caused an increase in the P/Q slope relative to the normoxic controls, indicative of increased incremental flow resistance. This increase was absent in the rats treated with flupirtine, but not in those treated with vehicle. Thus flupirtine prevented the early rise in pulmonary vascular resistance that leads to HPH. Exposure to hypoxia or flupirtine did not affect the P/Q intercept (Table 2). Moreover, lungs from animals exposed to 5-day hypoxia had an enhanced response to acute hypoxia compared with the normoxic controls. This effect of hypoxia was also prevented by flupirtine treatment but not vehicle. Flupirtine did not alter the overall reactivity of hypoxic lungs, because the vasoconstriction to angiotensin II was potentiated in all groups exposed to hypoxia (Table 2).

Plasma NO levels. Kv7 activators dilate pulmonary arteries through a direct action on smooth muscle (25). Activators of K_{ATP} channels also dilate pulmonary arteries by hyperpolarizing the smooth muscle (4) and inhibit

Table 2. Flupirtine treatment decreases incremental flow resistance and HPV in rats exposed to 5-day hypoxia

Group	P/Q Slope, mmHg \cdot min/ml	P/Q Intercept, mmHg	HPV, mmHg	ANG II Constriction, mmHg	NOx in Plasma, M
Normoxia	0.541 \pm 0.052	3.6 \pm 0.7	5.3 \pm 1.0	5.6 \pm 0.6	26.0 \pm 2.5
Hypoxia	0.672 \pm 0.05*	3.7 \pm 0.4	8.5 \pm 1.1*	9.3 \pm 1.3*	46.6 \pm 8.3*
Hypoxia flupirtine	0.475 \pm 0.022†	5.3 \pm 0.8	4.9 \pm 1.0†	11.7 \pm 1.4*	47.5 \pm 2.6*
Hypoxia vehicle	0.678 \pm 0.111*	3.6 \pm 1.1	9.6 \pm 1.4*	9.0 \pm 0.8*	40.0 \pm 2.5*

The pressure-flow (P/Q) slope and intercept, amplitude of hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV), and angiotensin II (ANG II) induced vasoconstriction and total plasma concentration of nitric oxide (NO) and its oxidation products (NOx) in rats exposed to normoxic or hypoxic conditions. One group of hypoxic rats also received 30 mg/kg/day flupirtine, while another group had an equivalent volume of vehicle. * $P < 0.05$ vs. normoxia. † $P < 0.05$ vs. hypoxia and hypoxia with vehicle; $n = 6$ for each group.

HPH (37). Recent studies suggest, however, that the effectiveness of K_{ATP} channel activators in HPH may be due to an action on endothelial K_{ATP} channels, which rescues NO production from the dysfunction induced by hypoxia (57). As Kv7 channel expression in endothelial cells has not been addressed, we tested the possible involvement of such an effect in the response to short-term *in vivo* hypoxia and the protective effect of flupirtine by measuring plasma levels of NO and its oxidation products (NOx). Table 2 shows that the plasma concentration of NOx was increased in all groups of rats exposed to hypoxia, but it was unaffected by flupirtine.

DISCUSSION

The results of this study implicate Kv7 channels in the development of HPV and the response to short-term hypoxia *in vivo*. In saline-perfused lungs, the specific Kv7 channel blocker, linopirdine, was found to prime the lungs for HPV and to potentiate HPV after priming. Kv7 channels may therefore play an inhibitory role, hyperpolarizing the membrane and preventing excitation and Ca^{2+} influx. Exposing rats to hypoxia for a few days reduced the expression of KCNQ4 mRNA and the responsiveness of the pulmonary circulation to Kv7 modulating drugs. This suggests that there is loss of Kv7.4 channel activity, which would contribute to enhanced excitation and vasoreactivity. Despite the apparent loss of functional Kv7 channels, there appeared to be little change in the level of Kv7.4 protein expression, and flupirtine was able to return the raised pulmonary vascular resistance to control levels and to prevent the effects of short-term hypoxia. The lack of effect of flupirtine on plasma NO confirmed that its protective effect against hypoxia was due to its direct action on pulmonary artery smooth muscle and not to enhanced endothelial function.

HPV depends on the level of tone present in the pulmonary circulation at the time O_2 is reduced (9, 33). Vascular tone is normally low (7), at least in part because of K channels that mediate a background K efflux from PASMC and drive the membrane potential to a negative value, thereby preventing voltage-gated Ca^{2+} channels from opening. While several distinct K channels have been proposed to contribute to this background K efflux, many lack the biophysical properties necessary to fulfill such a role effectively (11, 12, 39). Although less is known about Kv7 channels in the pulmonary circulation, their properties suggest that they would be active at the resting potential of PASMC and able to contribute to the background K efflux (13). These properties, characteristic of homo- or heteromeric Kv7 channels formed from the KCNQ1, 4, or 5 genes, include a low voltage threshold for activation (below 60 mV) and lack of inactivation during sustained depolarization (45).

We previously reported that blockade of Kv7 channels with linopirdine (0.5–10 M) causes dose-dependent vasoconstriction in saline-perfused rat lungs (25), consistent with Kv7 channels being open and contributing to the PASMC resting potential. In that study, we tested linopirdine after priming the lungs with cycles of angiotensin II-hypoxia stimulation. We have now found that without priming, linopirdine (at 12 M) does not cause a detectable change in the baseline pulmonary perfusion pressure. In this respect linopirdine behaves much like hypoxia, which only raises pulmonary artery pressure in saline-perfused lungs after they have been primed with a substance that enhances vasoreactivity (33). Interestingly, despite the lack of effect of linopirdine on the baseline perfusion pressure in unprimed lungs, it was able to prime the lungs for HPV, causing marked enhancement of the HPV response. The most likely explanation for this is that linopirdine depolarized the PASMC, thereby facilitating the effects of hypoxia, but the depolarization was too small by itself to activate sufficient Ca^{2+} influx for contraction (5).

Although HPV in saline-perfused lungs is known to require priming, why the effects of linopirdine should require priming is unclear. Both linopirdine and hypoxia depolarize myocytes by 10–15 mV (25, 39, 56). If the cells are in a hyperpolarized state before priming this may not be enough to open Ca^{2+} channels. Alternatively, vasodilator influences generated by the endothelium or other lung cells could offset any depolarization or stimulated Ca^{2+} influx. Although meclofenamate and 1-NAME were included in the perfusate to prevent interference from prostaglandin and NO production (18), we cannot rule out influences from other substances generated in the salt-perfused lungs, either before or during priming. Priming may alternatively reflect changes in Ca^{2+} homeostasis, which in myocytes is regulated by complex coupling between ion channels and transporters in the plasmalemma, sarcoplasmic reticulum (SR), and mitochondria (28). During priming with repeated cycles of angiotensin II-hypoxia, the myocytes are stimulated to contract and raise pulmonary artery pressure. Underpinning the contractions are transient increases in $[Ca^{2+}]_i$, due to Ca^{2+} entry from the extracellular space and the SR. Ca^{2+} entering the cell further serves to replenish the SR store, in order to maintain contraction. Although Ca^{2+} enters the cell in resting conditions, it is rapidly buffered by the peripheral SR, from where it is returned to the extracellular space (28). Thus in the absence of stimulation it is possible that the central SR, required for contraction, becomes depleted of Ca^{2+} and priming serves to replenish the store. This could be important for the priming of HPV, which has been shown to depend on SR Ca^{2+} release (50), but it does not easily explain priming of the linopirdine response, which relies exclusively on Ca^{2+} entry (24). Perhaps the rise in $[Ca^{2+}]_i$ during priming activates Ca^{2+} -dependent enzymes (28), which alter the activity of Kv7 channels, the activation threshold of Ca^{2+} channels, or the Ca^{2+} sensitivity of contraction. Another possible explanation is that activation of the Rho-kinase and/or protein kinase C pathways by angiotensin II during priming leads to persistent Ca^{2+} sensitization, which amplifies the contractile response to Ca^{2+} influx.

The increase in perfusion pressure induced by linopirdine in primed lungs was due to vasoconstriction and an increase in pulmonary vascular resistance, because it was accompanied by an increase in the slope of the P/Q relationship. This agrees with its vasoconstrictor effect on isolated pulmonary artery, where it was measured after routine priming with repeated exposure to KCl (24). The pressor response to linopirdine could be further potentiated by 4-AP. At the concentration tested (12 M), linopirdine is maximally effective on isolated rat pulmonary arteries (24), and 3 mM 4-AP is expected to fully block 4-AP-sensitive Kv channels (6). The additive nature of their effects on pulmonary perfusion pressure is consistent with the drugs acting through independent mechanisms, most likely by inhibiting different ion channels to give an additive effect on membrane potential.

Linopirdine enhanced the pressor response to angiotensin II and further potentiated HPV after it was primed with angiotensin II. Both of these effects may reflect a larger $[Ca^{2+}]_i$ signal, caused by depolarization-induced Ca^{2+} influx adding to the sources of Ca^{2+} mobilized by hypoxia or angiotensin II. The potentiation of HPV was not due simply to the increase in baseline vascular tone, because increasing it further with 4-AP had no additional effect on HPV. On its own 4-AP is known to enhance HPV (15). The lack of synergy between 4-AP and linopirdine suggests that they potentiate HPV by the same mechanism, i.e., depolarization. This is consistent with the idea that sensitivity to hypoxia may be conferred by a “priming” depolarization that activates O_2 -sensitive Kv channels, which would normally oppose the depolarization and minimize Ca^{2+} influx but are inhibited by hypoxia (51). It may not matter how the depolarization is generated. The additive effects of linopirdine and 4-AP on the angiotensin II response suggest that the pressor responses to hypoxia and angiotensin II involve distinct mechanisms.

In rats exposed for only 3 days to a hypoxic environment, the vasoconstrictor effect of linopirdine was essentially abolished. This loss of activity correlated with markedly reduced expression of the KCNQ4 mRNA, but not KCNQ1 or 5. Thus it appears that the pulmonary pressor effect of linopirdine may require K channels containing the Kv7.4 subunit. The result also implicates Kv7.4 channel downregulation in the early phases of development of HPH, and this is likely to contribute to the PASMC depolarization seen around this time (21). Positive staining with a Kv7.4 antibody, seen as a distinct ring around blood vessels, is consistent with expression of the Kv7.4 protein in PASMC. Despite the apparent loss of Kv7 function and Kv7.4 mRNA, we did not detect a significant reduction in Kv7.4 protein in the arteries taken from hypoxic rats at the same time. Protein levels may take longer to fall than the mRNA. On the other hand, as protein levels were assessed in the whole blood vessel, changes in smooth muscle membrane protein may have been missed. Unfortunately, we could not extract sufficient protein to isolate the membrane fraction at detectable levels. The loss of Kv7 function could therefore have been caused by a loss of membrane protein. As the molecular chaperone heat shock protein 90 (Hsp90) is required for Kv7.4 channel assembly in the membrane (10), an impaired interaction between these proteins could also contribute. Three days’ exposure to hypoxia was sufficient to disrupt the interaction of Hsp90 with endothelial nitric oxide synthase and impair NO-dependent pulmonary vasodilation in piglets (8).

The Kv7 activator, flupirtine, had little effect on the perfusion pressure recorded from primed normoxic lungs. This probably reflects the low basal pulmonary vascular tone in these lungs, because to see a dilator effect on rat isolated artery preparations it was necessary to precontract the vessels (25). Interestingly, despite the apparent loss of functional Kv7.4 channels in hypoxic lungs, flupirtine produced a drop in pulmonary perfusion pressure, due to reduced vascular resistance. The ability to evoke vasodilation probably reflects raised intrinsic tone in the hypoxic lungs, but the mechanism is less clear. One possibility is that the loss of expression of Kv7 function and/or another K channel (21) led to an increase in membrane resistance, thereby amplifying the hyperpolarization produced by activating a small number of Kv7 channels. Direct evidence for altered membrane resistance in response to hypoxia is lacking, but a decrease in resistance seems more likely (49). Although flupirtine could have produced its effects by activating residual Kv7.4 channels, activation of Kv7.5 channels or a heterologous combination of Kv7.4/7.5 is also possible. Flupirtine does not activate Kv7.1 channels (45), so although they are expressed in pulmonary artery, Kv7.1 channels could not mediate the drug’s effects. Blockade of Ca^{2+} channels could also contribute to the dilator action of flupirtine, because both flupirtine (at 20 M) and its structural analog retigabine have been reported to cause inhibition of Ca^{2+} channel currents in smooth muscle cells (31).

The ability of flupirtine to dilate vessels in hypoxic lungs suggests it may be able to reverse or counteract the depolarization caused by hypoxia, which promotes voltage-gated Ca^{2+} influx and vasoconstriction, as well as smooth muscle cell proliferation (42). The ability to restore the membrane potential to a normal level could have beneficial effects over and above those of calcium channel antagonists, because it would not only inhibit calcium influx but also restore the electrical driving force for a range of ions that cross the cell membrane. The beneficial effects of flupirtine found in this study mirror its effects in a mouse model of HPH (35). Along with the finding that flupirtine could reverse spontaneous PH in a further mouse model (35), these studies implicate Kv7 channels in the early development of HPH and suggest Kv7 activators should be explored further to determine their potential as a treatment for PH in patients.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Olga Hnilickova, Jana Durisova, and Pavlina Smolkova for skillful technical support and Ondrej Pech for helping us with experiments with 4-AP. The KCNQ4 cDNA construct used to validate the Kv7.4 antibody was kindly provided by Dr. Nikita Gamper, University of Leeds, UK. We thank Prof. Vaclav Hampl for review of final manuscript.

GRANTS

This work was supported by the Grant Agency of Czech Ministry of Health NT/13358, Czech Science Foundation 13-01710S (to J. Herget), and the British Heart Foundation (to A. M. Gurney).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

V.S., S.J., M.Z., J.H., and A.M.G. conception and design of research; V.S., S.J., Y.G., R.M., S.B., and J.N. performed experiments; V.S., S.J., Y.G., R.M., S.B., and J.N. analyzed data; V.S., S.J., Y.G., R.M., M.Z., S.B., J.N., J.H., and A.M.G. interpreted results of experiments; V.S. and S.B. prepared figures; V.S., S.J., M.Z., J.H., and A.M.G. drafted manuscript; V.S., M.Z., J.H., and A.M.G. edited and revised manuscript; V.S., J.H., and A.M.G. approved final version of manuscript.

REFERENCES

1. **Anderson UA, Carson C, Johnston L, Joshi S, Gurney AM, McCloskey KD.** Functional expression of KCNQ (Kv 7) channels in guinea pig bladder smooth muscle and their contribution to spontaneous activity. *Br J Pharmacol* 169: 1290–1304, 2013.
2. **Archer SL, Souil E, Dinh-Xuan AT, Schremmer B, Mercier JC, El Yaagoubi A, Nguyen-Huu L, Reeve HL, Hampl V.** Molecular identification of the role of voltage-gated K channels, Kv1.5 and Kv21, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. *J Clin Invest* 101: 2319–2330, 1998.
3. **Archer SL, Weir EK, Reeve HL, Michelakis E.** Molecular identification of O₂ sensors and O₂-sensitive potassium channels in the pulmonary circulation. *Adv Exp Med Biol* 475: 219–240, 2000.
4. **Clapp LH, Gurney AM.** ATP-sensitive K channels regulate resting potential of pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 262: H916–H920, 1992.
5. **Clapp LH, Gurney AM.** Modulation of calcium movements by nitroprusside in isolated vascular smooth muscle cells. *Pflügers Arch* 418: 462–470, 1991.
6. **Cox RH.** Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle. *Cell Biochem Biophys* 42: 167–195, 2005.
7. **Emery CJ, Bee D, Barer GR.** Mechanical properties and reactivity of vessels in isolated perfused lungs of chronically hypoxic rats. *Clin Sci (Lond)* 61: 569–580, 1981.
8. **Fike CD, Pfister SL, Slaughter JC, Kaplowitz MR, Zhang Y, Zeng H, Frye NR, Aschner JL.** Protein complex formation with heat shock protein 90 in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in newborn piglets. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H1190–H1204, 2010.
9. **Fishman AP.** Hypoxia on the pulmonary circulation. How and where it acts. *Circ Res* 38: 221–231, 1976.
10. **Gao Y, Yechikov S, Vazquez AE, Chen D, Nie L.** Distinct roles of molecular chaperones HSP90alpha and HSP90beta in the biogenesis of KCNQ4 channels. *PLoS One* 8: e57282, 2013.
11. **Gurney AM.** Multiple sites of oxygen sensing and their contributions to hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Respir Physiol Neurobiol* 132: 43–53, 2002.
12. **Gurney AM, Joshi S.** The role of twin pore domain and other K channels in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Novartis Found Symp* 272: 218–228, 2006.
13. **Gurney AM, Joshi S, Manoury B.** KCNQ potassium channels: new targets for pulmonary vasodilator drugs? *Adv Exp Med Biol* 661: 405–417, 2010.
14. **Hampl V, Herget J.** Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia. *Am Rev Respir Dis* 142: 619–624, 1990.
15. **Hasunuma K, Rodman DM, McMurtry IF.** Effects of K channel blockers on vascular tone in the perfused rat lung. *Am Rev Respir Dis* 144: 884–887, 1991.
16. **Herget J, Chovanec M.** Isolated perfused murine lung: a well characterized preparation for studying lung vascular function. *Drug Discov Today Dis Models* 7: 131–135, 2010.
17. **Herget J, Hampl V, Povysilova V, Slavik Z.** Long-term effects of prenatal indomethacin administration on the pulmonary circulation in rats. *Eur Respir J* 8: 209–215, 1995.
18. **Herget J, McMurtry IF.** Dexamethasone potentiates hypoxic vasoconstriction in salt solution-perfused rat lungs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 253: H574–H581, 1987.
19. **Hislop A, Reid L.** New findings in pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Br J Exp Pathol* 57: 542–554, 1976.
20. **Hodyc D, Johnson E, Skoumalova A, Tkaczyk J, Maxova H, Vizek M, Herget J.** Reactive oxygen species production in the early and later stage of chronic ventilatory hypoxia. *Physiol Res* 61: 145–151, 2012.
21. **Hong Z, Weir EK, Nelson DP, Olschewski A.** Subacute hypoxia decreases voltage-activated potassium channel expression and function in pulmonary artery myocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 337–343, 2004.
22. **Isaacson TC, Hampl V, Weir EK, Nelson DP, Archer SL.** Increased endothelium-derived NO in hypertensive pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol* 76: 933–940, 1994.

23. **Jepps TA, Chadha PS, Davis AJ, Harhun MI, Cockerill GW, Olesen SP, Hansen RS, Greenwood IA.** Downregulation of Kv7.4 channel activity in primary and secondary hypertension. *Circulation* 124: 602–611, 2011.
24. **Joshi S, Balan P, Gurney AM.** Pulmonary vasoconstrictor action of KCNQ potassium channel blockers. *Respir Res* 7: 31, 2006.
25. **Joshi S, Sedivy V, Hodyc D, Herget J, Gurney AM.** KCNQ modulators reveal a key role for KCNQ potassium channels in regulating the tone of rat pulmonary artery smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 329: 368–376, 2009.
26. **Klinger F, Geier P, Dorostkar MM, Chandaka GK, Yousuf A, Salzer I, Kubista H, Boehm S.** Concomitant facilitation of GABAA receptors and KV7 channels by the non-opioid analgesic flupirtine. *Br J Pharmacol* 166: 1631–1642, 2012.
27. **Lamas JA, Selyanko AA, Brown DA.** Effects of a cognition-enhancer, linopirdine (DuP 996), on M-type potassium currents [IK(M)] and some other voltage- and ligand-gated membrane currents in rat sympathetic neurons. *Eur J Neurosci* 9: 605–616, 1997.
28. **Lee CH, Poburko D, Kuo KH, Seow CY, van Breemen C.** Ca²⁺ oscillations, gradients, and homeostasis in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H1571–H1583, 2002.
29. **Madden JA, Dawson CA, Harder DR.** Hypoxia-induced activation in small isolated pulmonary arteries from the cat. *J Appl Physiol* 59: 113–118, 1985.
30. **Madden JA, Vadula MS, Kurup VP.** Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 263: L384–L393, 1992.
31. **Mani BK, O'Dowd J, Kumar L, Brueggemann LI, Ross M, Byron KL.** Vascular KCNQ (Kv7) potassium channels as common signaling intermediates and therapeutic targets in cerebral vasospasm. *J Cardiovasc Pharmacol* 61: 51–62, 2013.
32. **Mauban JR, Remillard CV, Yuan JX.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction: role of ion channels. *J Appl Physiol* 98: 415–420, 2005.
33. **McMurtry IF.** Angiotensin is not required for hypoxic constriction in salt solution-perfused rat lungs. *J Appl Physiol* 56: 375–380, 1984.
34. **Michelakis ED, Thebaud B, Weir EK, Archer SL.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox regulation of O₂-sensitive K channels by a mitochondrial O₂-sensor in resistance artery smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 37: 1119–1136, 2004.
35. **Morecroft I, Murray A, Nilsen M, Gurney AM, MacLean MR.** Treatment with the Kv7 potassium channel activator flupirtine is beneficial in two independent mouse models of pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol* 157: 1241–1249, 2009.
36. **Neacsu C, Babes A.** The M-channel blocker linopirdine is an agonist of the capsaicin receptor TRPV1. *J Pharm Sci* 114: 332–340, 2010.
37. **Oka M, Morris KG, McMurtry IF.** NIP-121 is more effective than nifedipine in acutely reversing chronic pulmonary hypertension. *J Appl Physiol (1985)* 75: 1075–1080, 1993.
38. **Olschewski A, Li Y, Tang B, Hanze J, Eul B, Bohle RM, Wilhelm J, Morty RE, Brau ME, Weir EK, Kwapiszewska G, Klepetko W, Seeger W, Olschewski H.** Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 98: 1072–1080, 2006.
39. **Osipenko ON, Evans AM, Gurney AM.** Regulation of the resting potential of rabbit pulmonary artery myocytes by a low threshold, O₂-sensing potassium current. *Br J Pharmacol* 120: 1461–1470, 1997.
40. **Peretz A, Degani N, Nachman R, Uziyel Y, Gibor G, Shabat D, Attali B.** Meclofenamic acid and diclofenac, novel templates of KCNQ2/Q3 potassium channel openers, depress cortical neuron activity and exhibit anticonvulsant properties. *Mol Pharmacol* 67: 1053–1066, 2005.
41. **Permutt S, Riley RL.** Hemodynamics of collapsible vessels with tone: the vascular waterfall. *J Appl Physiol* 18: 924–932, 1963.
42. **Platoshyn O, Golovina VA, Bailey CL, Limsuwan A, Krick S, Juhaszova M, Seiden JE, Rubin LJ, Yuan JX.** Sustained membrane depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1540–C1549, 2000.
43. **Post JM, Hume JR, Archer SL, Weir EK.** Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Cell Physiol* 262: C882–C890, 1992.
44. **Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, Miettinen OS, Reid L.** Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 236: H818–H827, 1979.
45. **Robbins J.** KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Ther* 90: 1–19, 2001.
46. **Robertson TP, Hague D, Aaronson PI, Ward JP.** Voltage-independent calcium entry in hypoxic pulmonary vasoconstriction of intrapulmonary arteries of the rat. *J Physiol* 525: 669–680, 2000.
47. **Smirnov SV, Robertson TP, Ward JP, Aaronson PI.** Chronic hypoxia is associated with reduced delayed rectifier K current in rat pulmonary artery muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 266: H365–H370, 1994.
48. **Soohee SL, Goldberg HS, Graham R, Jasper AC.** Zone 2 and zone 3 pulmonary blood flow. *J Appl Physiol* 62: 1982–1988, 1987.
49. **Suzuki H, Twarog BM.** Membrane properties of smooth muscle cells in pulmonary hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 242: H907–H915, 1982.
50. **Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JP.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev* 92: 367–520, 2012.
51. **Turner JL, Kozlowski RZ.** Relationship between membrane potential, delayed rectifier K currents and hypoxia in rat pulmonary arterial myocytes. *Exp Physiol* 82: 629–645, 1997.
52. **Wang HS, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, Dixon JE, McKinnon D.** KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282: 1890–1893, 1998.
53. **Wladyka CL, Kunze DL.** KCNQ/M-currents contribute to the resting membrane potential in rat visceral sensory neurons. *J Physiol* 575: 175–189, 2006.
54. **Yeung SY, Pucovsky V, Moffatt JD, Saldanha L, Schwake M, Ohya S, Greenwood IA.** Molecular expression and pharmacological identification of a role for K(v)7 channels in murine vascular reactivity. *Br J Pharmacol* 151: 758–770, 2007.
55. **Yuan JX, Aldinger AM, Juhaszova M, Wang J, Conte JV Jr, Gaine SP, Orens JB, Rubin LJ.** Dysfunctional voltage-gated K channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 98: 1400–1406, 1998.
56. **Yuan XJ, Goldman WF, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP.** Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 264: L116–L123, 1993.
57. **Zong F, Zuo XR, Wang Q, Zhang SJ, Xie WP, Wang H.** Iptakalim rescues human pulmonary artery endothelial cells from hypoxia-induced nitric oxide system dysfunction. *Exp Ther Med* 3: 535–539, 2012.