

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Václav Tichý

Sukcinát dehydrogenáza jako senzor hypoxie v plicní cirkulaci

Succinate dehydrogenase as a hypoxia sensor in pulmonary circulation

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Václav Hampl, DrSc.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne . . . 2020

Podpis

Poděkování

Především bych chtěl poděkovat vedoucímu práce prof. RNDr. Václavu Hamplovi, DrSc. za odborné podněty, trpělivost a pozitivní přístup během mých experimentů a psaní textu práce. Bez jeho energického přístupu by bylo mé úsilí o dost náročnější.

Dále děkuji RNDr. Barboře Kaftanové, Ph.D., která mi ochotně pomáhala se všemi aspekty praktické části práce.

Také bych chtěl poděkovat Mgr. Marcele Minaříkové a RNDr. Karlovi Chalupskému, Ph.D. za pomoc s metodami detekce kyslíkových radikálů.

Na závěr děkuji své partnerce Adéle Tiché, která se během vzniku práce stala mou manželkou, za pomoc se statistikou, a především za podporu od začátku do konce.

Abstrakt

Hypoxická plicní vasokonstrikce (HPV) je lokální fyziologický mechanismus plic pro optimalizaci oxygenace krve při alveolární hypoxii. Arterioly v postižené části plic zvýší průtokový odpor a tím se krev přesměruje do lépe ventilovaných segmentů. Při celkové hypoxii – například ve vysoké nadmořské výšce či při chronických plicních onemocněních – je tento mechanismus z principu neefektivní, jelikož se krev nemůže přesměrovat do jiné části. Tlak v plicní tepně je zvýšen, což časem vede k hypertrofii pravé srdeční komory a cor pulmonale.

Tento mechanismus je studován již desetiletí, konkrétní signalizační dráhy však stále nejsou plně popsány a nejsou k dispozici ani terapeutická řešení. Tato práce nabízí popis vybraných vlastností plicní cirkulace a patofyziologický kontext plicní hypertenze, uvádí do problematiky lokalizace a signalizace HPV, a rozebírá nejdůležitější kroky od poklesu dostupnosti kyslíku až ke konstrikci cév.

Praktická část se věnuje Sukcinát dehydrogenáze (SDH) – komplexu propojujícímu Krebsův cyklus s elektronovým transportním řetězcem – jakožto primárnímu místu detekce hypoxie v buňkách hladké svaloviny plicních tepen. Tuto hypotézu jsme se rozhodli testovat na izolovaných plicích potkana sledováním, zda malonát (inhibitor SDH) způsobí vasokonstrikci tak, jako hypoxie, a zda (případně) zvýšený plicní odpor už nebude dále reagovat na hypoxii. Nárůst tlaku jsem nepozoroval a hypotézu o možné roli SDH jako hypoxického senzoru při HPV jsem tedy konkluzivně vyvrátil.

Klíčová slova

Hypoxická plicní vasokonstrikce, sukcinát dehydrogenáza, hypoxie, kyslíkové radikály

Abstract

Hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) is a local physiological mechanism in lungs that optimises blood oxygenation during alveolar hypoxia. Arterioles in the affected region increase flow resistance which redirects blood to better ventilated parts of the lung. During global hypoxia – e.g. in high altitude or in chronic pulmonary illness – this mechanism doesn't work, as the blood cannot be redirected elsewhere. The pressure in pulmonary artery rises which leads to right heart hypertrophy and ultimately to cor pulmonale.

This mechanism has been studied for decades, but specific signalling pathways still lack full description and therapeutical solutions are not available. This thesis offers description of selected properties of pulmonary circulation and patophysiological context of pulmonary hypertension, introduces the reader to HPV localization and signalization, and discusses its most important steps from decreased oxygen availability to vessel constriction.

The practical part of this work explores Succinate dehydrogenase (SDH) – complex coupling Krebs's cycle to electron transport chain – as a primary detection site of hypoxia in pulmonary artery smooth muscle cells. We decided to test this hypothesis in isolated rat lungs by measuring if malonate (SDH inhibitor) causes vasoconstriction as hypoxia does. Also if (potentially) elevated pulmonary resistance won't further react to hypoxia. This elevation wasn't seen, so the hypothesis of SDH as a hypoxic sensor for HPV was conclusively disproved.

Keywords

Hypoxic pulmonary vasoconstriction, succinate dehydrogenase, hypoxia, reactive oxygen species

Obsah

| | |
|--|-----------|
| PROHLÁŠENÍ | 1 |
| PODĚKOVÁNÍ | 2 |
| ABSTRAKT | 3 |
| KLÍČOVÁ SLOVA..... | 3 |
| ABSTRACT | 4 |
| KEYWORDS..... | 4 |
| SEZNAM ZKRATEK | 7 |
| 1. ÚVOD | 8 |
| 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED | 10 |
| 2.1 PLICNÍ CÍRKULACE..... | 10 |
| 2.2 HPV..... | 10 |
| 2.2.1 Biologický význam..... | 11 |
| 2.3 Plicní hypertenze..... | 12 |
| 2.3.1 Remodelace..... | 14 |
| 2.4 MECHANISMUS HPV..... | 16 |
| 2.4.1 EFEKTOR HYPOXICKÉ PLICNÍ VASOKONSTRIKCE..... | 16 |
| 2.4.2 SENZOR HPV..... | 16 |
| 2.4.2.1 Rho-kináza..... | 20 |
| 2.4.2.2 Depolarizace a Kv kanály..... | 21 |
| 2.4.2.3 ROS..... | 21 |
| 2.4.2.4 Dvě teorie..... | 22 |
| 2.4.2.5 Vznik ROS..... | 23 |
| 2.4.2.6 Zdroj ROS..... | 24 |
| 2.4.2.7 Mitochondrie..... | 24 |
| 2.4.2.8 Transportní řetězec elektronů..... | 25 |
| 2.4.2.9 Sukcinát dehydrogenáza..... | 26 |
| 3. CÍLE: | 28 |
| 4. METODY A MATERIÁL | 29 |
| 4.1.1 OPERACE..... | 30 |
| 4.1.2 PROTOKOL..... | 32 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.1.3 | APARATURA..... | 33 |
| 4.1.4 | KALIBRACE, PROPLACHOVÁNÍ..... | 34 |
| 4.1.5 | ROS..... | 35 |
| 4.1.5.1 | <i>Statistika</i> | 36 |
| 4.2 | MATERIÁL..... | 36 |
| 5. | VÝSLEDKY..... | 39 |
| 5.1 | PH..... | 39 |
| 5.2 | ZMĚNA ODPORU PLICNÍHO ŘEČIŠTĚ MALONÁTEM..... | 39 |
| 5.3 | ZMĚNA REAKTIVITY PLICNÍHO ŘEČIŠTĚ MALONÁTEM..... | 40 |
| 5.4 | KREVNÍ PLYNY..... | 41 |
| 5.5 | ROS..... | 43 |
| 5.5.1 | <i>Elektronová paramagnetická resonance</i> | 43 |
| 5.5.2 | <i>Malonaldehyd</i> | 43 |
| 5.6 | MNOŽSTVÍ VÝSLEDKŮ..... | 44 |
| 6. | DISKUSE..... | 45 |
| 7. | ZÁVĚR..... | 48 |
| 8. | LITERATURA..... | 49 |

Seznam zkratek

- ATP – Adenosintrifosfát
- CAC – Citric Acid Cycle, citrus kyseliny citronové, Krebsův cyklus
- CaL – napěťově ovládané Ca kanály typu L
- CaSR – extracelulární receptor vápenatých iontů, extracellular Calcium-Sensing Receptor
- CHOPN – chronická obstrukční plicní nemoc
- EPR – elektronová paramagnetická resonance
- ETC – elektronový transportní řetězec (Electron Transport Chain)
- HIF – Hypoxia-inducible Factor
- HPLC – vysokovýkonná kapalinové chromatografie, High Performance Liquid Chromatography
- HPV – Hypoxická plicní vasokonstrikce
- HRE – hypoxia-responsive elements
- Kv – napěťově ovládané draslíkové kanály
- MDA – malonaldehyd
- miRNA – mikro RNA
- MLCK – kináza lehkého řetězce myosinu (myosin light chain kinase)
- MLCP – fosfatáza lehkého řetězce myosinu (myosin light chain phosphatase)
- NADPH – redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
- PAEC – buňky endotelu plicních arterií (Pulmonary Artery Endothelial Cell)
- PASMC – buňky hladkého svalu plicních arterií (Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell)
- PVR – odpor plicního cévního řečiště, Pulmonary Vascular Resistance
- ROCK – Rho-associated protein kinase
- ROS – kyslíkové radikály, Reactive Oxygen Species
- SDH – Sukcinát dehydrogenáza
- SDHA, B, C, D – podjednotka sukcinát dehydrogenázy A, B, C, D
- SOCE – Store-Operated Calcium Entry, kapacitativní vstup vápenatých iontů
- SOD – Superoxid dismutáza
- SR – sarkoplasmatické retikulum
- TRPC – Transient receptor potential channels
- VEGF – Vascular endothelial growth factor

1. Úvod

V plicní cirkulaci je krevní tlak výrazně nižší než v systémové cirkulaci. V plicích je životně důležité optimalizovat okysličování krve tak, aby zbytku těla poskytovala maximum kyslíku, obzvláště pokud je v části plic jeho koncentrace snížena. Svalové buňky malých plicních cév se v hypoxických podmínkách konstrihují, čímž se zvýší odpor plicního cévního řečiště.

Hypoxická plicní vasokonstrikce (HPV) je fyziologický jev účastnící se různých důležitých (protektivních i detrimetálních) procesů v průběhu života jedince – od prenatální regulace plicního oběhu po reakci na hypoxii, která může při dlouhodobém působení vést až k smrti. Je to mechanismus velmi konzervovaný – kromě většiny savců byl nalezen i u ptáků a obojživelníků (Faraci et al., 1984; Skovgaard et al., 2005) , což naznačuje dlouhodobý selekční tlak, díky kterému se tento jev v evoluci udržel. Zároveň je však velmi přítomný v životech mnoha lidí i dnes. Klinický význam HPV, který je dán především spoluúčastí na hypoxické plicní hypertenzi, motivuje dlouhodobé výzkumné úsilí, směřující k popsání tohoto mechanismu a k objevení možností jeho terapeutické modulace. Navzdory výzkumu, který trvá již několik desítek let, nelze signalizační kaskádu, která je hypoxií spuštěna, zatím kontrolovaně ovlivnit a možnosti léčby souvisejících onemocnění jsou značně omezené.

Podoba primárního senzoru hypoxie, který dává do pohybu zbytek hypoxické vasokonstrikční signalizace, není přesně známa. Této signalizace se účastní vápenaté ionty, depolarizace buňky, různé kanály a enzymy a také kyslíkové radikály.

Právě kyslíkové radikály mají v iniciaci HPV zřejmě zásadní význam. Proto je třeba hledat různé zdroje těchto radikálů v buňce a zkoumat jejich funkce. Nyní je obecně přijímanou teorií, že hlavním zdrojem (v hypoxické plicní vasokonstrikci) je mitochondrie (Waypa et al., 2001). Jako oxidačně-redukčně nejaktivnější součást buňky je atraktivním kandidátem pro detektor hypoxie. Obsahuje elektronový transportní řetězec (ETC), který je tradičně (a právem) vnímán především jako generátor gradientu vodíkových iontů, který pohání syntézu ATP. Tento gradient vytváří na vnitřní mitochondriální membráně pomocí produktů Krebsova cyklu. Toto propojení má však ještě jeden význam. Druhý komplex transportního řetězce (sukcinát dehydrogenáza), který funguje jako funkční spojení ETC s Krebsovým cyklem by mohl hrát důležitou roli v hypoxické produkci kyslíkových radikálů (Paddenberg et

al., 2003). V literatuře jsou v tomto kontextu většinou zmiňovány komplexy I a III, zatímco komplex II bývá spíše přehlížen.

Tato práce se věnuje sukcinát dehydrogenáze jakožto senzoru akutní hypoxie v plicní cirkulaci.¹

¹ Ve své bakalářské práci jsem se také zbyýval plicní hypoxií (dlouhodobou změnou exprese) a přestože je tato práce primárně zaměřena na jiné téma (rapidní vasokonstriční signalizace), část nutného kontextu (plicní cirkulace) je pro obě práce podobný. Pokoušel jsem se na fakta nahlížet z nového úhlu pohledu a propojovat je v jiném sledu, může se však stát, že se bude některý úsek prvních částí těchto mých prací podobat.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Plicní cirkulace

Plicní oběh se fyziologicky i mechanicky zásadně liší od oběhu systémového. Rozdíly jsou dány odlišnou funkcí. Zatímco systémové cévy vyměňují rozpuštěné plyny v krvi s buňkami přiléhajících tkání, v plicích jde o výměnu s vnějším prostředím, tedy vzduchem.

První rozdíl je spíše fyzikální. Stěny cév plicní cirkulace jsou velmi tenké, a proto zde existuje vždy riziko edému (průsakem vody do intersticia nebo dokonce do alveolárního prostoru). K tomu však běžně nedochází. Určité množství tekutiny odvádí lymfatická drenáž, především je však v malých plicních cévách tlak oproti systémové cirkulaci výrazně nižší. Toho je docíleno velkým množstvím krátkých cév (a tedy velkým celkovým průměrem řečiště) a vysokou poddajností jejich stěn (arterioly v plicích mají ve stěně svalovinu, ale velmi málo v porovnání se systémovými arterioly). Tato mikroskopická architektura minimalizuje odpor plicního cévního řečiště podle Hagen-Poiseuilleova zákona (který určuje odpor systému rozdílem tlaků na počátku a na konci). V případě plicních cév nižší délka L odpovídá nižšímu rozdílu tlaků Δp . Tento rozdíl je zásadní, neboť plícemi protéká celý srdeční výdej.

Druhým rozdílem je reaktivita cév v odpovědi na nedostatek kyslíku. Jelikož cévy v systémové cirkulaci kyslík dodávají, v případě hypoxie se musejí dilatovat, aby ho mohly do přiléhající tkáně poskytnout dostatek. V případě hypoxie v plicích však dilatace okysličení nepomůže a cévy se musí naopak stáhnout, aby nevystavovali ještě větší množství krve hypoxické části plic. Umožní tak lepší celkové okysličení krve putující zpět do srdce. Tento jev se nazývá hypoxická plicní vasokonstrikce (HPV) (Euler and Liljestrand, 1946).

2.2 HPV

V případě obstrukce malé části plic (vdechnuté zrnko prachu či větší předmět jako například úlomek ořechu) se v daném segmentu ocitnou všechny alveoly v částečné či úplné hypoxii. Krev se zde neokyslíčí, pokračuje dále vénami a míchá se před návratem do levé srdeční předsíně s krví okysličenou z jiných částí plic. To je známo jako tzv. žilní příměs. Pokud by byla postižená 1/5 jedné plíce (cca 1/10 celkové plicní tkáně), znamená to, že celý objem krve má v danou chvíli parciální tlak kyslíku pouze asi 90 % běžného stavu.

V místě hypoxie se ovšem hladká svalovina cévní stěny kontrahuje a sníží tak průsvit arteriol. Hemodynamický odpor je dán mimo jiné zejména průměrem cévy, tudíž se zvýší v celé postižené části cévní odpor. Jelikož plícemi prochází celý srdeční výdej, krev je přeměrována do zbylých částí plic, které jsou zvýšený průtok schopny pojmout (perfúzní a oxygenační kapacita plicní tkáně není za běžných podmínek zcela využita). V tuto chvíli (v teoretickém ideálním případě – ve skutečnosti se cévy nemohou uzavřít úplně) krev hypoxickou tkání neprotéká a všechna krev je okysličena (tj. nevzniká žilní příměs). Buňkám tkáně v hypoxii nehrozí zásadní nedostatek živin, jelikož zdrojem zde není jen plicní cirkulace, ale i bronchiální řečiště oddělující se z aorty; plicní parenchym má navíc velmi malou spotřebu.

Plíce jsou orgánem s extrémně členitou vnitřní strukturou. Plocha, na které probíhá výměna plynů, se v evoluci zvětšila na strukturní maximum objemu plic. Stovky milionů alveolů obepnuté vlásečnicemi, činí dohromady plochu desítek plošných metrů.

Jsou zde propojeny tři druhy dutých prostor, mezi nimiž je tenkostěnný styčný povrch. Tyto části – alveolární prostor, arterie a vény – se setkávají na svém nejtenčím konci u plicních sklípků. Zde je buněčné ohraničení těchto kompartmentů minimální a výměna plynů zde probíhá nejefektivněji. To úzce souvisí s místem působení HPV, které je podle většiny publikací v hladkém arteriálním svaly, a je tedy zřejmé, že i muskularizovaná část arterií je velmi dobře vystavená vzduchu v plicích, jelikož rychle reaguje na změny jeho složení (Conhaim and Staub, 1980).

Je žádoucí si plně uvědomit, že tato reaktivita je kompletně lokální a nepodléhá žádnému centrálnímu systému (na rozdíl od systémové cirkulace, z velké části řízené nervovým systémem), což je vhodné pro rychlost působení a přesnou regulaci místa odpovědi, má to však i svou stinnou stránku, v podobě komplikací plicních onemocnění.

2.2.1 Biologický význam

Jednou ze základních funkcí hypoxické plicní vasokonstrikce je zprostředkování zásadních fyziologických změn v plicích při přechodu jedince z intrauterinního prostředí do vnějšího vzdušného prostředí. Po dobu fetální fáze vývoje nemají plíce přístup k inspirovanému vzduchu a nemohou tak tedy naplňovat svoji pozdější funkci orgánu výměny

plynů. Tuto funkci do porodu zajišťuje placenta. Do té doby nejenom že není alveolární prostor plic zavzdušněn, ale dokonce i průtok v plicním oběhu je minimální. To je zapříčiněno dvěma důvody. Prvním je ten, že foramen ovale a ductus arteriosus – srdeční zkratky propojující pravé a levé srdce – jsou otevřeny (po porodu se pak poměrně velmi rychle uzavírají). Druhým důvodem je předmět našeho zájmu, tedy hypoxická plicní vasokonstrikce. Ta se (u jehňat) zintenzivňuje cca v poslední třetině vývinu in utero (Lewis et al., 1976). Jelikož se HPV řídí koncentrací kyslíku v alveolárním prostoru, je v prenatální době relativně aktivovaná v celém rozsahu plic a je tak maximalizován průtok mimo plicní cirkulaci (díky tomu, že – na rozdíl od postnatální situace – může výdej pravé komory z významné části kvůli vysokému odporu plicního cévního řečiště přetékat otevřenou arteriální dučejí do aorty). Při porodu je tekutina z plic rychle odstraněna (na základě hormonálního signálu) a plíce se tak během prvních nádechů úplně a nevratně zavzdušní (Brown et al., 1983). Tím se také uvolní vasokonstrikce a krev z pravé komory srdeční od této chvíle protéká primárně plícemi. Ductus arteriosus se (působením relativně vysokého PO_2) rychle kontrahuje a posléze obliteruje.

2.3 Plicní hypertenze

Klinicky nejvýznamnějším projevem HPV je však zvýšení odporu plicního cévního řečiště (Pulmonary Vascular Resistance, PVR) za vzniku hypoxické plicní hypertenze (HPH). Pacienti s plicní hypertenzí mají totiž velmi nepříznivou prognózu a typicky se dožívají jen několika málo let. Je to progresivní onemocnění postihující typicky celé plíce a jejím hlavním projevem je zvýšený tlak v plicní tepně. Plicní hypertenze tak přímo souvisí s hypoxickou plicní vasokonstrikcí.

Plicní hypertenze není jen jedno konkrétní onemocnění, ale spíše skupina onemocnění s různými (ne vždy jasně ohraničenými) etiologiemi. Světová zdravotnická organizace WHO klasifikuje 5 skupin, z nichž nás zajímá hlavně sekundární (skupina 3), do níž patří plicní hypertenze způsobená chronickou hypoxií nejčastěji jako komplikace jiných (výše zmíněných) plicních onemocnění (Simonneau et al., 2013).

Idiopatická plicní hypertenze je ta, u které není zřejmé, čím je způsobena. Je to tedy primární onemocnění. Do skupiny 1 také patří familiální podtyp, který je nejčastěji způsoben autozomálně dominantní mutací v genu *BMPT2* (v roce 2001 bylo v USA přes 100 rodin

s familiální plicní hypertenzí, z toho asi tři čtvrtě případů bylo způsobeno touto mutací; vzhledem k časté chybě v diagnostice je však počet rodin s familiálním podtypem nejspíše alespoň dvojnásobný (Thomas et al., 2001)). Do této skupiny spadají i další varianty plicní hypertenze genetického i negenetického původu. Riziko vzniku obvykle stoupá s věkem a je vyšší u žen než u mužů. Tyto choroby nejsou způsobeny hypoxií, nicméně v pokročilejší fázi je chronická hypoxémie jejich důsledkem, což vede k začarovanému kruhu, kdy takto vzniklá hypoxémie dále zhoršuje primární onemocnění.

Jsou různá onemocnění, která zhoršují přístupnost vnitřního povrchu plic ke vzduchu. Ať už je to plak vznikající při cystické fibróze nebo kolaps bronchiol při CHOPN (chronická obstrukční plicní nemoc), tyto zábrany způsobují, že je v plicním alveolárním prostoru a plicních cévách snižena koncentrace kyslíku. To aktivuje HPV, která zvyšuje odpor plic, a tak i nároky na tlak a práci pravé srdeční komory. Aby se se zvýšeným odporem srdeční sval vypořádal, při chronické hypoxii hypertrofuje. Během několika let většinou srdce selže a příčinou smrti takto nemocných se stane *Cor pulmonale* (Burrows et al., 1972). V současné době není principům a možné regulaci této patologie dostatečně dobře porozuměno a efektivní léčba (ať už farmakologická, chirurgická či jiná) není zatím k dispozici. Mírnění symptomů pomocí dlouhodobé kyslíkové terapie je možné, ale postupně méně a méně účinné, a podávání vasodilatantů (např. prostacyklin) není dostatečně efektivní (Archer et al., 1996). Dýchání je s časem namáhavější a tlak krve, směřující do plic, stoupá. To je způsobeno pozitivní zpětnovazebnou smyčkou, která se sníženou dostupností kyslíku v plicích snižuje jejich průsvit a poddajnost, a tím o to více brání efektivnímu dýchání. Část tohoto procesu je nevratná a maximalizace koncentrace kyslíku ve vdechovaném vzduchu bohužel na jeho zastavení nestačí (Neff and Petty, 1970). Právě tento klinický význam je hlavním podnětem pro podporu existujícího výzkumu procesů v této oblasti, přestože jejich důležitost a zajímavost nezahrnuje pouze patofyziologii plicní hypertenze. Perinatální změna plicního oběhu a optimalizace okysličování krve jsou dostatečným důvodem pro základní výzkum souvisejících plicních mechanismů.

2.3.1 Remodelace

Mechanismus patologie hypoxické plicní hypertenze má dvě hlavní složky. Tou první z nich je HPV, druhou je vnitřní remodelace plicních cév. Základním rozdílem této komponenty oproti HPV jsou změny v expresi buněk (tzv. phenotype-switch) a nevratnost těchto změn.

Na úrovni buněk se projevuje zvýšeným růstem, dělením a dediferenciací (Santos et al., 2002). Plicní cévy tak postupně ztrácejí svou pružnost a poddajnost, a i kontraktilita malých plicních cév má větší potenciál, jelikož se hladká svalovina v jejich stěnách rozšiřuje dále podél větvení až k těm nejtenčím arteriolám. Muskularizace cév na úrovních, které jsou u zdravého člověka bez hladké svaloviny, tak přispívá ke zvýšenému odporu plicního řečiště (Dingemans and Wagenvoort, 1978).

Tyto změny jsou podmíněny aktivací řady abnormálních signálních drah, která je primárně aktivována molekulou HIF (Hypoxia-inducible factor). HIF je signální molekula složená ze dvou podjednotek (nejčastěji Hif1- α a Hif1- β). Zatímco Hif1- β je stabilní, Hif1- α je v normoxii rapidně degradována na základě hydroxylace a následné ubiquitinace (za objev HIF a jeho významu byla roku 2019 udělena Nobelova cena za fyziologii nebo lékařství). V hypoxických podmínkách není HIF prolyl-hydroxyláza aktivní a Hif1- α se akumuluje a translokuje do jádra, kde vytváří komplex s druhou podjednotkou (Salceda and Caro, 1997). Ten se váže na tzv. HIF-Responsive Elements (HRE), které jsou přítomny v promotorech specifických genů, jejichž transkripci tím aktivuje (Forsythe et al., 1996). Mezi ně patří enzymy glykolýzy pro produkci ATP nezávisle na dostupnosti kyslíku, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor; faktor podporující angiogenezi) a další (Ouiddir et al., 1999; Pham et al., 2002).

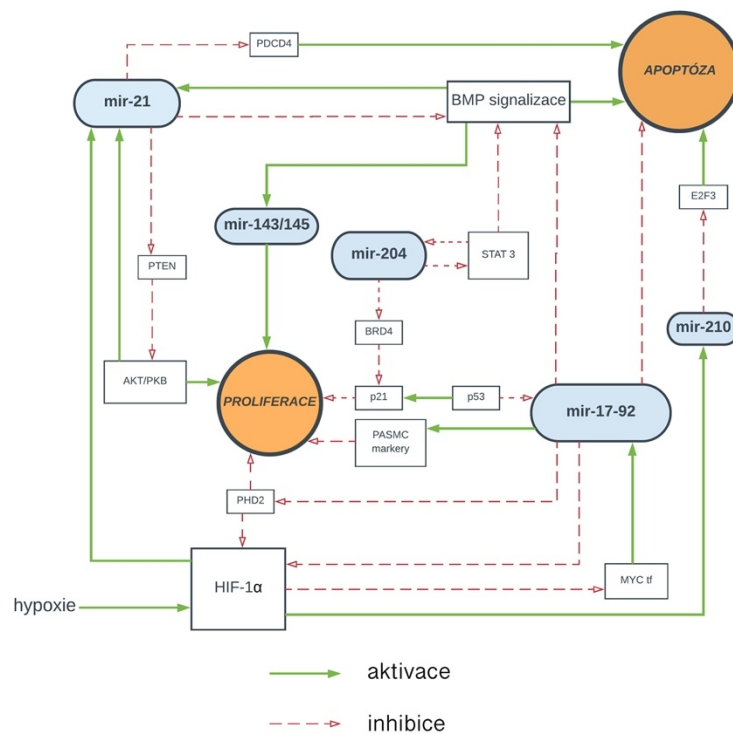
Za zmínku stojí podobnost těchto změn se změnou exprese v rakovinných buňkách. Vnější projevy obou patologií (hypertrofie, dediferenciacie buněk, odolnost proti apoptóze) jsou totiž alespoň částečně podmíněny stejnými signálními drahami (VEGF a další). Této podobnosti se věnuje několik článků, např. (Rai et al., 2008).

Tyto signalizace vytvářejí dohromady spletitou síť hypoxické odpovědi, zahrnující různé zpětnovazební smyčky a komplexní vztahy, které je velmi obtížné studovat. Velká část této změny exprese stále není známa a není tak možné pacienty s hypoxickou plicní hypertenzí

efektivně léčit. Proto je těmto drahám stále aktivně věnována pozornost a jsou předmětem vědeckého bádání.

Nedávno objevenou zajímavou kategorií signalizačních molekul, jsou mikroRNA (miRNA). Jsou to malé jednovláknové regulátory většiny buněčné exprese a mají v hypoxické signalizaci důležitou roli. Množství různých molekul miRNA je hluboce zapojeno do této signalizační sítě netriviálními způsoby. Mezi nejvýraznější patří miR-17-92, miR-24 a několik dalších – těm jsem se věnoval ve své bakalářské práci. Zjednodušený přehled pozice těchto miRNA v rámci hypoxické signalizační sítě je na Obr.1.

Zbytek této práce se věnuje molekulárním mechanismům HPV.



Obr. 1 – Část signalizační sítě vznikající v reakci na chronickou hypoxii a propojující Hypoxia Inducible Factor (HIF) s různými mikroRNA, které nepřímou podnětují proliferaci a blokují apoptózu – zjednodušené vizuální shrnutí mé bakalářské práce (dostupná na <https://is.cuni.cz/webapps/zpp/detail/186317/> v repozitáři závěrečných prací Univerzity Karlovy).

2.4 Mechanismus HPV

Přes trvající nejasnosti o konkrétní podobě molekulárního mechanismu HPV je jeho velká část známa a bylo napsáno mnoho prací o jednotlivých krocích této signalizace.

První otázkou je lokalizace jednotlivých součástí v rámci plicní cirkulace.

2.4.1 Efektor hypoxické plicní vasokonstrikce

Vzhledem k mechanickým vlastnostem kapilár plicní cirkulace by zvýšení odporu na venózní straně řečiště mohlo vést k edému či dokonce k poškození kapilár. Snížení průsvitu (tedy zároveň objemu krve) cév bylo v hypoxii pozorováno jen u arterií. Vény měly objem naopak o něco větší – tudíž nemohly být kontrahovány (Sackner et al., 1966). Aarseth a spol. dokonce vyzkoušeli perfundovat izolované plíce opačným směrem (perfuzát je pumpován do plicní žíly a přes kapiláry pokračuje k arteriím) a následně použili hypoxickou směs k ventilaci. Se zvyšujícím se tlakem pozorovali nárůst hmotnosti (plíce byly kontinuálně váženy), který byl způsoben průsakem tekutiny z cév do plic. Tím pravděpodobně demonstrovali, co by se stalo, kdyby byly za normálních okolností kontrahována žilní strana řečiště. Plíce perfundované normálním směrem tyto změny nevykazovaly (Aarseth et al., 1980). Menší část zodpovědnosti za HPV by mohly mít i intraacínární pericyty, které jsou také (alespoň z části) kontraktilní. Literatura na toto téma je však zatím omezená (Williams et al., 2003).

Z uvedených prací je zřejmé, že hlavní efektorový mechanismus je umístěn prekapilárně. Zde jsou nejdůležitější buňky hladké svaloviny (PASMC, Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells) v mediální části distálních arterií. PASMC jsou tedy považovány za hlavní funkční jednotku pro hypoxickou plicní vasokonstrikci.

O něco komplikovanější je hledání senzoru hypoxie.

2.4.2 Senzor HPV

Jako nejjednodušší možnost se nabízí hledat ho přímo v buňkách hladkého svalu plicních arterií. A existují pro to i experimentální důkazy. Již od roku 1946, kdy von Euler a Liljestrand poprvé popsali HPV na kočce (a také podali dodnes přijímanou teorii o její funkci), víme, že nervová signalizace zde nehraje roli, jelikož nebyla změněna denervací plic (Euler and Liljestrand, 1946). Dále byly vystaveny hypoxii řezy plicních arterií, a i u nich byla pozorována

vasokonstrikce. Dokonce i u izolovaných PASMČ byla v hypoxii zvýšena intracelulární hladina Ca^{2+} a následovala konstrikce (Murray et al., 1990). Z toho by se zdálo bezpečné usuzovat, že senzor bude nepochybně přímo v těchto buňkách.

Existují však studie naznačující roli jiných buněk – především buněk endotelu plicních arterií (Pulmonary Artery Endothelial Cell, PAEC). Kizub a spol. zjistili, že jsou pro udržení vasokonstrikce v hypoxické signalizaci důležité mezerové spoje (gap junctions), což naznačuje určitý význam pro komunikaci PAEC s PASMČ (Kizub et al., 2016). Další studie poukazují přímo na depolarizaci šířící se pomocí connexinu 40 (Wang et al., 2012).

Je možné, že endotel funguje jako doplňující senzor, který je důležitý pro HPV spíše v chronické hypoxii. Dalším argumentem pro hypotézu senzoru v PAEC je fakt, že v místě alveolů, ve kterých je hypoxie detekována, jsou už nejtenčí cévy, které většinou nejsou muskularizovány. PASMČ tedy v těchto nejexponovanějších místech často ani nejsou příliš přítomny. Nabízí se tedy vysvětlení zahrnující O_2 senzor v buňkách endotelu a vedení signálu proti směru proudu krve k prvním kontraktálním buňkám. Tuto teorii rozpracovávají (a detailně rozebírají roli endotelu v HPV) Grimmer a Kuebler v přehledném článku z roku 2017 (Grimmer and Kuebler, 2017).

Vzhledem k nedovysvětlenému mechanismu a přesnému průběhu podle této teorie a vzhledem k převažujícímu množství experimentálních poznatků naznačujících hypoxickou plicní vasokonstrikci nezávislou na endotelu (Kizub et al., 2016), je obecně přijímána verze primárního senzoru přímo v efektorových buňkách, tedy PASMČ.

Přesto je však endotelu v HPV přisuzována důležitá role v modulaci síly a trvání HPV, jelikož odpověď na hypoxii v izolovaných cévách bez endotelu se liší od odpovědi pozorované v izolovaných plicích (Demiryurek et al., 1991; Liu et al., 2001). Mezi endotelové faktory modulující svalový tonus, které pravděpodobně tento rozdíl způsobují, patří především endothelin-1, thromboxan, NO a prostacyklin. Z toho první dva jsou vasokonstriktory a druhé dva podněcují vasodilataci (Kylhammar and Rådegran, 2017). Kromě fyziologického významu nám pomáhají při experimentech (často těch zde citovaných) na hypoxické plicní vasokonstrikci odhalit její mechanismy.

Pokud přijmeme předpoklad, že hlavní hypoxický signál neopustí buňku, můžeme dále sledovat jeho cestu.

Při HPV se stáhnou hlavně plicní arterie o průměru o něco menším než 300 μm (Harder et al., 1985), přestože určitá míra konstriktce se vyskytuje i u velmi malých ($<70\mu\text{m}$) nekompletně muskularizovaných cév (Hillier et al., 1997). Primární vasokonstriktční roli těchto distálních cév naznačuje i studie aktivit Ca^{2+} kanálů podél větvení plicní cirkulace, která zjistila jejich výrazně vyšší aktivitu v porovnání s proximálními (tedy většími) plicními arteriemi (Franco-Obregón and López-Barneo, 1996).

Vasokonstriktce je zmenšení průměru lumenu cévy stahem myocytů v tunica media. Kontraktilní molekuly aktinu a myosinu k sobě přitahují stěny těchto buněk. Je to umožněno aktivací kinázy lehkého řetězce myosinu (MLCK, myosin light chain kinase) navázáním komplexu kalmodulinu a vápenatých iontů. Ca^{2+} /calmodulin komplex aktivuje MLCK, která fosforyluje myosin a tím aktivuje jeho ATPázovou aktivitu a cyklus jeho dočasné vazby na aktin a následné konformační změny, který je podkladem kontrakce buňky posouváním se podél aktinu.

K tomu je nutné výrazné zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů v cytosolu buňky. Ta se opravdu v hypoxii v PASMC dynamicky zvětšuje (Salvaterra and Goldman, 1993). Je několik možných způsobů, jak se to může stát. Zdroj těchto iontů je předmětem živé diskuse a zatím není jednoznačné, jaký je nejdůležitější.

Velmi pravděpodobným zdrojem jsou napětově ovládané Ca^{2+} kanály typu L (CaL) na cytoplasmatické membráně. Jejich inhibicí (např. verapamilem) může být HPV téměř úplně potlačena. To naznačuje zásadní roli vstupu Ca^{2+} skrze tyto kanály z extracelulárního prostoru (McMurtry, 1985; McMurtry et al., 1976). V tom případě by byla pro modulaci HPV důležitá koncentrace Ca^{2+} v mezibuněčném prostoru, což by mohl být i faktor v heterogenitě hypoxické odpovědi. Důležitou roli tohoto Ca^{2+} zdroje pro aktivaci HPV naznačuje i studie extracelulárních receptorů vápníku (CaSR, extracellular Calcium-Sensing Receptor), které jsou zřejmě podstatné pro influx těchto iontů při HPV, jak bylo ukázáno na potkanech, izolovaných plicních arteriích i na izolovaných PASMC (Zhang et al., 2012).

Proti nepostradatelné roli mimobuněčných vápenatých iontů (a napětových Ca^{2+} kanálů) však hovoří experimenty potvrzující vasokonstriktci i při jejich absenci (Dipp et al., 2001; Liu et al., 2001; Morio and Mcmurtry, 2002).

Cytosolická koncentrace Ca^{2+} se tedy zvyšuje i bez přispění extracelulárních zásob. Vysvětlení nabízejí zásoby v buněčných kompartmentech, jejichž pravděpodobné účasti

v této signalizaci se věnuje řada studií už od konce minulého století (Salvatera and Goldman, 1993).

Tento potenciální zdroj Ca^{2+} mobilizuje selektivní Ca kanál membrány sarkoplasmatického retikula (SR) zvaný ryanodinový receptor. Li a spol. ukázali, že v myších PASMČ s deletovaným genem pro ryanodinový receptor 1 tento signál zcela chybí. Koncentrace Ca^{2+} v cytosolu po vystavení hypoxii zde totiž byla nezměněna (Li et al., 2009). A již o více než deset let dříve bylo ukázáno, že deplece Ca^{2+} zásob (těch citlivých na ryanodin, ale ne jiných) silně snížila hypoxickou odpověď plicních arterií (Jabr et al., 1997). K podobnému závěru (že přidání ryanodinu před hypoxickým podnětem blokuje následnou HPV) došly i další výzkumné skupiny, přestože tato blokáda není vždy úplná a její přesná podoba závisí alespoň do určité míry na experimentálních podmínkách (Liu et al., 2001; Morio and Mcmurtry, 2002).

Vylití Ca^{2+} iontů z SR je zároveň signálem pro další vstup těchto iontů do buňky. Je to druh pozitivní zpětné vazby, který aktivací jednoho duhu kanálů následně aktivuje další způsob. Tím je tzv. Store-Operated Calcium Entry (SOCE). Tento způsob je běžný u mnoha typů buněk a podle některých studií je u PASMČ nadprůměrně výrazný a provázaný s kontrakcí (Snetkov et al., 2003). To je podle autorů důkazem pro zásadní význam kontraktální signalizace nezávislé na napětí. Jednoznačný podíl SOCE na akutní hypoxické odpovědi přinesli Ng a spol., kteří pozorovali na psích PASMČ krátký nárůst koncentrace Ca^{2+} i v prostředí bez Ca^{2+} , ale výrazně větší nárůst při umožněném kapacitativním („voltage-independent“) vstupu (Ng et al., 2005). O rok později bylo zjištěno, že alespoň jedním ze zúčastněných kanálů je TRPC6 (Transient Receptor Potential Channel 6), jehož delece téměř eliminovala zvýšení Ca^{2+} koncentrace v hypoxii (Weissmann et al., 2006). To bylo však pozorováno jen na první krátké fázi HPV a postupné zesilování konstriktce v řádech desítek minut nebylo ovlivněno. Význam těchto kanálů byl později potvrzen a rozšířen o poznatek, že jsou TRPC6 v hypoxii translokovány k membráně, což podtrhuje jejich vztah k influxu extracelulárního Ca^{2+} (Keserü et al., 2008). Reakce na U46619 (funkční ekvivalent vasokonstriktčního faktoru tromboxanu) v těchto experimentech zůstala, týkaly se tedy specificky hypoxické plicní vasokonstriktce.

Jedna z hypotéz (částečně upozadující nejednoznačné výsledky hledání zásadního zdroje Ca^{2+}) říká, že nárůst koncentrace Ca^{2+} v cytosolu není pro kontrakci tak důležitý, jelikož není ani většinou příliš velký. A říká, že zásadní je senzitivace (zvýšení citlivosti) myofilament aktivací Rho kinázy. Argumentem pro tuto hypotézu je také postupné zesilování vasokonstrikce během desítek minut při vystavení hypoxii, během kterých je už koncentrace Ca^{2+} stabilní (Robertson et al., 1995). Tato senzitivace je pravděpodobně zprostředkována vasokonstrikčním faktorem, který je produkován endotelem (Gaine et al., 1998). Odstranění endotelu totiž způsobilo stejnou redukci HPV jako inhibice Rho kinázy (inhibitorem Y-27632) (Robertson et al., 2003, 2000). Tímto vasokonstrikčním faktorem však nejspíš není (jen) endothelin, jelikož inhibice jeho receptorů tato pozorování neovlivnila.

Další hypotézou je, že existuje více než jeden způsob SOCE vstupu (diskutováno ve (Ward and McMurtry, 2009), rozbor těchto zajímavých témat je bohužel mimo rozsah této práce).

2.4.2.1 Rho-kináza

Pro senzitivaci PASMČ na vápenaté ionty (i pro samotnou vasokonstrikci) je zásadní Rho-asociovaná kináza (ROCK). Po fosforylaci RhoA (G-protein aktivován GTP) se ROCK aktivuje a inhibuje fosfatázu myosinu (MLCP, Myosin Light Chain Phosphatase – uplatňuje se při uvolňování kontrakce), čímž se zvýší kontraktilita myofilament (Kimura et al., 1996). ROCK však není jediným modulačním faktorem aktivity MLCP. Hodnoty proteinu telokinu, který běžně podněcuje její aktivitu, byly v kočičích plicních arteriolách po vystavení hypoxii sníženy. To znamená, že inhibice MLCP je zčásti podpořena i skrze sníženou dostupnost telokinu. Navíc je podle stejné studie v těchto cévách role telokinu významnější než v jiných (Madden et al., 2008). To naznačuje další nezanedbatelný molekulární mechanismus modulující odpověď PASMČ na hypoxii.

Přestože není jednoznačné, které kanály jsou v Ca^{2+} influxu nejdůležitější a jak přesně probíhá, je to nepostradatelná část této signalizace. Je proto třeba věnovat pozornost upstreamovému signálu, který tento proces spouští.

Změna napětí buňky se zdá být nejčastěji zmiňovaným podnětem. Buňky hladkého svalu se totiž v akutní reakci na hypoxii depolarizují. Zajímavý je poznatek ze studie Archera a spol., že PASMČ v tenkých distálních arteriích jsou běžně (v normoxii) relativně hyperpolarizovány v porovnání s PASMČ velkými proximálními plicními arteriemi, které nemají

tendenci k depolarizaci v reakci na hypoxii (Archer et al., 2004). Běžné je snížení napětí PASMC oproti extracelulárnímu prostoru o několik desítek milivoltů z typického klidového stavu (cca -60mV), během kterého jsou zmíněné napěťově řízené kanály převážně zavřené.

2.4.2.2 Depolarizace a Kv kanály

Tato depolarizace vzniká deaktivací napěťově ovládaných K⁺ (Kv) kanálů, které v normoxii vyvažují rozdíl napětí na buněčné membráně možností draslíkových iontů opustit buňku na základě elektrochemického gradientu. V hypoxii jsou deaktivovány a v buňce se tak hromadí kladně nabitě ionty. Je známa molekulární identita několika kanálů významných v depolarizaci, jejichž aktivaci někteří vnímají jako první jednoznačný krok v mechanismu HPV. Jsou to kanály Kv1.5, Kv2.1 a Kv9.3. (Archer et al., 1998; Firth et al., 2011). Delece jejich genů však nezabránila HPV úplně. Je tedy možné, že Kv kanály nejsou jediným mechanismem depolarizace nebo že je tato signalizace nepřímá a jsou deaktivovány zvýšením koncentrace Ca²⁺ z jiného zdroje (např. nespecifickými iontovými kanály) a k depolarizaci pouze přispívají (Archer and Michelakis, 2002).

Je sice možné, že jsou tyto Kv kanály regulovány i vstupem Ca²⁺ nebo jinými podněty, ale převažují důkazy, že jsou deaktivovány změnou ROS (Reactive Oxygen Species), kterou vyvolává hypoxie (Sabharwal et al., 2013).

2.4.2.3 ROS

ROS jsou kyslíkové radikály. Označují se tak molekuly, které obsahují kyslík a zároveň mají alespoň jeden nepárový elektron. Tento nepárový elektron způsobuje, že je molekula velmi reaktivní. S tím také souvisí tradiční pohled na ROS, podle kterého mají v buňce zcela negativní, toxický vliv, proti kterému je třeba bojovat zvýšenou konzumací antioxidantů. Silnějšímu oxidativnímu stresu (např. v kontextu ischemie/reperfuze a jiných patofyziologií) je opravdu vhodné se vyhnout, ROS jsou však zároveň velmi užitečné. V nižších koncentracích totiž může změna jejich množství fungovat jako důležitý krok v některých signalizacích (např. regulaci transkripce) v mnoha typech buněk (Finkel, 2011; Pognonec et al., 1992). Jednou z nich je právě detekce hypoxie.

V hypoxii se totiž produkce ROS opravdu výrazně mění. A je možné, že právě to je signálem pro deaktivaci Kv kanálů nebo aktivaci Ca²⁺ kanálů (Waypa et al., 2002). Na tom se většina výzkumných laboratoří shodne.

2.4.2.4 Dvě teorie

Pravděpodobně největší záhadou nebo alespoň kontroverzní nejasností v mechanismech HPV je paradoxně to, jestli se produkce a množství těchto radikálů mění na jednu či na druhou stranu. Redoxní teorie, která byla poprvé navržena Archerem v roce 1989, tvrdí, že s hypoxií produkce ROS v PASMČ klesá (právě kvůli snížené dostupnosti kyslíku) a tento posun cytosolu k redukovanějšímu redoxnímu stavu indukuje změnu v regulačních podjednotkách Kv kanálů, které se tak deaktivují (Archer et al., 1989). V tomto kontextu byla nalezena i lokace na Kv kanálu, která v reakci na redukční prostředí kanál opravdu uzavírá (Rettig et al., 1994). To bylo původně ukázáno na buňkách nervového systému. Inhibice Kv kanálů (a následný influx Ca^{2+}) redukujícími molekulami (a naopak jejich aktivace oxidanty) byla však potvrzena i na myocytech plicních arterií (Reeve et al., 1995; Yuan et al., 1994).

Oponenti této teorie tvrdí, že se aktivita ROS signalizace v hypoxii naopak zvyšuje (i přes snížený pO_2) a že tento oxidovanější stav aktivuje Ca^{2+} kanály na SR, které spolu se SOCE depolarizují buňku. Kromě některých měření změn ROS, podporuje tuto druhou teorii také utlumený nárůst Ca^{2+} i HPV po přidání glutathion peroxidázy či katalázy (které snižují množství ROS) do namnožených PASMČ (Waypa et al., 2006).

Této teorii navíc nahrává další práce Waypy a spol. Ta ukázala, že právě přidání H_2O_2 do perfuzátu izolovaných plic při normoxii vyvolalo vasokonstrikci podobně jako hypoxie (Waypa et al., 2001). Nedávná studie to potvrzuje, a dokonce zaznamenává zvýšené hodnoty H_2O_2 v hypoxických PASMČ, což je v rozporu s výše zmíněným hypoxickým posunem k redukovanějšímu stavu podle redoxní teorie (Sommer et al., 2017). Toto stanovisko podporuje i výzkum izolovaných plic, ve kterém předběžná inhibice Kv kanálů neodstranila konstrikční reakci na hypoxii (Hasunuma et al., 1991).

Podle zastánců redoxní hypotézy nejsou Kv kanály na SR pro HPV zásadní a jsou spíše podpůrným mechanismem, který ale není prvním krokem k depolarizaci.

Existuje tedy mnoho důkazů pro původní tzv. redoxní teorii i její opak (umně shrnuto ve (Waypa and Schumacker, 2005)). Neshoda mezi různými předními skupinami trvá již třicet let a ani technologický pokrok od té doby neumožnil tento problém vyřešit. Jedním z hlavních důvodů různých výsledků měření produkce ROS a jejich interpretace je

nepochybně užívání různých detekčních práb. S postupem času se totiž metodika vyvíjela, a to výzkumníci na obou stranách často využívají pro podporu svých teorií. Kritizovaným nedostatkem původní redoxní teorie je, že luminol a lucigenin (používaný při formování původní hypotézy snížených ROS) měří pouze málo relevantní extracelulární změny ROS (neproniká totiž přes cytoplasmatickou membránu) (např. (Smith et al., 2019)). Toto snížení produkce bylo následně potvrzeno (také za použití chemiluminescence) i v řezech plicních arteriol zbavených endotelu (Michelakis et al., 2002). Následně byla použita FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) metoda, která naopak zaznamenala nárůst ROS (Guzy and Schumacker, 2006). Podobně také nepřímo zaznamenal nárůst ROS v cytosolu Waypa a spol., když měřili redoxní stav jednotlivých kompartmentů. Metodou roGFP zobrazovali aktivitu buněčných proteinů citlivých na změny redoxního stavu a zjistili, že v mitochondriální matrix je ROS méně, ale v cytosolu a v mezimembránovém prostoru mitochondrie byla oxidace zvýšena (Waypa et al., 2010).

Posledních několik let v literatuře převažuje teorie hypoxické nadprodukce kyslíkových radikálů. Budu ji proto brát jako základ pro další úvahy.

2.4.2.5 Vznik ROS

Kyslíkové radikály vznikají redukcí molekulárního kyslíku. Přenesením elektronu na O_2 vznikne superoxid $\cdot O_2^-$, který je prekurzorem pro ostatní typy ROS. V klidovém stavu je rapidně dismutován, čímž vzniká relativně méně reaktivní peroxid vodíku H_2O_2 . To je proces, který v buňce běžně probíhá za pomoci antioxidačního enzymu dismutázy superoxidu (SOD). Pokud je aktivita SOD zastavena, $\cdot O_2^-$ se akumuluje (případně vede ke vzniku jiných ROS) a vzniká tak oxidativní stres a možné poškození buněčné struktury (Symons, 1987). Superoxid dismutáza má tři typy; SOD1, SOD2 a SOD3. SOD3 je umístěna extracelulárně a jelikož má mechanismus HPV s největší pravděpodobností senzor i efektor v rámci jedné buňky, mají pro nás význam hlavně první dva. SOD1 je typicky v cytosolu, zatímco SOD2 je mitochondriální. Nadexprese SOD1 neměla vliv na změny v ROS signalizaci indukované hypoxií, což znamená, že dismutace superoxidu na H_2O_2 v cytosolu už není příliš důležitá. SOD2 však výrazně podpořila hypoxický nárůst koncentrace Ca^{2+} , což podle autorů ukazuje na důležitost vzniku superoxidu a na jeho další přeměnu v H_2O_2 v matrix (Waypa et al., 2006). H_2O_2 je však ve větších koncentracích pro buňku také nebezpečný, jeho hladina je

proto regulována za pomoci katalázy, která ho rozkládá na vodu a molekulární kyslík. Kde však ROS vznikají?

2.4.2.6 Zdroj ROS

Potenciálním zdrojem jsou NADPH oxidázy. Jsou to membránové komplexy, které v normoxii produkují superoxid a jsou tedy atraktivním hráčem v redoxní signalizaci. Hypoxie by tak mohla sníženou dostupností kyslíku minimalizovat produkci superoxidu (Mohazzab et al., 1995). To by podporovalo původní redoxní teorii, která dokonce navrhovala NADPH oxidázu jako možný (normoxický) zdroj ROS. Částečně byla tato logika vyvrácena pozorováním nezměněné hypoxické reakce u myši s deletovanou podjednotkou gp91 NADPH oxidázy (Archer et al., 1999), bez které by neměla hypoxie vyvolat tyto změny, není to však finální důkaz proti její funkci (teoreticky by mohla být nahrazena svými homology) (Lassègue et al., 2001).

2.4.2.7 Mitochondrie

Dále byla jako možný zdroj změn navržena mitochondrie.

Mitochondrie jsou největším producentem kyslíkových radikálů v buňce. Navíc jsou přirozeným kandidátem na pO_2 senzor, protože jsou v buňce hlavním „konzumentem“ kyslíku. Skrze podobnou logiku by se také dalo nahlížet na ATP (jeho nedostatek) jako hypoxický signál. Mitochondrie potřebuje k produkci ATP kyslík, v hypoxii by tedy měla být koncentrace ATP nižší. Další molekuly by mohly tento pokles zaznamenat a předat dále. Původně byla tomuto nápadu i věnována pozornost (Rounds and McMurtry, 1981), deplece ATP však sama o sobě součástí akutní hypoxické signalizace být nejspíše nemůže, jelikož neprobíhá okamžitě a vasokonstrikce nastává výrazně dříve, než se hodnoty ATP stihnou změnit. Dále HPV odpovídá i na mírnou hypoxii, která koncentraci ATP nesníží (Buescher et al., 1991). Vracíme se tedy k teoriím podporujícím ROS-závislou hypoxickou signalizaci.

Zajímavý úhel pohledu na roli mitochondrií v HPV nabídla nedávná studie od Zhou a spol., ve které byly transplantovány mitochondrie mezi systémovými a plicními arteriemi. PSMC, které byly zbaveny mitochondrií, nereagovaly na hypoxii, ale po implantaci mitochondrie z jiné PSMC se reaktivita vrátila (měřeno na koncentraci Ca^{2+}). Dále byly do PSMC bez mitochondrií přeneseny mitochondrie ze hladkého svalu systémové (stehenní)

tepny, což mělo za výsledek naopak pokles Ca^{2+} (nebo nezměněnou hladinu) v reakci na hypoxii. Z toho vyplývá, že zásadní rozdíly mezi plicní a systémovou odpovědí arterií na hypoxii (zmíněné v sekci plicní cirkulace) jsou dány heterogenitou mitochondrií (Zhou et al., 2016).

2.4.2.8 Transportní řetězec elektronů

To, co je pro nás v mitochondriích nejzajímavější, je samozřejmě elektronový transportní řetězec (ETC; Electron Transport Chain). ETC je kaskáda funkčně propojených transmembránových proteinových komplexů a dalších molekul, které spolu s ATP syntázou zajišťují oxidativní fosforylaci v buňce. Nachází se na vnitřní mitochondriální membráně, na které vytváří gradient vodíkových iontů.

ETC je propojen s cyklem kyseliny citronové (CAC, Citric Acid Cycle; také Krebsův cyklus), který probíhá v mitochondriální matrix. CAC zde zpracovává produkty glykolýzy a během toho produkuje mimo jiné i NADH (redukováný Nikotinamidadeninindinukleotid), molekuly, které nesou vysokoenergetické elektrony. Tyto molekuly jsou oxidovány a jejich elektrony po předání cestují skrze ETC, který postupně v několika krocích využívá jejich energii (a tudíž snižuje jejich negativní redoxní potenciál). K tomu je zapotřebí kyslík, protože ten je finálním akceptorem elektronů, jejichž energie byla právě využita. Tímto finálním převedením (za účasti vodíkových iontů) zároveň vzniká voda. Energie těchto elektronů je využívána některými jeho komplexy ETC k aktivnímu pumpování vodíkových iontů (H^+) do mezimembránového prostoru proti elektrochemickému spádu (v matrix je tedy relativně vysoké pH). Vzniklý „přetlak“ H^+ iontů využívá ATP syntáza, která propouští H^+ zpět do matrix. Jejich energii používá k mechanické fúzi ADP a fosfátu na ATP. Při nedostatku O_2 se tedy celý tento proces zpomaluje (Mitchell, 1961; Palacios-Callender et al., 2004). ETC je asi nejvíce znám pro svou produkci ATP, má však další důležitou signalizační funkci. Tou je právě produkce kyslíkových radikálů (zásadní pro HPV). Dříve byla vnímána jen jako toxický vedlejší produkt oxidativní fosforylace, ale jak jsme si ukázali, může v důsledku zásadně podpořit naše zdraví optimalizací okysličení krve.

Že ETC produkuje ROS je již dlouho známý fakt (Loschen et al., 1971). Vznikají nedokonalým předáváním elektronů mezi jeho komplexy (tzv. leakage), když je kyslík

neúplně redukován. Tak vzniká superoxid. Děje se tak i za klidových podmínek, avšak výrazně je tato produkce zvýšena při hypoxii či jiném stresu.

Transportní řetězec je složen ze čtyř hlavních komplexů, které fungují jako kaskáda pro elektrony (ATP syntázu do něj nepočítáme, jelikož se tohoto transportu neúčastní). Komplex I přijímá dva elektrony od transportní molekuly NADH a podává je membránové molekule ubichinon, která slouží jako mezikrok mezi prvním a třetím komplexem. Ubichinon je tím redukován na ubichinol (proto název komplexu I – NADH ubichinon oxidoreduktáza). Zároveň s tím komplex I přesouvá vodíkové ionty do mezimembránového prostoru mitochondrie. Ubichinol (volně pohyblivý v membráně) je oxidován komplexem III, který z něj přesune dva elektrony na další nosič, cytochrom C (rozpuštěný v mezimembránovém prostoru mitochondrie; na každý elektron je zapotřebí jedna molekula cytochromu C). Během toho jsou pomocí komplexu III další ionty H⁺ pumpovány z matrix přes membránu. Ze čtyř molekul cytochromu C odebere komplex IV (cytochrom c oxidáza) z každé jeden elektron, které nakonec reagují s molekulárním kyslíkem za vzniku vody. Během toho jsou pumpovány další H⁺ ionty ven z matrix. Alternativní cestou je vstup elektronů přes komplex II (sukcinát dehydrogenáza). Ten, podobně jako komplex I, předává elektrony na ubichinon a potom pokračují stejným způsobem (Alberts et al., 2014).

Někde v tomto procesu vznikají kyslíkové radikály, které mají nejspíš na svědomí veškerou zmíněnou signalizaci. Existuje mnoho studií, které se touto produkcí zabývají, shoda mezi všemi výzkumnými pracovišti je však stále daleko.

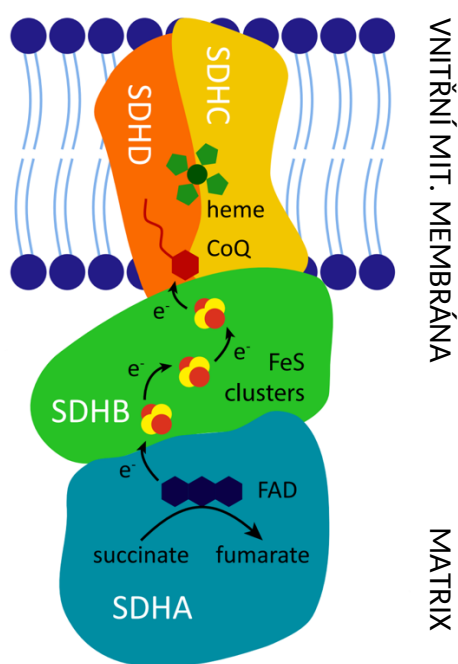
2.4.2.9 Sukcinát dehydrogenáza

Sukcinát dehydrogenáza (SDH, komplex II) je jedním z komplexů na vnitřní mitochondriální membráně účastnících se transportu elektronů, a tak i buněčné respirace. Má však v mnoha ohledech specifické postavení. Je to cca 140 kDa velký komplex, složený ze čtyř podjednotek: Sukcinát dehydrogenáza A (SDHA), SDHB, SDHC a SDHD. Všechny tyto podjednotky jsou kódovány v genomu jádra (přestože existují eukaryotní organismy, ve kterých tomu tak není) (Burger et al., 1996). To je první unikátní vlastnost SDH mezi ostatními komplexy ETC, které jsou každý alespoň z části kódovány mitochondriálně. Zároveň je z těchto komplexů tím nejmenším (Whitehouse and Moore, 2013).

SDH zároveň elegantně propojuje ETC a CAC (Krebsův cyklus). Katalyzuje dehydrogenaci sukcinátu – meziprojektu tohoto cyklu (což mu dává název sukcinát dehydrogenáza).

Podjednotky SDHA a SDHB jsou v mitochondriální matrix, zatímco SDHC a SDHD slouží jako kotva v lipidové membráně. Na SDHA, což je největší podjednotka, probíhá odejmutí elektronů ze sukcinátu. Je zde navázený FAD (flavinadenindinukleotid) a jeho redukovaná forma FADH₂ přenáší elektrony dále na podjednotku SDHB. Ta obsahuje tři Fe-S klastry, které sousedí s vazebným místem pro ubichinon (v tomto místě se s SDHB setkávají SDHC a SDHD), který se zde redukuje (Sun et al., 2005).

Sdh je zároveň jediným komplexem, který nefunguje jako pumpa pro vodíkové ionty. Redukuje však ubichinon na ubichinol, což pohání zbytek řetězce a pomáhá tak vytvářet gradient H⁺ nepřímo.



Obr. 2 Schéma cesty vysokoenergetických elektronů v komplexu Sukcinát dehydrogenázy. Od oxidace sukcinátu na SDHA vede přes FeS klastry v SDHB do vazebného místa pro ubichinon u podjednotek SDHC a SDHD. Převzato z (Hadrava Vanova et al., 2020).

S těmito informacemi se jako nejpřijatelnější vysvětlení signalizace HPV jeví hypotéza, která říká, že hlavní cestou k vasokonstrikci je aktivace Ca²⁺ kanálů typu L depolarizací buňky, která je následkem inhibice napěťově řízených K⁺ kanálů. A tato inhibice je způsobena

zvýšením nebo snížením produkce superoxidu (dále přeměněného na H_2O_2), které nastává po deaktivaci funkce ETC nedostatkem O_2 .

V kontextu hypoxické plicní vazokonstrikce bylo navrženo mnoho signalizačních drah účinných, permisivních i modulačních. Mezi jednotlivými pracovišti však chybí shoda o významu těchto drah i o detailech jejich mechanismů. Je frustrující, že tento výzkum trvá již přes 70 let a už před dvaceti (i více) lety, v období, kdy začaly rychle přibývat nové technologie a pokusné metody, se dalo očekávat, že kompletní řešení muselo být již blízko. Nebylo.

3. CÍLE:

Cílem této práce bylo potvrdit či vyvrátit zásadní roli sukcinát dehydrogenázy (resp. její inhibice) v iniciační fázi hypoxické plicní hypertenze. Tu by mohla SDH zprostředkovávat jako primární senzor snížené dostupnosti kyslíku. V případě (alespoň částečného) potvrzení vasokonstrikce inhibitorem je proto zásadní zjistit, zda se její inhibicí aktivuje stejný mechanismus jako nedostatkem O_2 . V případě, že se důležitost tohoto komplexu v reakci na hypoxii nepotvrdí, můžeme hypotézu primárního senzoru vyloučit. V té situaci by bylo vhodné změřit její vliv na produkci kyslíkových radikálů, což by mohlo osvětlit alespoň její modulační roli.

4. METODY a MATERIÁL

Pokusy byly prováděny ve Fyziologickém ústavu II. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

Jedna ze standardních metod, která se využívá při studiu hypoxické plicní vasokonstrikce jsou tzv. izolované plíce. Je to operační metoda, která spočívá v extrakci plic z pokusného zvířete a stabilizace jejich funkce v podmínkách napodobujících jejich přirozené prostředí. Dovoluje nám tyto podmínky kontrolovaně měnit (např. rychlost průtoku, složení perfuzního roztoku, teplotu) a měřit reakce plicního cévního řečiště na různé podněty. Popis McMurtryho z roku 1974 je bez výrazných změn používán dodnes (McMurtry et al., 1976). To byla i primární metoda mých experimentů.

Všechny pokusy byly prováděny na potkanech kmene Wistar, SPF chov (Specified Pathogen Free). Vždy šlo o samce ve věku cca 5 až 6 měsíců. Hmotnost potkanů byla většinou mezi 400 a 500 gramy (viz Tabulku 1). Chovatelské + dodavatelské zařízení – Velaz s.r.o.

K celkové anestezii byla použita kombinace ketaminu a xylazinu.

Ketamin byl koupen pod názvem Calypsol (viz sekci materiály) a byl podáván intraperitoneálně. Množství bylo stanoveno podle hmotnosti potkana (viz sekci materiály). U větších potkanů však tato dávka většinou nestačí, jelikož větší množství tuku její část absorbuje. Proto byla po aplikaci vždy po několika minutách kontrolována citlivost na bolest a pokud byl potkan stále bdělý, byla přidána cca $\frac{1}{4}$ původní dávky. Toto se opakovalo, dokud potkan nepřestal reagovat na bolestivý podnět.

Xylazin byl koupen pod názvem Xylapan a byl aplikován intramuskulárně. Dávka byla stanovena podle hmotnosti a nebyla navyšována.

4.1.1 Operace

Po přípravě aparatury (viz dále) byl potkan zvážen a podle hmotnosti mu byla podána anestezie. Po ztrátě vědomí a imobilizaci byla rozříznuta kůže na krku. Následovalo roztáhnutí svalstva a nastřížení trachey. V tomto místě byl zároveň připraven podvaz. Vzniklým otvorem byla směrem k plicím zasunuta kovová kanyla a podvaz byl utěsněn, takže zvíře dýchalo pouze skrze kanylu.

Nůžkami byla otevřena dutina břišní a stříh pokračoval směrem k hrudníku. Po narušení bránice byla k tracheální kanyle ihned připojena respirační pumpa, která byla zapnuta s

frekvencí 65 vdechů za minutu. V tuto chvíli pumpa využívala vzduch z místnosti. Bránice byla zcela přestřižena a následně i hrudní kost (kůže byla nastřižena až k otvoru na krku). Tím byly exponovány plíce a srdce, do kterého bylo v tu chvíli injekčně podáno 100 μ l heparinu, aby operaci nebránila srážející se krev. Stěny hrudníku byly roztaženy sponami (Obr. 3 a).

Byl odstraněn brzlík a ventrální část pleury. Další podvaz byl připraven kolem plicní tepny a aorty. Bylo opatrně nastřiženo srdce v místě pravé komory a tímto vstupem byla zavedena kanyla do plicní tepny. Před utěsněním tohoto spoje byl vytříhnut další vstup do srdce (do levé komory) v místě srdečního apexu. Zde byla zavedena plastová odvodní kanyla a kolem ní připraven podvaz.

V tuto chvíli proběhla zkouška průchodnosti a těsnění. Na kanylu v levé komoře byla (po odkapání několika kapek, aby bylo jisté, že se do plicního oběhu nedosane vzduch), připojena perfuzní pumpa. Rychlost průtoku po zapnutí byla minimální (cca 2-6 ml/min) a pokud z odvodní kanyly začala po několika sekundách vytékat krev a následně perfuzát, byla perfuzní pumpa krátce zastavena a podvazy utěsněny (s perfuzním přívodem již ponechaným v plicní tepně). Následně byla trachea nad intubační kanylou plně odstřižena a od tohoto místa byly plíce opatrně oddělovány a zcela vyjmuty z těla potkana.

Během celé operace je třeba postupovat co nejrychleji. Čím déle trvá podvazování a kanylace, tím horší výkon plíce typicky podávají. Zároveň je však v tuto chvíli největší riziko chyby, která může vést i k úplnému ukončení pokusu, například kvůli porušení plic při přestřihávání jícnu (čehož jsem se nejednou dopustil), tudíž je dobré operaci často trénovat, aby mohla proběhnout rychle a bez chyb.

Plíce, které byly stále ventilovány a připojeny k perfuzní pumpě, byly zavěšeny do izolační komory. Zdroj respirační pumpy byl připojen na připravený vak s normoxickou směsí a byla zapnuta perfuzní pumpa (ta má – na rozdíl od vzduchu v místnosti – 5 % CO_2 . To je zde přidáno, aby pH nestouplo nad žádoucí hodnoty. Do této chvíle ho dodávalo tělo potkana.). Dále byl až dosud nulový end-expirační tlak zvýšen na 2 cm H_2O (ponořením výdechového ventilu) a krátkým utěsněním vodního ventilu byly plíce „dofouknuty“ na plnou velikost. Od té chvíle byla v průběhu cca 5 minut zvyšována průtoková rychlost až na maximální hodnotu, která byla vypočítána podle hmotnosti potkana (viz sekci Kalibrace, Proplachování). Také bylo spuštěno měření tlaku a podle záznamu v reálném čase byly upraveny úhly kanyl tak,

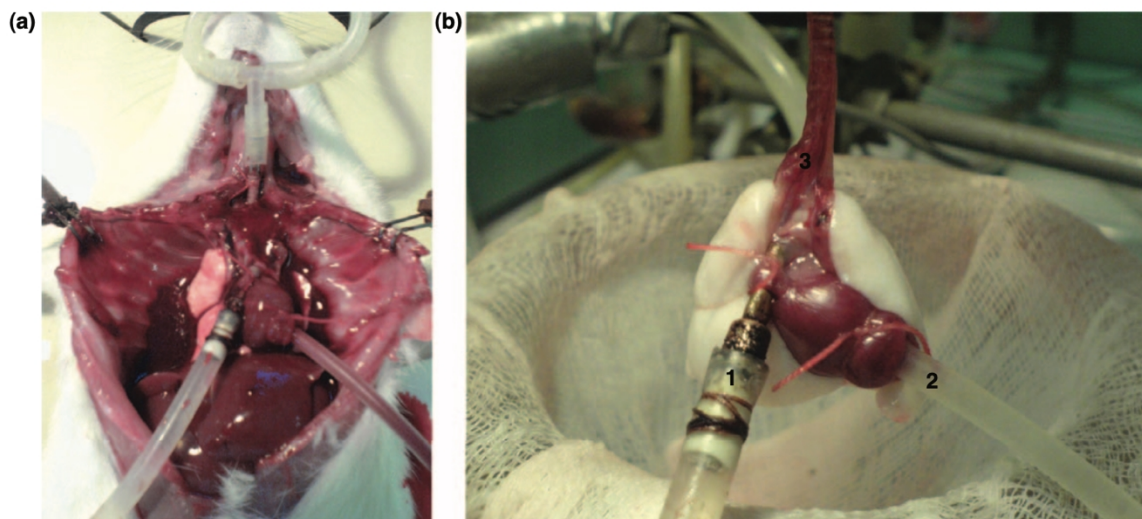
aby nevytvářely přílišný odpor. Přibližně v této chvíli (poté, co byl viditelně téměř bez erytrocytů) byl také uzavřen perfuzní okruh. Po této stabilizaci a dosažení maximální rychlosti perfuze (viz výše) byly plíce ponechány 10 minut bez zásahu.

V průběhu pokusu byly plíce průběžně zvlhčovány fyziologickým roztokem. Nádobka s perfuzátem i komora byly ohřívány vodní lázní na cca 37 °C, což bylo kontrolováno na teploměru v rezervoáru.

4.1.2 Protokol

Po ustálení tlaku a prodlevě byl do trubičky přívodu perfuzátu (těsně před vstupní kanylou) aplikován bolus 100 µl angiotenzinu pro kontrolu reaktivity řečiště. To vyvolalo přechodný nárůst tlaku. Po návratu na bazální hladinu byl zdroj ventilační pumpy přepojen na hypoxii (v zásobních pytlích byla anoxie, vzhledem k nedokonalému těsnění ale odpovídala výsledná koncentrace kyslíku spíše mírné hypoxii. Hodnoty rozpuštěných plynů byly i z tohoto důvodu průběžně kontrolovány na radiometru). Během 10-20 sekund plíce reagovaly růstem tlaku a po dosažení maxima (cca 5 minut) byla opět připojena normoxie. Opět se hodnoty vrátilily na základní hladinu a nedlouho potom se tato kombinace angiotenzinu a hypoxie opakovala ještě jednou (v jednom případě dvakrát - potkan č.6). Když se tímto stanovila reaktivita plic, bylo do rezervoáru přidáno 2 ml roztoku malonátu (v jednom případě 1 ml a v jednom případě 5 ml. Po krátké době byla ventilační pumpa opět přepojena na hypoxii. Po maximálním nárůstu byla přepojena zpět na normoxii a po krátké době byl pokus ukončen. Během celého pokusu je nutné dávat pozor, aby se trubičkou do přívodní kanyly nedostaly žádné bublinky, jinak vzniká plicní embolie.

Během každého pokusu byl několikrát odebrán vzoreček perfuzátu na analýzu krevních plynů. Vzorek byl odebrán přímo z odvodní kanyly injekční stříkačkou a ihned vložen do Radiometru, aby se minimalizovalo rozpouštění plynů mimo perfuzní oběh. To nám umožnilo kontrolovat hodnoty hypoxie a pH téměř v reálném čase (zpoždění cca 1 minuta).



Obr. 3 – a) Plicní cirkulace je již připojena na oba oběhy – tracheou k respirační pumpě a srdcem k perfuznímu oběhu. B) plíce jsou zavěšeny v izolační komůrce. 1-přívodní kanyla v plicnici, 2-odvod perfuzátu vedoucí do rezervoáru. Převzato z (Herget and Chovanec, 2010)

4.1.3 Aparatura

Během pokusů byly plíce zavěšeny v izolační komoře a připojeny na perfuzní a ventilační okruh.

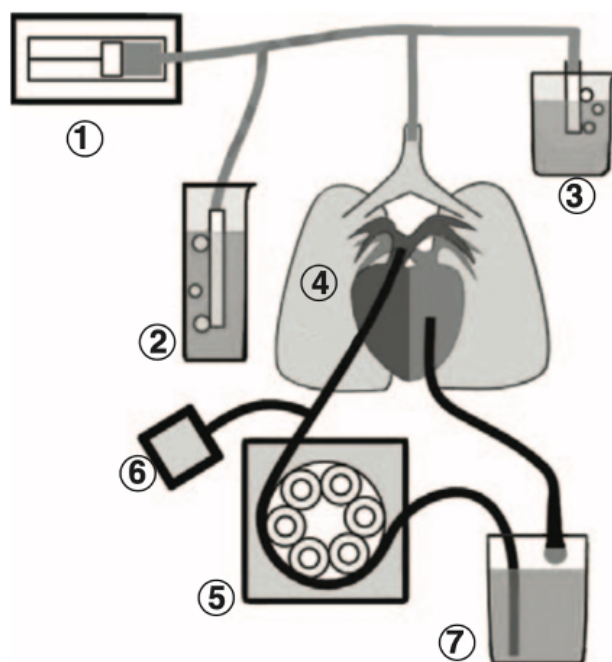
Komora je kádinka s dutými stěnami naplněnými průběžně ohřívanou vodou. Je vystlána gázou a přiklopena plastovým krytem, jehož otvory pro hadičky a zavěšení jsou z větší části zakryty buničinou. Gáza, buničina i samotné plíce jsou během pokusu vlhčeny fyziologickým roztokem.

Perfuzní okruh plíce perfunduje konstantním proudem ve fyziologické teplotě. Je sestaven z perfuzní pumpy a rezervoáru, ze kterého perfuzní pumpa čerpá perfuzát. Hadička vedoucí z pumpy má rozdvójku – jedna cesta má na slepém konci snímač tlaku a druhá vede do plic. Okruh je ze začátku stabilizace otevřen a z plic perfuzát vytéká do odpadní kádinky, aby se z plic vyláchl většina krve. Po stabilizaci se okruh uzavře a ze srdce vytéká perfuzát zpět do rezervoáru, aby se jím neplývalo.

Ventilační (respirační) systém zahrnuje pumpu a dvě kádinky s vodou – jeden vodní ventil limituje maximální tlak při nádechu (na 10 cm H₂O a druhý udržuje pozitivní tlak na konci výdechu (PEEP, positive end-expiratory pressure) na hodnotě +2 cm H₂O (viz Obr. 4).

Perfuzát je komplexní roztok napodobující vlastnosti krve:

Základ perfuzátu, iontový roztok (pro složení viz sekci Materiál), byl namíchan do zásoby a uchovávan v 5°C. V den pokusu byl smíchan s albuminem na magnetické míchačce. Rozmíchávání vždy probíhalo alespoň 20 minut. Do roztoku byl následně přidán roztok meklofenamátu a L-NAME. Oba se dávkují v 200 μ l připraveného roztoku na 100 ml perfuzátu. Vznikne 17 μ M roztok meklofenamátu a 50 μ M roztok L-NAME. Poté byl perfuzát ještě několik minut promícháván.



Obr. 4 -Schéma aparatury k izolovaným plicím: 1-respirační pumpa, 2-vdechový vodní ventil, 3-PEEP (výdechový ventil), 4-zavěšené plíce, 5-perfuzní (peristaltická) pumpa, 6-snímač tlaku, 7-rezervoár. Upraveno podle (Herget and Chovanec, 2010).

4.1.4 Kalibrace, Proplachování

Senzor tlaku byl v programu LabChart kalibrován vždy těsně před pokusem pomocí vodního sloupce na 0 a 50 cm.

Po sestavení byla aparatura několik minut proplachována fyziologickým roztokem a po jeho vypuštění napuštěna perfuzátem. Objem celé soustavy byl stanoven na necelých 43 ml. Podle toho byla počítána dávka malonátu tak, aby měl vždy stejnou koncentraci.

Dále byla vypočítána ideální průtoková rychlost podle hmotnosti potkana vzorcem: $4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Reálná hodnota průtoku byla zkontrolována vždy těsně před pokusem (s odměrným válcem a stopkami) a přesné nastavení poznamenáno.

Jelikož je perfuzát relativně viskózní a má tendenci se srážet na vnitřním povrchu hadiček, je zásadní jejich pečlivé čištění. Nejen úlomky zaschlého perfuzátu, ale také obtížně odstranitelná rezidua chemikálií a farmak mohou ulpívat na stěnách hadiček. Proto jsou před i po každém vyschnutí hadičky promývány alespoň 30 minut vodou. Dále jsou ponořeny do saponátového roztoku, kterým jsou i napuštěny, a tak jsou skladovány přes noc. Jelikož ani to někdy nestačí, před i po každém pokusu byly ještě mechanicky promyty po celé délce za konstantního průtoku.

4.1.5 ROS

Na dalších třech potkanech (+ 3 kontrolních) byla měřena produkce ROS dvěma různými metodami – elektronovou paramagnetickou resonancí (EPR) a detekcí malonaldehydu pomocí vysokovýkonné kapalinové chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography). Po izolaci a stabilizaci plic byl použit stejný protokol jako u ostatních potkanů, kontroly však v tomto případě nedostaly malonát vůbec a po druhé hypoxii už se nic neaplikovalo.

Přesně 10 minut před ukončením, odstřížením a zmražením vzorků plic (v tekutém dusíku) bylo do perfuzátu přidáno značení pro EPR. Tato značka (tzv. spin trap) reaguje s nestabilním superoxidem a vytváří stabilní radikál, který byl po tuto dobu akumulován a v analyzáru po zmražení změřen (mezitím proběhlo několik dní, během kterých byly vzorky uchovávány v teplotě $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

Koncentrace malonaldehydu (MDA) ve vzorku (nepřímé měření oxidativního stresu) byla stanovena pomocí HPLC (UV-Vis spektrometrem) (Agarwal and Chase, 2002). Vzorky pro tyto dvě metody byly odebrány ze stejných plic (a pokud to bylo možné, tak ze stejného laloku).

4.1.5.1 Statistika

Výsledky měření byly statisticky zpracovány pomocí klasického nepárového t-testu (měření produkce ROS, 3 pokusní + 3 kontrolní potkani) nebo neparametrickým Wilcoxonovým párovým testem (6 pokusných potkanů s autokontrolou).

4.2 MATERIÁL

Calypsol – injekční roztok 50 mg/ml; léčivou látkou je ketaminum 500 mg (jako ketamini hydrochloridum 576,7 mg) v jedné lahvičce (10 ml) + pomocnými látkami jsou benzethonium-chlorid, chlorid sodný, voda.

Výrobce: Gedeon Richter (Gedeon Richter Plc., Gyömrői út 19-21, 1103 Budapešť, Maďarsko)

Xylapan – injekční roztok 20 mg/ml; v 1 ml roztoku: Xylazinum 20,00 mg (ut Xylazini hydrochloridum 23,32 mg) + pomocné látky methylparaben (0,65 mg), propylparaben (0,36 mg), chlorid sodný, voda

Výrobce: Vétoquinol s.r.o. (Zámečnická 411, 288 02 Nymburk)

lontový roztok:

1 litr perfuzního roztoku obsahuje:

- 6,95 g NaCl
- 0,35 g KCl
- 0,14 g MgSO₄ anh.
- 1,43 g NaHCO₃
- 0,16 g KH₂PO₄
- 0,99 g D-glukózy (dextrózy)
- 0,47 g CaCl₂

→ to vše doplněno destilovanou vodou na celkový objem 1 000 ml

Před použitím byl do tohoto roztoku přidán albumin (Bovine Serum Albumin) - 4 g na 100 ml roztoku.

Všechny chemikálie v perfuzátu jsou od výrobce Sigma-Aldrich.

Meklofenamát (Meclofenamic acid sodium salt nebo též: 2-[(2,6-Dichloro-3-methylphenyl)amino]benzoic acid sodium salt) slouží k inhibici cyklooxygenázy a tvorby prostaglandinů. 2,7 mg bylo smícháno na vortexu s 1 ml destilované vody těsně před pokusem.

Výrobce: Sigma-Aldrich

L - NAME (Nω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride) je analog L-argininu, který slouží jako inhibitor NO syntázy (NOS). Zabrání se tak působení endotelového vasodilatačního faktoru oxidu dusnatého (NO). 6,7 mg bylo smícháno na vortexu s 1 ml destilované vody těsně před pokusem.

Výrobce: Sigma-Aldrich

Heparin - 100 µl (5000 IU/ml) použito na každého potkana bez ohledu na hmotnost. Držitel rozhodnutí o registraci a výrobě: Zentiva, k. s., U Kabelovny 130, 102 37, Praha 10

Malonát (malonic acid; výrobce: Sigma-Aldrich) - jeho roztok, podávaný do rezervoáru, byl namíchán z 42,6 mg malonátu a 1 ml destilované vody. Po přidání 2 ml tedy v perfuzním oběhu nabyt cca 20mmol koncentraci, což je v rámci hodnot studie Valls-Lacalle, ve které byla sukcinát dehydrogenáza také inhibována malonátem (Valls-Lacalle¹⁵). Předběžné testy koncentrace neukazovaly rozdíl při vyzkoušení vyšších (i nižších) hodnot.

Nejdříve byl aplikován pouze rozpuštěn ve vodě. V následných pokusech byla stejná koncentrace neutralizována hydrogenuhličitanem sodným (výrobce: Sigma-Aldrich)

Analyzátor krevních plynů, který byl používán k měření parciálních tlaků vzorků perfuzátu v průběhu pokusů je ABL800 Basic Radiometer.

Výrobce: Radiometer Medical ApS (Dánsko)

EPR

Bruker E-Scan M - analyzer for EPR (Electron Paramagnetic Resonance)

Výrobce: NOXYGEN (Německo)

Snímač tlaku: Reusable BP Transducer MLT0380 (v kombinaci se záznamovým zařízením Power Lab 4/20 + QUAD Bridge)

Výrobce: ADInstruments

Perfuzní pumpa: Peristaltic Pump, model Minipuls 3 od firmy Gilson (Francie)

Ventilační pumpa: Harvard Rodent Ventilator (model 683) od firmy Harvard Apparatus (USA)

Vodní lázeň (ohřev): Julabo, typ/model: ED; od firmy Julabo Labortechnik GmbH (Německo)

Směsi plynů v zásobních pytlích byly před pokusem napuštěny míchačem plynů v těchto poměrech:

NORMOXIE = 21 % O₂; 5 % CO₂; zbytek N₂

HYPOXIE = 0 % O₂; 5 % CO₂; zbytek N₂

Míchač: Pegas 4000MF GasMixer

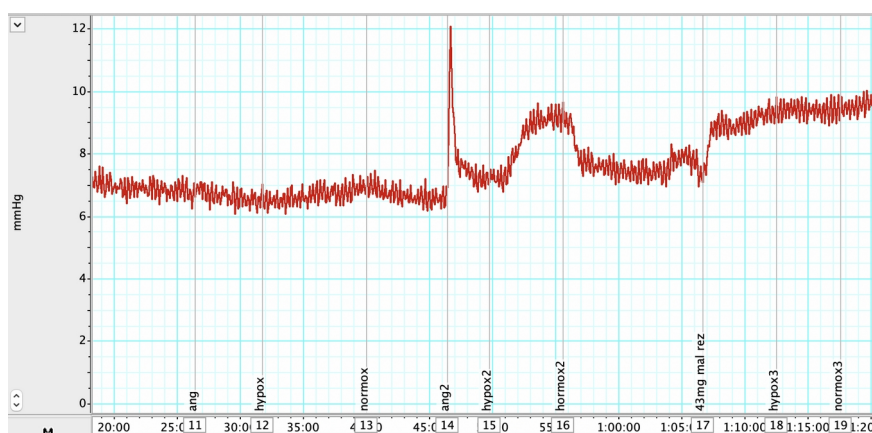
Výrobce: Columbus Instruments (USA)

Tekutý dusík na chlazení materiálů a plyny O₂, N a CO₂ dodala společnost Linde Gas a.s.

5. VÝSLEDKY

5.1 pH

V rámci přípravných předběžných pokusů bylo vyzkoušeno i působení samotné kyseliny malonové (bez úpravy pH). Tyto předběžné výsledky ukázaly vazokonstrikční působení kyseliny malonové, které bylo úměrné dávce. Výsledné pH perfuzátu bylo ovšem příliš nízké (dokonce mimo rozsah měření našeho analyzátoru krevních plynů, který má spodní hranici 6,3). Reaktivita na tento druh podnětu nicméně tedy fungovala dobře (viz obr. 5). Možnost modulace svalového tonu změnou pH je relativně dobře známa, přestože detaily tohoto mechanismu ještě nejsou plně popsány.



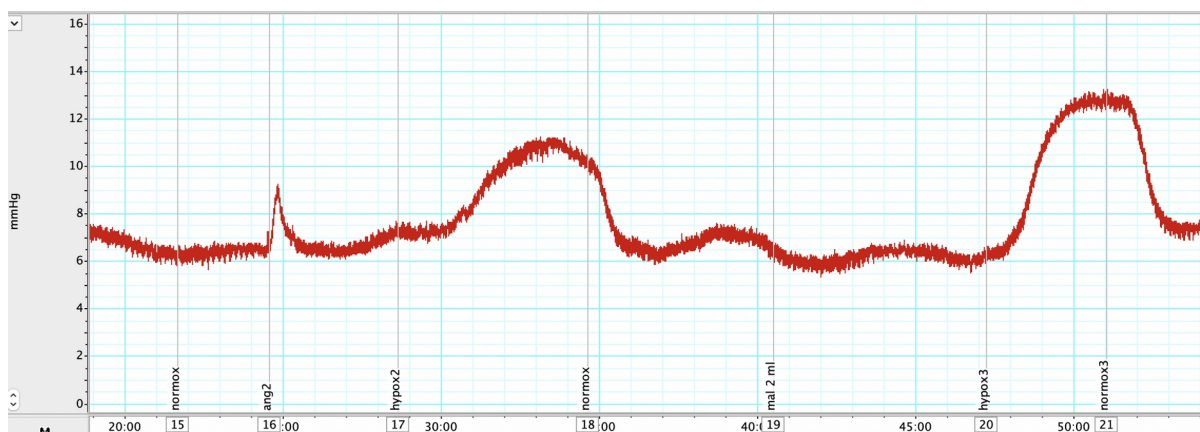
Obr. 5 Příklad měření reaktivity na kyselinu malonovou. Po aplikaci malonátu (43 mg rez – celkem 43 mg podáno do rezervoáru – 10mmol koncentrace v perfuzátu) se zvýšil odpor plicního řečiště a následná hypoxie už silnou odpověď nevyvolala.

5.2 Změna odporu plicního řečiště malonátem

Pro vlastní experiment bylo proto nutno eliminovat vliv poklesu pH. Po podání neutralizovaného roztoku malonátu nebyla změna v odporu plicního řečiště pozorována. Nárůst tlaku po blokaci komplexu II malonátem se nezvýšil. (tabulka. 1).

Tabulka 1 - tělesná hmotnost, bazální perfusní tlak (base), perfusní tlak po aplikaci malonát (po malonátu) a jejich navýšení (rozdíl) u šesti potkanů a průměrná hodnota tohoto navýšení. Zaokrouhleno na dvě desetinná místa. SD - standardní odchylka

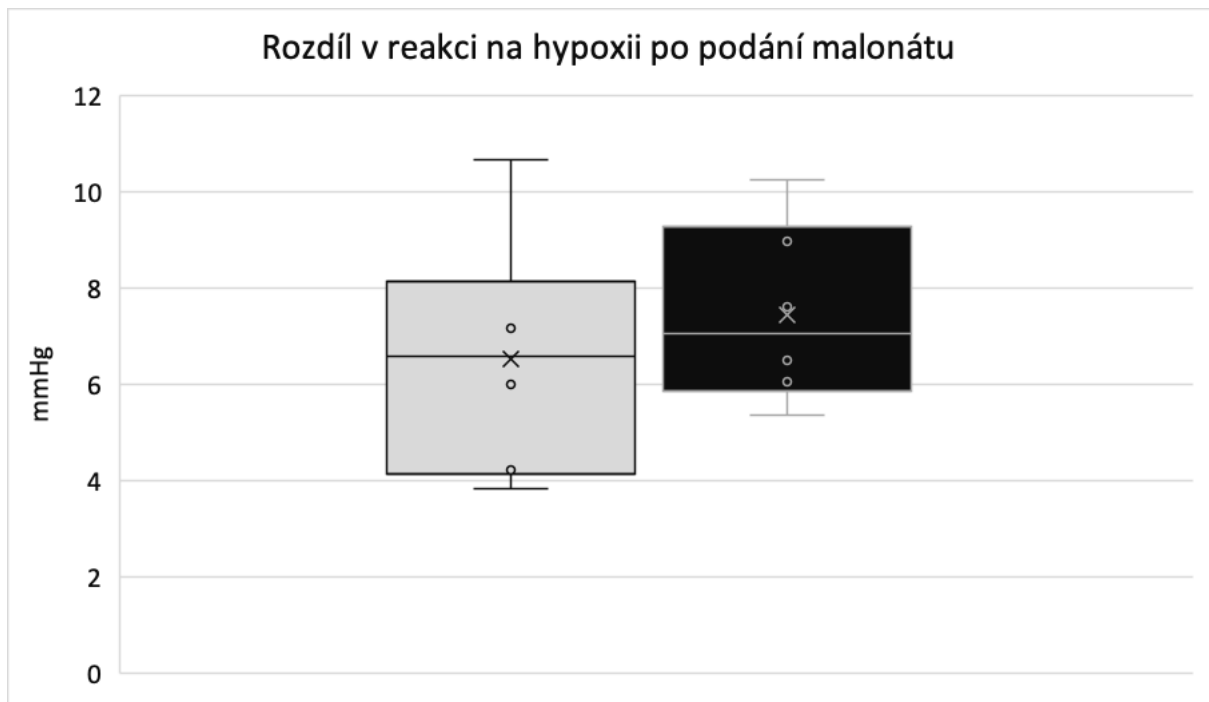
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | průměr | SD |
|----------------------|------|------|------|-------|-------|-------|--------------|-------|
| Hmotnost potkana (g) | 490 | 500 | 380 | 510 | 512 | 554 | 491 | 53,50 |
| Base (mmHg) | 6,15 | 7,07 | 6,31 | 6,82 | 10,29 | 6,70 | 7,22 | 1,40 |
| po malonátu (mmHg) | 6,24 | 7,81 | 6,84 | 6,20 | 9,81 | 6,05 | 7,16 | 1,33 |
| Rozdíl (mmHg) | 0,09 | 0,75 | 0,53 | -0,63 | -0,48 | -0,65 | -0,06 | 0,56 |



Obr. 6 - přidání malonátu (mal 2 ml) nemá vliv na odpor plic.

5.3 Změna reaktivity plicního řečiště malonátem

Tlak v plicnici v reakci na samotnou hypoxii narostl v průměru o 6,5 mmHg oproti normoxii. Po podání malonátu byl průměrný hypoxický nárůst necelých 7,5 mmHg. (Tabulka 2, Obr. 7). V průměru jsme tedy zaznamenali mírný nárůst.

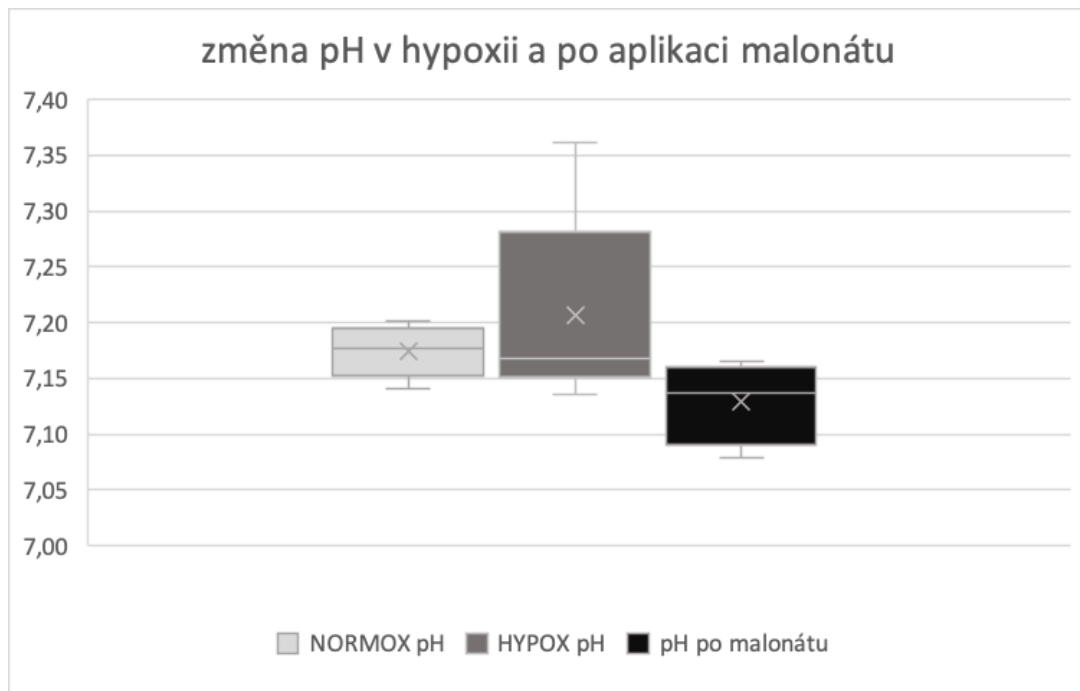


Obr. 7 – Zvýšení perfusního tlaku v odpovědi na hypoxii před a po podání malonátu. SD (směrodatná odchylka, Standard Deviation) pro tyto hodnoty je 2,27 a 1,70 mmHg.

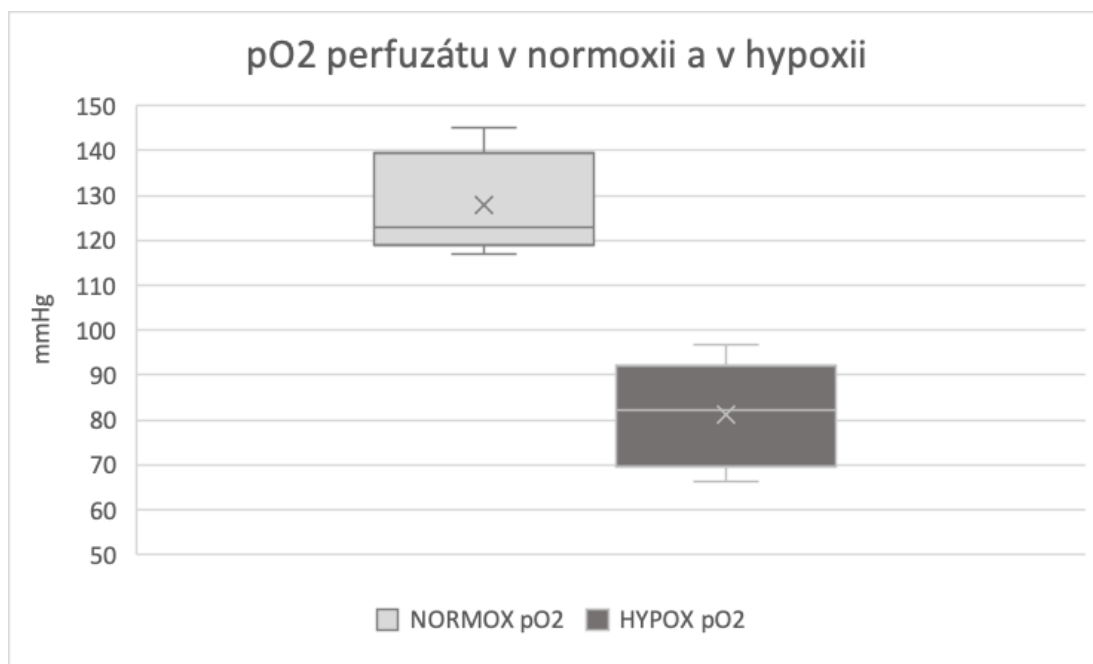
Průměrně se po podání malonátu zvýšila reakce o 0,92 mmHg. Tento nárůst však nebyl signifikantní. Byl použit neparametrický wilcoxonův párový test, jelikož data neměla normální rozdělení. Nulovou hypotézu (že se po přidání malonátu tlak nezmění) jsme na 95% hladině významnosti nemohli zamítnout, jelikož p-value byla 0,5781. Tj. můžeme předpokládat, že průměry jsou ve skutečnosti stejné.

5.4 Krevní plyny

Během pokusů byly odebrány vzorky perfuzátu v hypoxii a v normoxii. A také po aplikaci malonátu, aby bylo potvrzeno fyziologické pH. Z výsledků je zřejmé, že pH nebylo významně změněno. Hypoxie byla mírná, avšak dostatečná i k relativně silné hypoxické plicní vasokonstrikci.



Obr. 8 - Hypoxie ani malonát nemění významně pH perfuzátu. SD jsou 0,02, 0,09 a 0,04 zleva doprava.

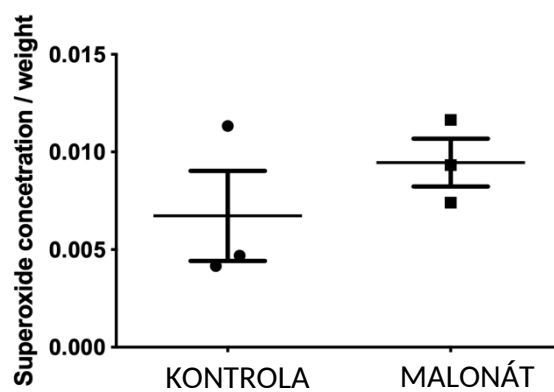


Obr. 9 - Změna parciálního tlaku O₂ vystavením plic hypoxii. SD je 11,4 a 12 mmHg.

5.5 ROS

5.5.1 Elektronová paramagnetická rezonance

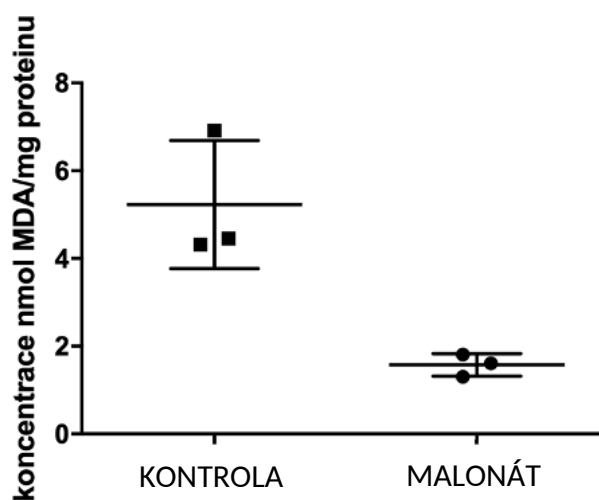
Výsledky produkce superoxidu v plicní tkáni ukázaly, že se hodnoty bez malonátu a s ním nelišily. ($p = 0,371$)



Obr. 10 - Relativní koncentrace superoxidu dělená hmotností vzorku

5.5.2 Malonaldehyd

Koncentrace malonaldehydu v homogenitu plicní tkáně byla signifikantně snížena předchozím podáním malonátu ($p = 0,0457$).



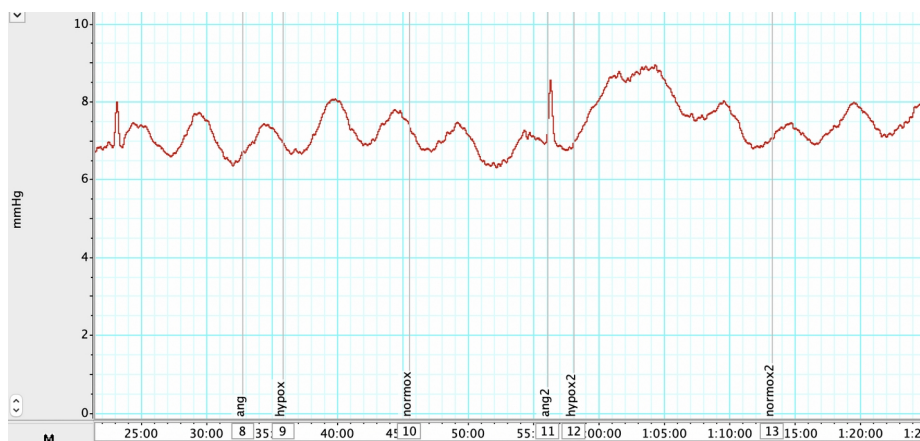
Obr. 11 - koncentrace MDA v plicní tkáni dělená množstvím proteinu

5.6 Množství výsledků

Vzhledem k jemnosti využitě metody byla počáteční část mého působení v laboratoři věnována učení se a zdokonalování se v izolaci plic. Realistický odhad umožňující provedení pokusu s předstihem byl posunut kvůli technickým problémům. Laboratoř, ve které jsem dělal pokusy s izolovanými plícemi (a tedy i veškerá aparatura), byla na začátku mé práce přestěhována do nové budovy. Vše muselo být znovu připojeno a tím vznikly těžko odstranitelné zábrany v přesném měření. To se projevovalo hlavně oscilacemi v záznamu tlaku (viz obr. 12). Ty jsme se snažili všemi možnými způsoby eliminovat. Během toho jsem začal alespoň předběžné pokusy, aby se využili už zakoupení potkaní. Výsledky z nich sice nebyly použitelné pro tuto práci, vyzkoušel jsem si na nich však daný protokol a mohl jsem trénovat operaci potkanů, což je nejnáročnější část pokusu.

Nakonec se ukázalo, že oscilace byly nejspíše způsobeny výkyvy elektrické sítě v nové budově. Až po jejich odstranění jsme mohli začít experimenty měřit správně a nedlouho poté jsem musel práci ve Fyziologickém ústavu pozastavit úplně kvůli opatřením proti pandemii covid-19.

Na začátku práce v laboratoři jsem operoval 15 zkušebních potkanů. Dále bylo operováno asi 25 potkanů, během čehož jsem se snažil eliminovat oscilace. Když se to začalo dařit, u dalších potkanů bylo obtížné plíce stabilizovat. Dohromady jsem zpracoval 56 padesát potkanů, u kterých jsem se pokusil o měření (+15 zkušebních). Dobrých záznamů z pokusů s neutralizovaným malonátem bylo dohromady pouze 6. Přestože je to podprůměrná úspěšnost i u takto komplexní metody, alespoň jsem tak dosáhl statisticky významného množství (a ani výsledky, které zde nejsou kvůli oscilacím publikovány, nejsou s těmi výše uvedenými v rozporu).



Obr. 12 - Výsledky byly ze začátku nepoužitelné, kvůli oscilacím v záznamu.

6. DISKUSE

Hlavním přínosem této práce je definitivní vyloučení SDH jako možného senzoru HPV.

Pokud by inhibice SDH hypoxií byla stimulem pro odstartování HPV, pak by její farmakologická inhibice měla udělat totéž – a neudělala.

Navíc – pokud by inhibice SDH hypoxií byla stimulem pro odstartování HPV – neměla by hypoxie v situaci farmakologicky inhibované SDH už nic dalšího udělat (aspoň ně kvantitativně to samé jako bez inhibice SDH) – a to se taky nepotvrdilo.

Přítom to, že malonát byl vůči SDH efektivním inhibítozem ukazují nejen literární data, ale hlavně výsledky s MDH.

Předběžné pokusy s kyselinou malonovou (bez neutralizace) ukázaly nárůst odporu v závislosti na dávce. Gardener a spol. pozorovali depolarizaci PASMČ při pH 6,4 (Gardener et al., 2004) a naše hodnoty byly ještě nižší. Vzhledem k výsledkům s neutralizovaným malonátem můžeme však říci, že veškerý tento nárůst byl způsoben nízkým pH, a ne specifickým působením malonátu.

Klíčovým výsledkem této práce je nezměněná hodnota odporu i reaktivity plicního řečiště v přítomnosti inhibítozem sukcinát dehydrogenázy, malonátu. Tento výsledek interpretujeme v souladu s naší hypotézou, že pro iniciaci HPV signalizace je důležitá inhibice SDH.

Jelikož se odpor plicního řečiště po podání malonátu nezvýšil, byla tato hypotéza vyvrácena.

SHD tedy není tou částí elektrontransportního řetězce, jejíž inhibice sníženou dostupností O₂ by vytvářela vasokonstriční signál. Přestože některé studie naznačují její nezanedbatelný význam, my jsme ho v tomto smyslu nepozorovali (Paddenberg et al., 2003).

Původně jsme očekávali, že malonát cévní resistenci zvýší, a reaktivita na hypoxii se sníží.

Opakování hypoxického podnětu vede k potenciaci HPV, i když velikost odpovědi mezi druhým a třetím opakováním už nebývá velká. Mohli bychom zvolit design pokusu se dvěma skupinami, z nichž jedna by byla kontrolní – tudíž by podstoupila 3 hypoxie a mohli bychom přesně znát rozdíl mezi druhou a třetí odpovědí a porovnat ji s hypoxií po podání malonátu.

Tento rozdíl je však znám z literatury, a také by to vyžadovalo usmrcení většího množství potkanů. Proto jsme se rozhodli pro design s autokontrolou.

Podle dat ve studiích, využívajících podobný protokol jako my, je průměrný rozdíl mezi druhou a třetí odpovědí cca 1 mmHg (McMurtry et al., 1978; Tucker et al., 1982). Jelikož byla v našich výsledcích průměrná odpověď na druhou hypoxii 6,5 mmHg a průměrná odpověď na třetí hypoxii (po aplikaci malonátu) 7,5 mmHg (malé značky X na Obr.7), je zřejmé, že reaktivita plicního řečiště není malonátem nijak postřehnutelně ovlivněna.

Možným vysvětlením tohoto negativního výsledku by mohlo být, že se nám malonátem z nějakých důvodů nepodařilo komplex II dostatečně efektivně zablokovat. Z tohoto pohledu považujeme za velmi významné výsledky našeho měření koncentrací malonaldehydu. Ty (dokonce navzdory poměrně nízkému počtu měření) ukazují, že se po přidání malonátu míra oxidativního stresu zdatelně snížila a tím nám slouží i jako kontrola úspěšné blokace SDH. V jiných studiích byl navíc malonát také úspěšně použit k inhibici SDH (Valls-Lacalle et al., 2016).

Rzdíl ve stanovení produkce ROS mezi dvěma metodami (EPR a malonaldehyd) působí nekonzistentním dojmem. Je však třeba si uvědomit rozdíly mezi použitými metodami. Malonaldehyd je látka, která vzniká s lipidovým poškozením. Její přítomnost tedy udává míru oxidativního stresu, což nemusí přímo odpovídat vzniku superoxidu v komplexech elektrontransportního řetězce. Koncentrace MDA je také kvůli reparačním mechanismům relativně nezávislá na čase – není kumulativní a naznačuje spíše aktuální hodnotu oxidace. Oproti tomu spin trap značení (pro EPR) vytvoří tím více stabilních molekul, čím déle ho necháme působit. Výsledky z EPR však nejsou tak jednoznačné, abychom z nich mohli vyvozovat závěry o ovlivnění malonátem.

Jak si však vysvětlíme snížené hodnoty malonaldehydu po zablokování sukcinát dehydrogenázy, když jsme čekali produkci ROS v hypoxii spíše vyšší?

Naše výsledky však ukazují, že je ETC v hypoxii blokován distálně (nebo možná paralelně) vůči komplexu II. I když nemá komplex II možnost dále předávat elektrony (např. právě v hypoxii), nebo když je blokován na vazebném místě pro ubiquinon, může vázat sukcinát a z převzatých elektronů vytvářet více ROS (podobně je v určité míře produkuje i v normoxii). Ale při blokaci vazebného místa pro sukcinát (malonátem) není možnost navázání sukcinátu

a ustane tak veškerá jeho aktivita včetně normoxické produkce ROS (a asi i částečně distálně od něj). Proto může být produkce ROS v hypoxii zvýšená a blokací SDH malonátem snižena (Quinlan et al., 2012; Siebels and Dröse, 2013). Naše výsledky tedy podporují teorii, že SDH má centrální roli v tvorbě ROS (přímo i nepřímo), ale zároveň není místem prvotní detekce hypoxie.

To poukazuje na význam cesty elektronů skrze SDH v produkci normoxických ROS. Zablokování tohoto vstupu do ETC poklesly o více než 50 %, což by mohlo znamenat, že většina ROS v buňce běžně vzniká v komplexu II.

Tento dramatický pokles produkce by se však dal vysvětlit relativně vyšším přispěním této elektronové trasy k celkovému elektronovému transportu. Neboli většina ROS by vznikala distálně od komplexu II, ale s jeho zablokováním ustane i tato produkce, jelikož je přísun elektronů snížen o cestu skrze komplex II a komplex I ho nestíhá komplezovat. Blokace SDH by tak inhibovala i většinu produkce ROS dále v řetězci.

V diskusi o roli cesty elektronů skrz SDH je také vhodné nezapomenout na reverzní elektronový transport (RET). Jedná se o třetí cestu, která při dostatečném množství sukcinátu žene elektrony z komplexu II skrze komplex I. V této situaci nestíhá komplex III pojmout velké množství ubichinolu, který je tak oxidován na komplexu I za vzniku velkého množství ROS. Tento mechanismus produkuje kyslíkové radikály, přestože názory na to, jestli vznikají spíše na komplexu I či II, se různí (Moreno-Sánchez et al., 2013; Muller et al., 2008). I v normoxii tak může vznikat relativně velké množství ROS.

7. ZÁVĚR

Signalizační kaskáda hypoxické plicní vasokonstrikce je nepochybně značně komplexní, pravděpodobně s jistou mírou mezidruhové, a dokonce i vnitrodruhové (pohlavní) variability a metodologicky velmi náročná zachytit. Nekonzistence mezi detaily používaných metod a tím i mezi výsledky různých výzkumných skupin zatím znemožňují tento jev dostatečně uspokojivě popsat.

Existovaly důvody se domnívat, že důležitou roli v detekci hypoxie hraje komplex II elektronového transportního řetězce. Proto jsme se rozhodli pro testování hypotézy komplexu II jako primárního senzoru hypoxie. Pro tuto práci jsme vybrali metodu izolovaných plic, která (na rozdíl od většiny ostatních výzkumných metod HPV) umožňuje testování vasokonstrikce v kontextu celých plic. Pomocí této metody jsme testovali, zda inhibice SDH malonátem zvýší plicní cévní rezistenci tak, jako ji zvyšuje hypoxie.

Tuto vasokonstrikci však malonát neaktivoval a hypotézu jsme museli zamítnout. Jistotu, že se nám SDH povedlo touto dávkou malonátu dostatečně inhibovat, nám poskytly výsledky produkce malonaldehydu, které ukazují jednoznačný pokles ROS po aplikaci malonátu.

Tato práce ukázala, že sukcinát dehydrogenáza není primárním senzorem hypoxie v plicní cirkulaci.

8. LITERATURA

- Aarseth, P., Bjertnaes, L., Karlsen, J., 1980. Changes in blood volume and extravascular water content in isolated perfused rat lungs during ventilation hypoxia. *Acta Physiol. Scand.* 109, 61–67.
- Agarwal, R., Chase, S.D., 2002. Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 775, 121–126.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D.O., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2014. *Molecular Biology of the Cell*, 6th ed. Garland Science.
- Archer, S., Michelakis, E., 2002. The Mechanism(s) of Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction: Potassium Channels, Redox O₂ Sensors, and Controversies. *Physiology* 17, 131–137.
- Archer, S.L., Mike, D., Crow, J., Long, W., Weir, E.K., 1996. A placebo-controlled trial of prostacyclin in acute respiratory failure in COPD. *Chest* 109, 750–755.
- Archer, S.L., Nelson, D.P., Weir, E.K., 1989. Simultaneous measurement of O₂ radicals and pulmonary vascular reactivity in rat lung. *J. Appl. Physiol.* 67, 1903–1911.
- Archer, S.L., Reeve, H.L., Michelakis, E., Puttagunta, L., Waite, R., Nelson, D.P., Dinauer, M.C., Weir, E.K., 1999. O₂ sensing is preserved in mice lacking the gp91 phox subunit of NADPH oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7944–7949.
- Archer, S.L., Souil, E., Tuan Dinh-Xuan, A., Schremmer, B., Mercier, J.C., Yaagoubi, A. El, Nguyen-Huu, L., Reeve, H.L., Hampl, V., 1998. Molecular identification of the role of voltage-gated K⁺ channels, Kv1.5 and Kv2.1, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. *J. Clin. Invest.* 101, 2319–2330.
- Archer, S.L., Wu, X.C., Thébaud, B., Nsair, A., Bonnet, S., Tyrrell, B., McMurtry, M.S., Hashimoto, K., Harry, G., Michelakis, E.D., 2004. Preferential expression and function of voltage-gated, O₂-sensitive K⁺ channels in resistance pulmonary arteries explains regional heterogeneity in hypoxic pulmonary vasoconstriction: Ionic diversity in smooth muscle cells. *Circ. Res.* 95, 308–318.

- Brown, M.J., Olver, R.E., Ramsden, C.A., Strang, L.B., Walters, D. V., 1983. Effects of adrenaline and of spontaneous labour on the secretion and absorption of lung liquid in the fetal lamb. *J. Physiol.* 344, 137–152.
- Buescher, P.C., Pearse, D.B., Pillai, R.P., Litt, M.C., Mitchell, M.C., Sylvester, J.T., 1991. Energy state and vasomotor tone in hypoxic pig lungs. *J. Appl. Physiol.* 70, 1874–1881.
- Burger, G., Lang, B.F., Reith, M., Gray, M.W., 1996. Genes encoding the same three subunits of respiratory complex II are present in the mitochondrial DNA of two phylogenetically distant eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2328–2332.
- Burrows, B., Kettel, L.J., Niden, A.H., Rabinowitz, M., Diener, C.F., 1972. Patterns of Cardiovascular Dysfunction in Chronic Obstructive Lung Disease. *N. Engl. J. Med.* 286, 912–918.
- Conhaim, R.L., Staub, N.C., 1980. Reflection spectrophotometric measurement of O₂ uptake in pulmonary arterioles of cats. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* 48, 848–856.
- Demiryurek, A.T., Wadsworth, R.M., Kane, K.A., 1991. Pharmacological evidence for the role of mediators in hypoxia-induced vasoconstriction in sheep isolated intrapulmonary artery rings. *Eur. J. Pharmacol.* 203, 1–8.
- Dingemans, K.P., Wagenvoort, C.A., 1978. Pulmonary arteries and veins in experimental hypoxia. An ultrastructural study. *Am. J. Pathol.* 93, 353–68.
- Dipp, M., Nye, P.C.G., Evans, A.A.M., 2001. Hypoxic release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of pulmonary artery smooth muscle. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 281, L318–L325.
- Euler, U.S. v., Liljestrand, G., 1946. Observations on the Pulmonary Arterial Blood Pressure in the Cat. *Acta Physiol. Scand.* 12, 301–320.
- Faraci, F.M., Kilgore, D.L., Fedde, M.R., 1984. Attenuated pulmonary pressor response to hypoxia in bar-headed geese. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 16, R402–R403.
- Finkel, T., 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* 194, 7–15.
- Firth, A.L., Remillard, C. V., Platoshyn, O., Fantozzi, I., Ko, E.A., Yuan, J.X.-J., 2011. Functional Ion Channels in Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells: Voltage-Dependent Cation Channels. *Pulm. Circ.* 1, 48–71.

- Forsythe, J.A., Jiang, B.-H., Iyer, N. V, Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., Semenza, G.L., 1996. Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4604–4613.
- Franco-Obregón, A., López-Barneo, J., 1996. Differential oxygen sensitivity of calcium channels in rabbit smooth muscle cells of conduit and resistance pulmonary arteries. *J. Physiol.* 491, 511–518.
- Gainé, S.P., Hales, M.A., Flavahan, N.A., 1998. Hypoxic pulmonary endothelial cells release a diffusible contractile factor distinct from endothelin. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 274, 657–664.
- Gardener, M.J., Johnson, I.T., Burnham, M.P., Edwards, G., Heagerty, A.M., Weston, A.H., 2004. Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries.
- Grimmer, B., Kuebler, W.M., 2017. The endothelium in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* 123, 1635–1646.
- Guzy, R.D., Schumacker, P.T., 2006. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: The paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. In: *Experimental Physiology*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 807–819.
- Hadrava Vanova, K., Kraus, M., Neuzil, J., Rohlena, J., 2020. Redox Report Communications in Free Radical Research Mitochondrial complex II and reactive oxygen species in disease and therapy Mitochondrial complex II and reactive oxygen species in disease and therapy. *Redox Rep.* 25, 26–32.
- Harder, D.R., Madden, J.A., Dawson, C., 1985. A Membrane Electrical Mechanism for Hypoxic Vasoconstriction of Small Pulmonary Arteries from Cat. *Chest* 88, 233S-235S.
- Hasunuma, K., Rodman, D., McMurtry, I., 1991. Effects of K⁺ channel blockers on vascular tone in the perfused rat lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144, 884–887.
- Herget, J., Chovanec, M., 2010. Isolated perfused murine lung: A well characterized preparation for studying lung vascular function. *Drug Discov. Today Dis. Model.* 7, 131–135.
- Hillier, S.C., Graham, J.A., Hanger, C.C., Godbey, P.S., Glenny, R.W., Wagner, W.W., 1997. Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules. *J. Appl. Physiol.* 82, 1084–1090.

- Jabr, R.I., Toland, H., Gelband, C.H., Wang, X.X., Hume, J.R., 1997. Prominent role of intracellular Ca²⁺ release in hypoxic vasoconstriction of canine pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.* 122, 21–30.
- Keserü, B., Barbosa–Sicard, E., Popp, R., Fisslthaler, B., Dietrich, A., Gudermann, T., Hammock, B.D., Falck, J.R., Weissmann, N., Busse, R., Fleming, I., 2008. Epoxyeicosatrienoic acids and the soluble epoxide hydrolase are determinants of pulmonary artery pressure and the acute hypoxic pulmonary vasoconstrictor response. *FASEB J.* 22, 4306–4315.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K., 1996. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* (80-.). 273, 245–248.
- Kizub, I. V., Lakhkar, A., Dhagia, V., Joshi, S.R., Jiang, H.L., Wolin, M.S., Falck, J.R., Koduru, S.R., Errabelli, R., Jacobs, E.R., Schwartzman, M.L., Gupte, S.A., 2016. Involvement of gap junctions between smooth muscle cells in sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction development: a potential role for 15-HETE and 20-HETE. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 310, L772–L783.
- Kylhammar, D., Rådegran, G., 2017. The principal pathways involved in the in vivo modulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction, pulmonary arterial remodelling and pulmonary hypertension. *Acta Physiol.* 219, 728–756.
- Lassègue, B., Sorescu, D., Szöcs, K., Yin, Q.Q., Akers, M., Zhang, Y., Grant, S.L., Lambeth, J.D., Griendling, K.K., 2001. Novel gp91phox homologues in vascular smooth muscle cells: Nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ. Res.* 88, 888–894.
- Lewis, A.B., Heymann, M.A., Rudolph, A.M., 1976. Gestational changes in pulmonary vascular responses in fetal lambs in utero. *Circ. Res.* 39, 536–541.
- Li, X.Q., Zheng, Y.M., Rathore, R., Ma, J., Takeshima, H., Wang, Y.X., 2009. Genetic evidence for functional role of ryanodine receptor 1 in pulmonary artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 457, 771–783.
- Liu, Q., Sham, J.S.K., Shimoda, L.A., Sylvester, J.T., 2001. Hypoxic constriction of porcine distal pulmonary arteries: Endothelium and endothelin dependence. *Am. J. Physiol.* -

- Lung Cell. Mol. Physiol. 280, 856–865.
- Loschen, G., Flohé, L., Chance, B., 1971. Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. FEBS Lett. 18, 261–264.
- Madden, J.A., Dantuma, M.W., Sorokina, E.A., Weihrauch, D., Kleinman, J.G., 2008. Telokin expression and the effect of hypoxia on its phosphorylation status in smooth muscle cells from small and large pulmonary arteries. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 294, 1166–1173.
- McMurtry, I.F., 1985. BAY K 8644 potentiates and A23187 inhibits hypoxic vasoconstriction in rat lungs. Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol. 249, H741–H746.
- McMurtry, I.F., Davidson, A.B., Reeves, J.T., Grover, R.F., 1976. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by calcium antagonists in isolated rat lungs. Circ. Res. 38, 99–104.
- McMurtry, I.F., Hookway, B.W., Roos, S.D., 1978. Red blood cells but not platelets prolong vascular reactivity of isolated rat lungs. Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol. 3, H186–H191.
- Michelakis, E.D., Hampl, V., Nsair, A., Wu, X.C., Harry, G., Haromy, A., Gurtu, R., Archer, S.L., 2002. Diversity in mitochondrial function explains differences in vascular oxygen sensing. Circ. Res. 90, 1307–1315.
- Mitchell, P., 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature 191, 144–148.
- Mohazzab, H.K.M., Fayngersh, R.P., Kaminski, P.M., Wolin, M.S., 1995. Potential role of NADH oxidoreductase-derived reactive O₂ species in calf pulmonary arterial PO₂-elicited responses. Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. 269, L637–L644.
- Moreno-Sánchez, R., Hernández-Esquível, L., Rivero-Segura, N.A., Marín-Hernández, A., Neuzil, J., Ralph, S.J., Rodríguez-Enríquez, S., 2013. Reactive oxygen species are generated by the respiratory complex II - Evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex i. FEBS J. 280, 927–938.
- Morio, Y., Mcmurtry, I.F., 2002. Ca²⁺ release from ryanodine-sensitive store contributes to mechanism of hypoxic vasoconstriction in rat lungs.
- Muller, F.L., Liu, Y., Abdul-Ghani, M.A., Lustgarten, M.S., Bhattacharya, A., Jang, Y.C., Van Remmen, H., 2008. High rates of superoxide production in skeletal-muscle

- mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates. *Biochem. J.* 409, 491–499.
- Murray, T.R., Chen, L., Marshall, B.E., Macarak, E.J., 1990. Hypoxic Contraction of Cultured Pulmonary Vascular Smooth Muscle Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 3, 457–465.
- Neff, T.A., Petty, T.L., 1970. Long-term continuous oxygen therapy in chronic airway obstruction. Mortality in relationship to cor pulmonale, hypoxia, and hypercapnia. *Ann. Intern. Med.* 72, 621–626.
- Ng, L.C., Wilson, S.M., Hume, J.R., 2005. Mobilization of sarcoplasmic reticulum stores by hypoxia leads to consequent activation of capacitative Ca²⁺ entry in isolated canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *J. Physiol.* 563, 409–419.
- Ouiddir, A., Planès, C., Fernandes, I., Vanhesse, A., Clerici, C., 1999. Hypoxia upregulates activity and expression of the glucose transporter GLUT1 in alveolar epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21, 710–718.
- Paddenberg, R., Ishaq, B., Goldenberg, A., Faulhammer, P., Rose, F., Weissmann, N., Braundullaeus, R.C., Kummer, W., 2003. Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 284, L710–L719.
- Palacios-Callender, M., Quintero, M., Hollis, V.S., Springe, R.J., Moncada, S., 2004. Endogenous NO regulates superoxide production at low oxygen concentrations by modifying the redox state of cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7630–7635.
- Pham, I., Uchida, T., Planes, C., Ware, L.B., Kaner, R., Matthay, M.A., Clerici, C., 2002. Hypoxia upregulates VEGF expression in alveolar epithelial cells in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 283, L1133–L1142.
- Pognonecs, P., Katop, H., Roederl, R.G., 1992. The Helix-Loop-Helix/Leucine Repeat Transcription Factor USF Can Be Functionally Regulated in a Redox-dependent Manner*. *J. Biol. Chem.* 267, 24563–24567.
- Quinlan, C.L., Orr, A.L., Perevoshchikova, I. V., Treberg, J.R., Ackrell, B.A., Brand, M.D., 2012. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J. Biol. Chem.* 287, 27255–27264.
- Rai, P.R., Cool, C.D., King, J.A.C., Stevens, T., Burns, N., Winn, R.A., Kasper, M., Voelkel, N.F.,

2008. The cancer paradigm of severe pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 558–564.
- Reeve, H., Weir, E., Nelson, D., Peterson, D., Archer, S., 1995. Opposing effects of oxidants and antioxidants on K⁺ channel activity and tone in rat vascular tissue. *Exp. Physiol.* 80, 825–834.
- Rettig, J., Heinemann, S.H., Wunder, F., Lorra, C., Parcej, D.N., Oliver Dolly, J., Pongs, O., 1994. Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of β-subunit. *Nature* 369, 289–294.
- Robertson, T.P., Aaronson, P.I., Ward, J.P.T., 1995. Hypoxic vasoconstriction and intracellular Ca²⁺ in pulmonary arteries: Evidence for PKC-independent Ca²⁺ sensitization. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 268, H301–H307.
- Robertson, T.P., Aaronson, P.I., Ward, J.P.T., 2003. Ca²⁺ sensitization during sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction is endothelium dependent. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 284, L1121–L1126.
- Robertson, T.P., Dipp, M., Ward, J.P.T., Aaronson, P.I., Evans, A.M., 2000. Inhibition of sustained hypoxic vasoconstriction by Y-27632 in isolated intrapulmonary arteries and perfused lung of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 131, 5–9.
- Rounds, S., McMurtry, I.F., 1981. Inhibitors of oxidative ATP production cause transient vasoconstriction and block subsequent pressor responses in rat lungs. *Circ. Res.* 48, 393–400.
- Sabharwal, S.S., Waypa, G.B., Marks, J.D., Schumacker, P.T., 2013. Peroxiredoxin-5 targeted to the mitochondrial intermembrane space attenuates hypoxia-induced reactive oxygen species signalling. *Biochem. J.* 456, 337–346.
- Sackner, M.A., Will, D.H., Dubois, A.B., 1966. The Site of Pulmonary Vasomotor Activity during Hypoxia or Serotonin Administration *, *Journal of Clinical Investigation.*
- Salceda, S., Caro, J., 1997. Hypoxia-inducible Factor 1_α (HIF-1_α) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions. *J. Biol. Chem.* 272, 22642–22647.
- Salvatera, C.G., Goldman, W.F., 1993. Acute hypoxia increases cytosolic calcium in cultured pulmonary arterial myocytes. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 264, L323–L328.
- Santos, S., Peinado, V.I.I., Ramírez, J., Melgosa, T., Roca, J., Rodriguez-Roisin, R., Barberà,

- J.A.A., 2002. Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD. *Eur. Respir. J.* 19, 632–638.
- Siebels, I., Dröse, S., 2013. Q-site inhibitor induced ROS production of mitochondrial complex II is attenuated by TCA cycle dicarboxylates. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1827, 1156–1164.
- Simonneau, G., Gatzoulis, M.A., Adatia, I., Celermajer, D., Denton, C., Ghofrani, A., Gomez Sanchez, M.A., Krishna Kumar, R., Landzberg, M., Machado, R.F., Olschewski, H., Robbins, I.M., Souza, R., 2013. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. In: *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier, pp. D34–D41.
- Skovgaard, N., Abe, A.S., Andrade, D. V., Wang, T., 2005. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in reptiles: a comparative study of four species with different lung structures and pulmonary blood pressures. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 289, R1280–R1288.
- Smith, Kimberly A, Schumacker, Paul T, Shimoda, L., Schultz, H., Smith, K A, Schumacker, P T, 2019. The Journal of Physiology Sensors and signals: the role of reactive oxygen species in hypoxic pulmonary vasoconstriction. Authors. *J. Physiol. C* 597, 1033–1043.
- Snetkov, V.A., Aaronson, P.I., Ward, J.P.T., Knock, G.A., Robertson, T.P., 2003. Capacitative calcium entry as a pulmonary specific vasoconstrictor mechanism in small muscular arteries of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 140, 97–106.
- Sommer, N., Hüttemann, M., Pak, O., Scheibe, S., Knoepp, F., Sinkler, C., Malczyk, M., Gierhardt, M., Esfandiary, A., Kraut, S., Jonas, F., Veith, C., Aras, S., Sydykov, A., Alebrahimdehkordi, N., Giehl, K., Hecker, M., Brandes, R.P., Seeger, W., Grimminger, F., Ghofrani, H.A., Schermuly, R.T., Grossman, L.I., Weissmann, N., 2017. Mitochondrial Complex IV Subunit 4 Isoform 2 Is Essential for Acute Pulmonary Oxygen Sensing. *Circ. Res.* 121, 424–438.
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., Rao, Z., 2005. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein Complex II. *Cell* 121, 1043–1057.
- Symons, M.C.R., 1987. Long-lived superoxide radicals. *Nature* 325, 659–660.
- Thomas, A.Q., Gaddipati, R., Newman, J.H., Loyd, J.E., 2001. Genetics of primary pulmonary hypertension. *Clin. Chest Med.* 22, 477–491.
- Tucker, A., Greenlees, K.J., Wright, M.L., Migally, N., 1982. Altered vascular responsiveness

- in isolated perfused lungs from aging rats. *Exp. Lung Res.* 3, 29–35.
- Valls-Lacalle, L., Barba, I., Miró-Casas, E., Alburquerque-Béjar, J.J., Ruiz-Meana, M., Fuertes-Agudo, M., Rodríguez-Sinovas, A., García-Dorado, D., 2016. Succinate dehydrogenase inhibition with malonate during reperfusion reduces infarct size by preventing mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc. Res.* 109, 374–384.
- Wang, L., Yin, J., Nickles, H.T., Ranke, H., Tabuchi, A., Hoffmann, J., Tabeling, C., Barbosa-Sicard, E., Chanson, M., Kwak, B.R., Shin, H.S., Wu, S., Isakson, B.E., Witzenrath, M., De Wit, C., Fleming, I., Kuppe, H., Kuebler, W.M., 2012. Hypoxic pulmonary vasoconstriction requires connexin 40-mediated endothelial signal conduction. *J. Clin. Invest.* 122, 4218–4230.
- Ward, J.P., McMurtry, I.F., 2009. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction and their roles in pulmonary hypertension: new findings for an old problem. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 287–296.
- Waypa, G.B., Chandel, N.S., Schumacker, P.T., 2001. Model for Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction Involving Mitochondrial Oxygen Sensing. *Circ. Res.* 88, 1259–1266.
- Waypa, G.B., Guzy, R., Mungai, P.T., Mack, M.M., Marks, J.D., Roe, M.W., Schumacker, P.T., 2006. Increases in mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced calcium responses in pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ. Res.* 99, 970–978.
- Waypa, G.B., Marks, J.D., Guzy, R., Mungai, P.T., Schriever, J., Dokic, D., Schumacker, P.T., 2010. Hypoxia triggers subcellular compartmental redox signaling in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 106, 526–535.
- Waypa, G.B., Marks, J.D., Mack, M.M., Boriboun, C., Mungai, P.T., Schumacker, P.T., 2002. Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes. *Circ. Res.* 91, 719–726.
- Waypa, G.B., Schumacker, P.T., 2005. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: Redox events in oxygen sensing. *J. Appl. Physiol.* 98, 404–414.
- Weissmann, N., Dietrich, A., Fuchs, B., Kalwa, H., Ay, M., Dumitrascu, R., Olschewski, A., Storch, U., Y Schnitzler, M.M., Ghofrani, H.A., Schermuly, R.T., Pinkenburg, O., Seeger, W., Grimminger, F., Gudermann, T., 2006. Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 19093–19098.

- Whitehouse, D.G., Moore, A.L., 2013. Respiratory Chain and ATP Synthase. In: Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition. Elsevier Inc., pp. 83–86.
- Williams, M., Kerkar, S., Tyburski, J.G., Steffes, C.P., Carlin, A.M., Wilson, R.F., 2003. The roles of cyclic adenosine monophosphate- and cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase pathways in hydrogen peroxide-induced contractility of microvascular lung pericytes. *J. Trauma* 55, 677–684.
- Yuan, X.J., Tod, M.L., Rubin, L.J., Blaustein, M.P., 1994. Deoxyglucose and reduced glutathione mimic effects of hypoxia on K⁺ and Ca²⁺ conductances in pulmonary artery cells. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 267, 52–63.
- Zhang, Y.Z., Talwar, A., Tsang, D., Bruchfeld, A., Sadoughi, A., Hu, M.W., Omonuwa, K., Cheng, K.F., Al-Abed, Y., Miller, E.J., 2012. Macrophage Migration Inhibitory Factor Mediates Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Mol. Med.* 18, 215–223.
- Zhou, J., Zhang, J., Lu, Y., Huang, S., Xiao, R., Zeng, X., Zhang, X., Li, J., Wang, T., Li, T., Zhu, L., Hu, Q., 2016. Mitochondrial transplantation attenuates hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Oncotarget* 7, 31284–31298.