

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program:

Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Vojtěch Šedivý

Význam KCNQ kanálů v reakci plicní cévního řečiště na hypoxii

Role of KCNQ channels in response of the pulmonary circulation to hypoxia

Dizertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Jan Herget, DrSc.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 15.5.2016

Vojtěch Šedivý

Identifikační záznam:

ŠEDIVÝ, Vojtěch. *Význam KCNQ kanálů v reakci plicního cévního řečiště na hypoxii. [Role of KCNQ channels in response of the pulmonary circulation to hypoxia]*. Praha, 2016, 51 stran, 2 přílohy. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Ústav fyziologie. Školitel: Herget, Jan.

Obsah

1. Literární úvod	5
1.1. Plicní cévní oběh a jeho změny kolem porodu	5
1.2. Plicní hypertenze	6
1.3. Hypoxická plicní vazokonstrikce a KCNQ kanály	7
1.4. Dlouhodobé následky perinatální hypoxie	8
2. Cíl práce a hypotéza	13
3. Metody	14
3.1. Izolované perfundované plíce	14
3.2. Expozice chronické hypoxii	16
3.3. Perinatální hypoxie	20
3.4. Statistické zpracování dat	21
4. Výsledky	23
4.1. Akutní hypoxie – výsledky	23
4.2. Chronická hypoxie – výsledky	26
4.3. Perinatální hypoxie – výsledky	30
5. Diskuze	34
6. Závěr	39
7. Abstrakt	40
8. Abstact	42
9. Literatura	44
10. Přílohy	52

Seznam zkratek

4-AP	4-aminopyridin
ANG II	angiotensin II
$[Ca^{2+}]_i$	intracelulární koncentrace Ca^{2+}
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	(ethylenediaminetetraacetic acid) kyselina ethylendiamintetraoctová
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
HPH	hypoxická plicní hypertenze
HPV	hypoxická plicní vazokonstrikce
Hsp 90	heat shock protein 90
I_{KN}	neinaktivovatelný draselný proud
K_{Ca}	vápníkem řízené draselné kanály
K_v	napětově řízené draselné kanály
L-NAME	nitro-L-arginine-methyl-ester
NOx	NO a jeho oxidační produkty
PASMCs	(pulmonary artery smooth muscle cells) hladké svalové buňky plicních arterií
pO_2	parciální tlak O_2
$PGF_{2\alpha}$	prostaglandin $F_{2\alpha}$
RT-qPCR	(reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction) kvantitativní polymerázová řetězová reakce s předchozí reversní transkripcí
SDS	sodiumdodecylsulfát
SR	sarkoplasmatické retikulum
TBS	Tris-buffered saline
Tris	tris[hydroxymethyl]-aminomethan
TTBS	TBS s 0,1% Tween 20

1. Literární úvod

1.1. Plicní cévní oběh a jeho změny kolem porodu

U dospělého člověka existuje malý, plicní a velký, systémový krevní oběh. Obě části mají odlišnou funkci. Systémové řečiště přivádí k orgánům a tkáním kyslík a živiny a odvádí oxid uhličitý a zplodiny metabolismu. Naproti tomu plicní řečiště přivádí krev bohatou na CO₂ do plic a odvádí krev obohacenou o O₂. Obě řečiště mají stejný průtok, tím je srdeční výdej, ale zcela odlišný cévní odpor a tedy i krevní tlak.

Plicní cévní řečiště má několikanásobně nižší odpor cév. To je dáno jednak odlišnou morfologickou stavbou a jednak nízkým bazálním tonem plicních arterií. Plicní cévy jsou ve srovnání se systémovými kratší, což přispívá k nižšímu odporu. Prekapilární cévy v plicním řečišti mají ve srovnání dle vnějšího průměru se stejně velkými cévami systémového řečiště tenší stěnu. U větších arterií je střední svalová vrstva tvořena jednou vrstvou hladkých svalových buněk, kterých do periferie ubývá a prekapilární arterioly souvislou svalovou vrstvou nemají vůbec, jen jednotlivé tzv. intermediální buňky a pericyty též schopné kontrakce (Ošťádal *et al.*, 2003). Tato struktura dává plicním cévám vysokou poddajnost a nízký odpor proudu krve.

Narozdíl od systémových cév není popsána funkce a stavba plicních cév stejná během celého ontogenetického vývoje. V průběhu intrauterinního vývoje okysličování krve zajišťuje placenta, není tedy potřeba oddělené plicní cirkulace. Plícemi protéká asi jen 10 % společného srdečního výdeje obou komor (Guyton *et al.*, 2006). To je umožněno vysokým odporem plicního cévního řečiště a existencí fetálních zkratů. Krev vypuzena z pravé komory odtéká otevřenou tepennou dučejí do aorty díky nízké systémové resistenci. Vysoká vaskulární resistance fetálních plicních arterií je dána jejich strukturou a vysokým bazálním tonem. Tloušťka a složení cévní stěny je podobné systémovým cévám. Tonus je zvýšen i díky nízkému parciálnímu tlaku O₂ (pO₂) fetální krve. V okamžiku porodu, kdy je přerušena placentární cirkulace a novorozenec začne dýchat, se musí cirkulační poměry velmi rychle a zásadně změnit. Přerušením pupečnicku stoupá systémová cévní resistance a tedy i tlak v aortě. Díky rozepětí plic v souvislosti s prvním nádechem dochází k poklesu plicní cévní resistance. Zvýšení pO₂ v plicích vede k výrazné plicní vazodilataci, což přispívá k poklesu

plicní resistance. Během velmi krátké doby plicním řečištěm protéká celý srdeční výdej pravé komory. Zkrat tepennou dučejí se nejprve obrací na levopravý, později se dučej uzavírá. V průběhu následujících dnů až týdnů probíhá přestavba plicních cév spočívající v úbytku hladkého svalu a vaziva. Zásadní změny v plicní cirkulaci v perinatálním období vedou k tomu, že právě perinatální období je kritickou vývojovou periodou plicního řečiště. Plicní řečiště je velmi citlivé na různé patogenní podněty v období kolem porodu.

1.2. Plicní hypertenze

Plicní hypertenze znamená chronické zvýšení tlaku v plicnici. Tento stav je působen zvýšeným plicním cévním odporem. Příčin plicní hypertenze je celá řada. Při hyperkinetické plicní hypertenzi u vrozených srdečních vad s velkým plicním průtokem dojde k poškození plicních cév, zvýšení jejich odporu a k vzestupu tlaku v plicnici, který neodpovídá pouze nadměrnému průtoku. Při postkapilární plicní hypertenzi při postižení levého srdce či stenose plicních žil dojde opět k vzestupu tlaku v plicnici více než by odpovídalo pouze zvýšenému venosnímu tlaku. Při prekapilární plicní hypertenzi dojde k zvýšení odporu a snížení poddajnosti prealveolárních plicních cév. Do této skupiny patří hypoxická plicní hypertenze (HPH), ke které vede chronická hypoxie. Chronická hypoxie může být následkem alveolární hypoventilace jako je tomu u chronických plicních nemocech nebo nižšího pO_2 ve vdechovaném vzduchu jako při pobytu ve vysokých nadmořských výškách. Dále jsem patří primární plicní hypertenze, jejíž příčina je neznámá. Prognóza pacientů s plicní hypertenzí je různá. Zatímco primární plicní hypertenze je často bez transplantace plic fatální onemocnění, tak HPH je po odstranění příčinné hypoxie plně reversibilní (Herget *et al.*, 1978).

Morfologické změny periferních plicních cév při různých formách plicní hypertenze jsou v hlavních rysech podobné, soudí se tedy, že patologické mechanismy vedoucí k nárůstu plicního cévního odporu jsou alespoň zčásti společné a lze se domnívat, že klíčovým prvkem je rekonstrukce periferních plicních cév jako reakce na poškození cévní stěny. Při plicní hypertenzi hladký sval v medii hypertrofuje a proliferuje směrem k menším plicním arteriím, kde normálně není souvislá svalová vrstva (Meyrick *et al.*, 1979). Při těžších formách plicní hypertenze hladký sval proliferuje až do intimy (Sobin *et al.*, 1983). Při plicní hypertenzi je zvýšen metabolický obrat bílkovin pojivové tkáně a dochází k fibrose převážně adventicie a

také medie (Davies *et al.*, 1985). Hemodynamickým následkem morfologické přestavby je zúžení lumen a snížení poddajnosti periferních plicních cév. (Finlay *et al.*, 1986).

Na vzestupu plicní cévní resistance se při HPH podílí i plicní vazokonstrikce. Vazodilatační látky sníží tlak v plicnici při plicní hypertenzi, nikoliv však v normální plicní cirkulaci (Adnot *et al.*, 1988; Emery *et al.*, 1981). Mechanismus vazokonstrikce při plicní hypertenzi je odlišný od mechanismu akutní hypoxické plicní vazokonstrikce (HPV). Naopak HPV je při HPH oslabená. Chronická hypoxie způsobuje polycytémii, která díky zvýšení viskozity krve též zvyšuje plicní cévní resistenci (Barer *et al.*, 1983; Fried *et al.*, 1983). Rozvoj plicní hypertenze je doprovázen hypertrofií pravé komory a změnou biochemického složení její stěny (Rabinovitch *et al.*, 1979). Komplex plicní hypertenze a hypertrofie pravé komory při chronickém plicním onemocnění se nazývá cor pulmonale.

HPH je vzhledem k jednoduchosti a snadné reprodukovatelnosti nejčastější experimentální model pro studium plicní hypertenze. Chronické expozici hypoxii lze dosáhnout ve vysokých nadmořských výškách (hypobarická hypoxie) nebo snížením frakce O₂ v normobarické hypoxické komoře.

1.3. Hypoxická plicní vazokonstrikce a KCNQ kanály

Plicní cévy reagují na akutní hypoxii vazokonstrikcí (HPV). HPV je klíčový fyziologický mechanismus zajišťující redistribuci krevního průtoku v plicích vzhledem k ventilaci a tím optimalizuje arteriální pO₂. Sensorem nízkého pO₂ jsou samotné hladké svalové buňky plicních arterií (PASMCs) (Madden *et al.*, 1992). HPV je zahájena inhibicí napětově řízených draselných kanálů (Kv) (Archer *et al.*, 2000). Inhibice Kv kanálů vede k depolarizaci plasmatické membrány, aktivaci napětově řízených vápenatých kanálů L-typu, influxu Ca²⁺ do buňky a kontrakci (Mauban *et al.*, 2005). Arteriální hladké svalové buňky exprimují různé draselné kanály (Nelson *et al.*, 1995). Pro regulaci klidového membránového potenciálu a reakci na hypoxii byla studována řada podskupin Kv kanálů (Archer *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 1997; Remillard *et al.*, 2007). Pro klidový membránový potenciál se zdá být významný neinaktivovatelný draselný proud (I_{KN}), který má napětově závislou a napětově nezávislou komponentu (Joshi *et al.*, 2006; Osipenko *et al.*, 1997). Vlastnosti I_{KN} se velmi podobají tzv. neuronálnímu M-proudu (Evans *et al.*, 1996), za který jsou odpovědné KCNQ

(Kv7) kanály (Robbins, 2001; Wang *et al.*, 1998).

Skupina KCNQ kanálů má pět různých podtypů: KCNQ 1-5. Jsou exprimovány v různých tkáních a mají různé funkce (Robbins, 2001). Jako u jiných Kv kanálů, jeden funkční kanál je tvořen čtyřmi α -podjednotkami. Každá α -podjednotka se skládá z šesti transmembránových domén („TMD“) a jedné pór tvořící kličky („P-loop“) (Xiong *et al.*, 2008). Funkci kanálu a některé jeho vlastnosti mohou ovlivňovat přídavné β -podjednotky, které ale netvoří vlastní kanál. Jednotlivé KCNQ podjednotky se spojují, a tím tvoří vlastní funkční kanál. Pokud vznikne kanál se čtyřmi shodnými podjednotkami, hovoříme o homomultimerech. Jednotlivé KCNQ podjednotky avšak mohou interagovat i s jinými KCNQ podjednotkami nebo i s podjednotkami jiných Kv kanálů (heteromultimery) (Robbins, 2001).

KCNQ 1 kanály jsou exprimovány v srdci, kde ovlivňují repolarizační fázi akčního potenciálu. Mutace v KCNQ 1 genu jsou zodpovědné za nejčastější vrozenou formu dlouhého QT intervalu (Wang *et al.*, 1996). KCNQ 2, 3 a 5 jsou exprimovány v neuronech. Mutace v jejich genech mohou být odpovědné za některé typy epilepsie (Rogawski, 2000). KCNQ 1 a 4 jsou exprimovány ve vláskových buňkách vnitřního ucha a jejich mutace jsou spojovány s některými typy vrozené hluchoty (Kubisch *et al.*, 1999).

PASMCs exprimují KCNQ 1, 4 a 5. Největší zastoupení má mRNA KCNQ 4. V porovnání s expresí v mezenteriální arterii je množství v plicnici mnohonásobně větší (Joshi *et al.*, 2009). Blokátory KCNQ kanálů (linopirdin, XE 991) způsobují plicní vazokonstrikci, nekontrahují však systémové arterie (Joshi *et al.*, 2006; Joshi *et al.*, 2009). Při podání linopirdinu *in vivo* dochází u laboratorního potkana k vzestupu tlaku v plicnici, systémový krevní tlak se nemění. Naopak aktivátory KCNQ kanálů relaxují prekontrahované plicní arterie. Jejich efekt není závislý na endotelu a je inhibován snížením gradientu pro K^+ přes buněčnou membránu, což značí, že aktivují K^+ kanály na membráně hladkých svalových buněk (Joshi *et al.*, 2009).

1.4. Dlouhodobé následky perinatální hypoxie

Barker svými epidemiologickými studiemi ukázal souvislost mezi prenatálním a časně postnatálním vývojem a výskytem kardiovaskulárních chorob a diabetu u dospělých

(Barker, 1995; Barker *et al.*, 1993a; Barker *et al.*, 1993b). Experimenty na zvířecích modelech tuto hypotézu potvrzují. Potkani, jejichž matky byly v průběhu těhotenství krmeny nízkoproteinovou dietou, nikoliv v období laktace, mají v dospělosti vyšší krevní tlak (Langley *et al.*, 1994). Kritickým obdobím pro plíce a plicní řečiště zvláště je perinatální období. Jen několikahodinová expozice 10% O₂ kolem porodu ovlivní vývoj plic. Morfologické změny ve struktuře plic jsou ještě po 30 dnech od expozice téměř stejně vyjádřeny jako po několikadenní perinatální expozici hypoxii (Massaro *et al.*, 1989). Funkční a morfologické vlastnosti plic lze ovlivnit perinatálním podáváním dexamethasonu (le Cras *et al.*, 2000; Massaro *et al.*, 1992). Efekt dexamethasonu je odlišný u samců a samic (Massaro *et al.*, 1992). Chronická hypoxie působí plicní hypertenzi, která je více vyjádřená u novorozenců než u dospělých (Tucker *et al.*, 1984). Chronická hypoxie v perinatálním období způsobí změny v reaktivitě plicního řečiště přetrvávající do dospělosti (Hampl *et al.*, 1990). Expozice hypoxii v pozdějším věku tento efekt nemá (Hampl *et al.*, 1990).

Dlouhodobé změny způsobené perinatální hypoxií jsou v různých studiích popisovány různě, ale zjednodušeně lze říci, že perinatální hypoxie způsobuje zvýšenou náchylnost k rozvoji plicní hypertenze v pozdějším věku (Keith *et al.*, 2000). Potkani vystavení perinatální hypoxii mají v období zotavení z další chronické hypoxie v dospělosti zvýšenou HPV (Hampl *et al.*, 1990). HPV je u dospělých potkanů, kteří mají HPH, oslabená (McMurtry *et al.*, 1980; McMurtry *et al.*, 1978; Voelkel *et al.*, 1980; Walker *et al.*, 1982). Příčina není zcela jasná. Může být následkem poškození cévní stěny chronickou hypoxií a následným edémem (Sobin *et al.*, 1983; Sugita *et al.*, 1983). Naopak v období zotavení z chronické hypoxie je reaktivita na akutní hypoxii zvýšená, v delším časovém horizontu od hypoxického inzultu se dostává do normálu (McMurtry *et al.*, 1978). Nález zvýšené HPV po dvou týdnech zotavení z chronické hypoxie u perinatálně hypoxických potkanů může být následkem opožděného či nekompletního zotavování z pobytu v hypoxických podmínkách. Tento nález je klinicky relevantní. Rozvoj HPH je intermitentní. Období respirační insuficience (například akutní exacerbace chronické bronchitidy) se střídají s fázemi zotavení. Další ataka postihuje změněné, reaktivnější plicní řečiště. Proto krátká perinatální hypoxie ovlivní rozvoj HPH u dospělých (Hampl *et al.*, 1990).

Jiná práce popisuje změny plicního cévního řečiště pomocí závislosti perfúzního tlaku na průtoku krve plicemi (P/Q křivka). P/Q křivka je v rozmezí kolem normálních hodnot plicního průtoku lineární (Soohoo *et al.*, 1987). Má dva parametry: průsečík s tlakovou osou,

který vznikne extrapolací přímky k nulovému průtoku, odpovídá střednímu kritickému uzavíracímu tlaku plicního řečiště, který odráží síly proti kolapsu středního kolapsibilního segmentu (intravaskulární tlak) a síly uzavírající tento segment (perivaskulární tlak, intraalveolární tlak a aktivní tonus stěn cév). Druhý parametr, sklon P/Q křivky, odráží odpor zvyšujícímu se průtoku, který kladou nekolapsibilní segmenty plicní cirkulace (Permutt *et al.*, 1963). Odpor zvyšujícímu se průtoku u izolovaných perfundovaných plic je u perinatálně hypoxických potkanů snížen a akutní hypoxie zvyšuje nejen kritický uzavírací tlak jako u kontrol, ale i sklon P/Q křivky (Herget *et al.*, 1995b). Metoda dvojité okluze ukázala (Hakim *et al.*, 1982), že akutní hypoxie u perinatálně hypoxických potkanů kontrahuje nejen střední cévní segment jako u kontrol, ale i arteriální cévní segment. Vysvětlení může být, že část původně kolapsibilního řečiště ztratila schopnost kolabovat, ale neztratila schopnost reagovat na akutní hypoxii. Ztráta kolapsibility může být následkem změny ve složení cévní stěny - více vazivové tkáně či hladkého svalu (Herget *et al.*, 1995b).

Další práce analyzuje závislost tlaku na průtoku složitějším modelem (Linehan *et al.*, 1986; Linehan *et al.*, 1992). Využívá nelineární závislosti tlaku na průtoku při alveolárním tlaku nižším než tlak v plicních žilách (tzv. zona 3), kdy alveolární tlak ztrácí vliv na plicní průtok (Soohoo *et al.*, 1987). Vztah lze opět popsat dvěma parametry: odpor při průtoku blížícímu se 0 („resistance at near-zero flow“) a cévní roztažitelnost („vascular distensibility“) (Linehan *et al.*, 1992). Tato práce ukazuje, že nižší tlak v plicnici při širokém rozmezí průtoků u perinatálně hypoxických potkanů je dán vyšší cévní roztažitelností, v druhém parametru není u perinatálně hypoxických a kontrol žádný rozdíl (Hampl *et al.*, 2000). Tyto výsledky korelují s předchozí prací stejné skupiny (Herget *et al.*, 1995b). Podíl jednotlivých částí plicního řečiště na celkovém vaskulárním odporu lze zjistit pomocí okluzních metod. Na nižších perfúzních tlacích u izolovaných plic perinatálně hypoxických potkanů se podílí nižší odpor jak prekapilární tak postkapilární části plicního cévního řečiště (Hampl *et al.*, 2000). Zajímavé je, že navzdory nižším perfúzním tlakům, měli perinatálně hypoxičtí potkani vyšší bazální tonus. Po podání vazodilatační dávky nitroprusidu sodného u nich došlo narozdíl od kontrol k poklesu perfúzních tlaků (Hampl *et al.*, 2000).

Chronická HPH je méně vyjádřená u samic než u samců dospělých potkanů (Rabinovitch *et al.*, 1981). U dospělých ovcí je akutní HPV méně výrazná u samic než u samců. Tento rozdíl není u mladých pohlavně nevyzrálých ovcí a je pravděpodobně způsoben estradiolem, který oslabí reakci na akutní hypoxii u dospělých samic (Wetzel *et al.*, 1984).

Naopak změny způsobené perinatální hypoxií jsou více vyjádřené u samic. Perinatálně hypoxické samice mají v dospělosti hypertrofii pravé komory, která není u perinatálně hypoxických samců. Pokud jsou tyto samice kastrovány v novorozeneckém období, mají plicní hypertenzi. Znamená to tedy, že funkční vaječníky chrání nejen před HPH, ale i před dlouhodobými následky perinatální hypoxie. Bez funkce vaječníků je plicní cirkulace mnohem více vnímavá k dlouhodobým následkům perinatální hypoxie. Vzhledem k protektivní funkci ženských pohlavních hormonů, zvláště estrogeneru na cirkulaci obecně (Dubey *et al.*, 2001; Mendelsohn *et al.*, 1999), včetně plicních cév (Parker *et al.*, 2001; Parker *et al.*, 2000), se lze domnívat, že právě estrogen má tento efekt. Důležité je, že vaječníky musí být funkční v průběhu postnatálního vývoje plicního řečiště. Pokud dojde ke kastraci až v dospělosti, zmiňovaný efekt nenastane (Hampl *et al.*, 2003). Větší vnímavost samicího plicního řečiště k dlouhodobým následkům perinatální hypoxie, může souviset s tím, že primární plicní hypertenze, závažné a často fatální onemocnění, se častěji vyskytuje u žen v reprodukčním věku (Gaine *et al.*, 1998; Rubin, 1997).

Sartori ukázal, že perinatální hypoxie ovlivňuje reaktivitu na hypoxii v dospělosti i u lidí (Sartori *et al.*, 1999). Pacienti se známkami HPH v prvním týdnu života, se známkami pravolevého zkratu bez strukturální srdeční vady byli v dospělosti (průměrný věk 21 let) vyšetřeni v normální nadmořské výšce a po 3-denním pobytu ve vysoké nadmořské výšce echokardiograficky k stanovení tlaku v plicnici. U pacientů s novorozeneckou plicní hypertenzí došlo k výraznějšímu nárůstu tlaku v plicnici ve vysoké nadmořské výšce než u kontrolních pacientů. V nízké nadmořské výšce se tlak v plicnici nelišil (Sartori *et al.*, 1999). Výsledky ukazují, že přechodný perinatální inzult má dlouhodobé následky a zvyšuje riziko rozvoje plicní hypertenze v dospělosti.

Perinatálně hypoxické plicní cévy reagují odlišně i na jiné vazokonstrikční podněty. Izolované perfundované plíce laboratorního potkana jsou hyporeaktivní k angiotensinu II (Hampl *et al.*, 2000). Perinatální hypoxie snižuje reaktivitu izolovaných plicních cév na KCl a $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Jones *et al.*, 2004).

Mechanismy odlišné reaktivity perinatálně hypoxického plicního řečiště nejsou jasné. Mechanismy určující reaktivitu plicního cévního řečiště se v průběhu ontogenetického vývoje mění. Zatímco u plodu mají na klidový membránový potenciál klíčový vliv vápníkem řízené draselné kanály (K_{Ca}), v dospělosti převažují napěťově řízené draselné kanály (K_v) (Reeve *et al.*, 1998). Jiní autoři popisují nárůst významu RhoA/Rho kinázového systému v plicní

vazokonstrikci v postnatálním období (Cogolludo *et al.*, 2005). Perinatální hypoxie zvyšuje expresi a aktivitu K_{Ca} a K_v kanálů v plicních arteriích u dospělých myší (Marino *et al.*, 2007).

2. Cíl práce a hypotéza

Cílem práce bylo objasnit roli KCNQ kanálů v reakci plicního cévního řečiště na hypoxii. Zabývali jsme se reakcí plicních cév na akutní hypoxii (HPV), chronickou hypoxii (HPH) a na dlouhodobé následky perinatální hypoxie.

V první části jsme se zabývali rolí KCNQ kanálů při HPV. Na izolovaných plicích perfundovaných solným roztokem jsme testovali hypotézu, zda selektivní KCNQ blokátor linopirdin ovlivní reaktivitu plicních cév na akutní ventilační hypoxii (priming), dále jsme zkoumali efekt linopirdinu na již vyvolanou HPV a porovnávali jsme působení linopirdinu s neselektivním Kv blokátorem 4-aminopyridinem (4-AP).

V druhé části jsem se zabývali aktivitou KCNQ kanálů v časných fázích rozvoje HPH. Pro rozvoj HPH je klíčový první týden expozice hypoxii, proto jsme zkoumali vlastnosti plicního cévního řečiště po 3-5 denní expozici hypoxii. Testovali jsme efekt akutního podání linopirdinu a selektivního KCNQ aktivátoru flupirtinu na odpor zvyšujícímu se průtoku měřený jako sklon P/Q křivky. Dále jsme testovali hypotézu, zda podávání flupirtinu během expozice hypoxii zabrání rozvoji HPH. Měřili jsme i expresi KCNQ mRNA a Kv7.4 proteinu v hypoxických plicních cévách.

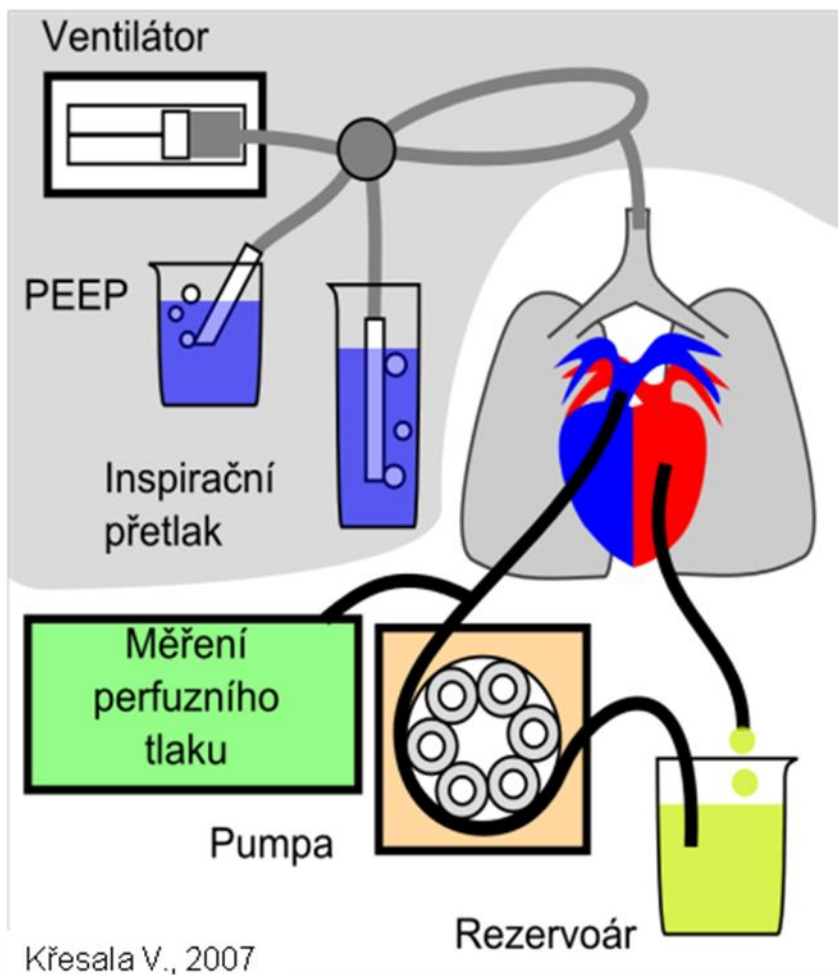
Ve třetí části jsem se zabývali KCNQ kanály v plicích exponovaných hypoxii v perinatálním období. Testovali jsme hypotézu, že citlivost perinatálně hypoxických plicních cév k linopirdinu je odlišná. Dále jsme se zabývali vazokonstrikcí indukovanou KCl a jejím ovlivněním linopirdinem.

3. Metody

Všechny experimenty byly schváleny Etickou komisí 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a byly prováděny podle mezinárodních doporučení, jak zacházet s laboratorními zvířaty. Pokusy byly prováděny na laboratorních potkanech kmene Wistar z chovu firmy Biotech Konárovice.

3.1. Izolované perfundované plíce

Měření byla prováděna na preparátu izolovaných perfundovaných plic popsaném dříve (Obr. 3.1.) (Herget *et al.*, 1995a). Po anestezii thiopentalem sodným (50 mg/kg intraperitoneálně) jsme zavedli ventilační kanylu do trachey a plíce jsme ventilovali přetlakem 10 cm H₂O, tlak na konci výdechu (PEEP) 2 cm H₂O, frekvence 50 dechů za minutu. Hrudník jsme otevřeli rozříznutím sternu a podali heparin do pravé komory. Vtokovou kanylu jsem zavedli do plicnice a výtokovou do levé srdeční komory po rozrušení mitrální chlopně. Blok srdce-plíce byl vyjmut z hrudníku a umístěn do vyhřívané (37°C) a vlhčené komůrky. Plíce byly ventilovány normoxickou směsí plynů (21% O₂, 5% CO₂, 74% N₂) a perfundovány fyziologickým roztokem s albuminem (4 g/100 ml perfuzátu). Fyziologický roztok obsahoval (v mmol/l): 119 NaCl, 4,7 KCl, 1,16 MgSO₄, 17 NaHCO₃, 1,18 KH₂PO₄, 3,2 CaCl₂ a 5,5 d-glukosy. Do perfuzátu jsem přidali inhibitor NO syntázy L-NAME (nitro-L-arginine-methyl-ester, 50 μmol/l) a inhibitor cyklooxygenázy meklofenamát (17 μmol/l). I když meklofenamát aktivuje neuronální KCNQ 2/3 kanály (Peretz *et al.*, 2005), nemá efekt na vazokonstrikci indukovanou analogem linopirdinu XE991 (Yeung *et al.*, 2007). Předpokládali jsme, že meklofenamát nebude ovlivňovat vazokonstrikci způsobenou KCNQ blokátorem linopirdinem v izolovaných plicích. Naopak protože meklofenamát dilatuje izolované cévy, pravděpodobně díky aktivaci Kv7 kanálů (Yeung *et al.*, 2007), při testování efektu KCNQ aktivátoru flupirtinu nebyl meklofenamát přidán do perfuzátu. Plíce byly perfundovány konstantním průtokem 4 ml/min na 100 g hmotnosti zvířete. Kontinuálně jsme zaznamenávali perfúzní tlak v plicnici. Při konstantním průtoku změny perfúzního tlaku odpovídaly změnám plicní cévní resistance.



Obr. 3.1. - Schéma izolovaných perfundovaných plic.

Experiment 1A – priming HPV linopirdinem

K reakci izolovaných plic perfundovaných solným roztokem na hypoxii je nezbytná prestimulace či priming různými vazokonstrikčními stimuly (Herget *et al.*, 2011; Herget *et al.*, 1987; McMurtry, 1984). Mechanismus zodpovědný za priming není znám, ale reaktivitu izolovaných plic lze navodit neselektivním blokátorem Kv kanálů 4-AP (Hasunuma *et al.*, 1991). V prvním pokusu jsme testovali schopnost selektivního KCNQ blokátoru linopirdinu indukovat HPV v izolovaných plicích perfundovaných solným roztokem. Na začátku experimentu byl do vtokové kanyly podán bolus 230 μg linopirdinu (tím získaná koncentrace 12 $\mu\text{mol/l}$ v perfuzátu). Tato koncentrace inhibuje KCNQ kanály (Robbins, 2001), kontrahuje izolované plicní arterie (Joshi *et al.*, 2006), a má malý efekt na jiné iontové kanály (Lamas *et*

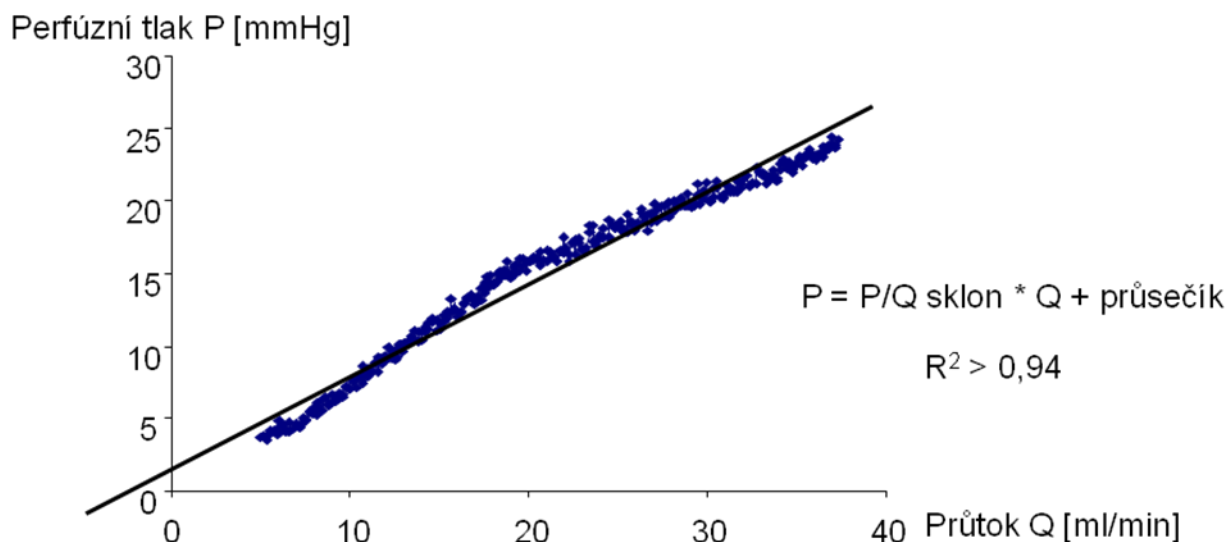
al., 1997; Wang *et al.*, 1998). 15, 30 a 65 minut po podání linopirdinu jsme plíce (n=6) ventilovali hypoxickou směsí plynů (0% O₂, 5% CO₂, 95% N₂) a velikost HPV porovnali s kontrolními plícemi ve shodných časových intervalech, kde ale nepředcházelo podání linopirdinu (n=5).

Experiment 1B – HPV po linopirdinu a 4-AP

V druhém pokusu jsme srovnávali HPV po akutním podání KCNQ blokátoru linopirdinu a po následném přidání neselektivního Kv blokátoru 4-AP do perfuzátu. Po 15 minutové stabilizaci jsme nejprve navodili reaktivitu plic dvěma cykly angiotensin II - hypoxie (podání angiotensinu II [ANG II] 0,2 µg do vtokové kanyly, ventilace hypoxickou směsí plynů [0% O₂, 5% CO₂, 95% N₂] do dosažení maximální vazokonstrikce cca 7 minut). U první skupiny plic (n=6) jsme podali linopirdin k dosažení koncentrace 12 µmol/l v perfuzátu a po 10 minutové stabilizaci jsme opakovali podání ANG II a ventilaci hypoxií. U druhé skupiny (n=6) jsme po podání stejného množství linopirdinu a stejně dlouhé stabilizaci přidali 4-AP k dosažení koncentrace 3 mmol/l v perfuzátu. Po 10 minutách jsme plíce vystavili opět ANG II a hypoxii. Změny v perfúzním tlaku jsme srovnávali před a po podání pouze linopirdinu či po podání linopirdinu s 4-AP a odpovídající odpovědi mezi oběma skupinami.

3.2. Expozice chronické hypoxii

V dalších experimentech jsme laboratorní potkany vystavili chronické hypoxii. Zvířata byla umístěna do normobarické hypoxické komory (FiO₂ 0,1) na dobu 3-5 dnů. HPH je plně rozvinuta po 1-2 týdnech expozice hypoxii, ale pro rozvoj HPH je prvních několik dnů nejdůležitější (Lachmanova *et al.*, 2005). Preparát izolovaných perfundovaných plic byl vytvořen jak popsáno výše. Vlastnosti plicního cévního řečiště jsme hodnotili podle závislosti perfúzního tlaku na průtoku (P/Q křivka) (Obr. 3.2.).



Obr. 3.2. – Závislost tlaku P na průtoku Q.

Kolem klidových hodnot průtoku je P/Q křivka lineární, lze tedy popsat dvěma parametry. Průsečík s tlakovou osou, který vznikne extrapolací přímky k nulovému průtoku, odpovídá střednímu kritickému uzavíracímu tlaku a sklon P/Q přímky, který odpovídá odporu zvyšujícímu se průtoku (Permutt *et al.*, 1963; Soohoo *et al.*, 1987). Protože perfúzní tlak je ovlivněn alveolárním tlakem, při měření závislosti P/Q plíce nebyly ventilovány a alveolární tlak byl konstantně 2 cm H₂O (PEEP). Nejprve byla zastavena perfúzní pumpa, poté byl zvyšován průtok na cca 150 % normálního klidového průtoku.

Experiment 2A – akutní podání linopirdinu u chronické hypoxie

V tomto experimentu jsem testovali efekt akutního podání selektivního KCNQ blokátoru linopirdinu u potkanů vystavených 3-denní hypoxii. Po 15 minutové stabilizaci jsme nejprve navodili reaktivitu plic dvěma cykly ANG II - hypoxie. Poté jsem zastavili perfúzní pumpu a postupně zvyšovali průtok na cca 150 % klidových hodnot, perfúzní tlak byl zaznamenáván kontinuálně. Pak jsme přidali do perfuzátu linopirdin na koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ a po 10 minutové stabilizaci jsme opět provedli měření závislosti tlaku na průtoku. Stejnému protokolu jsme podrobili plíce z potkanů po 3 dnech strávených v hypoxii (n=6) a kontrolní skupinu (n=6). Porovnali jsme P/Q křivku před a po podání linopirdinu u

kontrolních a hypoxických potkanů.

Experiment 2B – akutní podání flupirtinu u chronické hypoxie

Při dalším pokusu jsme testovali efekt akutního podání KCNQ aktivátoru flupirtinu na P/Q závislost u potkanů vystavených 5-denní hypoxii. Pokus byl proveden na izolovaných plicích potkanů vystavených 5-denní hypoxii a u kontrolní skupiny bez expozice hypoxii. Měření P/Q bylo provedeno stejně jako v předchozím pokusu po navození reaktivity izolovaných plic dvěma cykly ANG II - hypoxie. U poloviny potkanů z každé skupiny byl do perfuzátu přidán flupirtin na cílovou koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$ a měření P/Q bylo provedeno po 10 minutové stabilizaci. Při této koncentraci flupirtin aktivuje Kv7 kanály a má minimální efekt na jiné iontové kanály (Klinger *et al.*, 2012). P/Q křivky byly porovnávány u 4 skupin potkanů (n=5 pro každou skupinu).

Experiment 2C – léčba flupirtinem v průběhu chronické hypoxie, měření NOx

V tomto experimentu jsme testovali, zda podávání KCNQ aktivátoru flupirtinu v průběhu expozice hypoxii zabrání rozvoji plicní hypertenze. Potkani byli rozděleni do 4 skupin: 1. hypoxie (n=6) – expozice 5-denní hypoxii (FiO_2 0,1), 2. hypoxie + flupirtin (n=6) – potkanům v průběhu pobytu v hypoxické komoře podáván flupirtin gaváží v dávce 15 mg/kg 2 x denně, flupirtin byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO), 3. hypoxie + DMSO (n=6) – potkanům v průběhu pobytu v hypoxické komoře podáváno pouze rozpouštědlo DMSO ve stejném objemu jako u skupiny číslo 2, 4. normoxie (n=6) – kontrolní skupina bez expozice hypoxii.

Při tomto experimentu jsme před zavedením kanylu k perfúzi plic odebrali z levé komory krev k analýze NO a jeho oxidačních produktů (nitrity a nitráty, NOx). Krev byla centrifugována (3 minuty, 5 000 otáček/minutu), oddělená plasma ihned zmrazena na -70°C . Koncentraci NOx v plasmě jsme měřili pomocí chemiluminiscenčního analyzátoru (Sievers model 280i) metodou popsanou dříve (Isaacson *et al.*, 1994).

Pak byl připraven preparát izolovaných perfundovaných plic jako v předchozích experimentech. Po úvodní stabilizaci, dvou cyklech ANG II - hypoxie jsme měřili závislost perfúzního tlaku na kontinuálně zvyšujícím průtoku (P/Q). Vztahem byla proložena přímka a její parametry (sklon a průsečík s tlakovou osou) byly hodnoceny odděleně. Dále jsme porovnávali vazokonstrikci způsobenou ANG II a HPV před měřením P/Q závislosti.

Experiment 2D – exprese KCNQ mRNA (RT-qPCR) u chronické hypoxie

V tomto experimentu jsme měřili množství mRNA kódující kanály KCNQ 1, 4 a 5 u potkanů vystavených 3-denní hypoxii (FiO_2 0,1, $n=3$) a kontrolní normoxické skupiny ($n=3$). Pobyt v normobarické hypoxické komoře probíhal v Praze, kde byly izolovány intrapulmonální arterie, analýzu mRNA prováděla Dr. S. Joshi v Manchesteru, Velká Británie. RNA z intrapulmonálních arterií byla extrahována pomocí RNeasy Micro Kit (Qiagen). Měření bylo provedeno pomocí real-time kvantitativní PCR na cDNA syntetizované z RNA po předchozí reakci s DNázou. Primery byly navrženy pomocí Gene Runner softwaru (verze 3, Hastings software) a Vector NTI (Invitrogen) pro KCNQ 1, 4 a 5 pomocí sekvencí z GenBank s přístupovými čísly NM_032073, XM_233477 a XM_237012. Sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 1 v publikaci v příloze (Sedivy *et al.*, 2015). Reakce probíhaly ve vzorku o objemu 25 μl obsahujícím 1 μl cDNA, 12,5 μl SYBR Green master mix, 10 μl H_2O a 7,5 pmol každého primeru pomocí přístroje Applied Biosystems 7500 PCR podle doporučení výrobce. Amplikony byly 77-106 bp dlouhé. Parametry PCR reakce byly nastaveny na 95°C 15 min, dále 40 cyklů při 95°C po 1 minutě, pak 58°C na 40 vteřin a 68°C na dalších 40 vteřin. Výsledná data byla hodnocena pomocí ABI 7500 softwaru. Úroveň exprese byla vztažena k housekeeping genu glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáze (GAPDH) měřené současně ve stejném vzorku. Exprese mRNA KCNQ 1, 4 a 5 byla vyjádřena jako podíl mRNA KCNQx/GAPDH u hypoxických a kontrolních zvířat.

Experiment 2E – exprese Kv7.4 proteinu (Western blot) u chronické hypoxie, efekt léčby flupirtinem

V tomto experimentu jsme měřili množství Kv7.4 proteinu v plicních arteriích u 3 skupin potkanů. 1. hypoxie ($n=4$) – expozice 4-denní hypoxii (FiO_2 0,1), 2. hypoxie + flupirtin ($n=4$) – potkanům 1 den před a 4 dny v průběhu pobytu v hypoxické komoře podáván flupirtin gaváží v dávce 15 mg/kg 2 x denně, 3. normoxie ($n=4$) – kontrolní skupina bez expozice hypoxii. Vlastní Western blot analýzu prováděla Doc. J. Novotná. Maximum plicních arterií z každého potkana bylo homogenizováno v RIPA pufru obsahujícím 25 mmol/l Tris HCl (pH 7,5), 150 mmol/l NaCl, 1% NP-40, 0,5% sodium deoxycholate, 1 mmol/l ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) a 1x cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Burgess Hill, Velká Británie). Vzorky byly centrifugovány 2 minuty při 1000 G a supernatant analyzován

Western blotem po předchozím určení celkové koncentrace proteinu pomocí BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Cramlington, Velká Británie). Vzorky supernatantu byly inkubovány 7 minut při 95°C s Laemmli pufrem obsahujícím 25 mmol/l Tris HCl (pH 6,8), 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 2% SDS a 0,04% bromophenol blue. Proteiny byly separovány 10% SDS-PAGE, přeneseny na Immobilon-P PVDF membránu (Millipore, Velká Británie) a třikrát promyty v Tris-buffered saline (TBS: 25 mmol/l Tris HCl, 150 mmol/l NaCl, pH 7,3) s 0,1% Tween 20 (TTBS). Membrána byla zablokována 5% sušeným mlékem v TTBS při pokojové teplotě na 1 hodinu a rozstřížena mezi 50 a 70 kDa markery. Horní část membrány byla inkubována při 4°C přes noc s myšší monoklonální protilátkou anti-Kv7.4 (katalog. # 75-082, Neuromab) rozředěnou v 1% sušeném mléce v TTBS. Spodní část membrány byla inkubována stejným způsobem, ale s protilátkou proti β -tubulinu (Sigma, Poole, Velká Británie) jako vnitřní kontrola. Po promytí byly membrány inkubovány 2 hodiny se sekundární protilátkou s navázanou křenovou peroxidázou (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA) rozředěnou v 1% sušeném mléce v TTBS. Navázané protilátky byly detekovány pomocí SuperSignal West Femto (Kv7.4) nebo Pico (β -tubulin) Chemiluminescent Substrate kits (Thermo Fisher Scientific) a ChemiDoc imaging systémem (Bio-Rad). Porovnali jsme relativní množství Kv7.4 proteinu (relativní densita Kv7.4/ β -tubulin) u 3 skupin potkanů: vystavených hypoxii, léčených flupirtinem v průběhu hypoxie a u kontrolní skupiny.

3.3. Perinatální hypoxie

V dalších experimentech jsme testovali reaktivitu plicních cév u perinatálně hypoxických potkanů. Potkani v pokusných skupinách byly vystaveny chronické hypoxii v období kolem porodu. Březí samice byly 1 týden před očekávaným porodem umístěny do normobarické hypoxické komory, kde FiO_2 bylo 0,12. Porod proběhl v hypoxických podmínkách a mladí potkani strávili v hypoxii ještě první týden života, byli tedy celkem vystaveni 2-týdenní perinatální hypoxii (Hampl *et al.*, 1990). Měření probíhalo po dosažení dospělosti ve věku 20 týdnů. K pokusné skupině jsme měli kontrolní normoxickou, která zahrnovala stejně staré potkany, kteří strávili celý svůj život v normoxických podmínkách. Na změny v reaktivitě plicního cévního řečiště navozené perinatální hypoxií má vliv pohlaví,

proto byli potkani v obou skupinách rozděleni na samce a samice (Hampl *et al.*, 2003). Měření probíhalo na preparátu izolovaných plic perfundovaných solným roztokem jako u předchozích experimentů.

Experiment 3A – akutní podání linopirdinu u perinatální hypoxie

V tomto experimentu jsme testovali efekt akutního podání KCNQ blokátoru linopirdinu u perinatálně hypoxických potkanů. Reaktivita plic byla navozena dvěma cykly ANG II - hypoxie jako v předchozích experimentech. Poté byl do perfuzátu přidáván linopirdin ve stoupající koncentraci (0,5 – 16 $\mu\text{mol/l}$) a kontinuálně zaznamenáván tlak. Při konstantním průtoku zvýšení perfúzního tlaku odpovídá vazokonstrikci plicního cévního řečiště. Měření bylo provedeno u potkanů vystavených perinatální hypoxii (4 samci a 4 samice) a kontrolních potkanů (6 samců a 6 samic).

Experiment 3B – vazokonstrikce indukovaná KCl, efekt linopirdinu

V dalším experimentu jsme testovali reakci izolovaných plic na zvyšující koncentraci K^+ . Reaktivita plic byla navozena dvěma cykly ANG II - hypoxie, poté jsme přidávali do perfuzátu KCl ve stoupající koncentraci (2,5 – 12,5 mmol/l) a kontinuálně zaznamenávali perfúzní tlak. Při konstantním průtoku zvýšení perfúzního tlaku odpovídá vazokonstrikci. Měření bylo provedeno u perinatálně hypoxických potkanů (5 samců a 6 samic) a u normoxických kontrol (7 samců a 7 samic). Pro objasnění role aktivity KCNQ kanálů jsme KCl indukovanou vazokonstrikci testovali i u plic po podání KCNQ blokátoru linopirdinu v koncentraci 3 $\mu\text{mol/l}$. Dose-response křivky na KCl (2,5 – 12,5 mmol/l) jsme porovnávali u perinatálně hypoxických potkanů (6 samců a 6 samic) a normoxických kontrol (6 samců a 5 samic).

3.4. Statistické zpracování dat

Všechny výsledky jsou uváděny jako průměr \pm standardní chyba průměru (SEM). Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí programu StatView 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, USA) s použitím párového t-testu, ANOVA nebo ANOVA pro opakovaná měření s Fisherovým PLSD post hoc testem dle hodnocených dat. Rozdíly byly považovány za

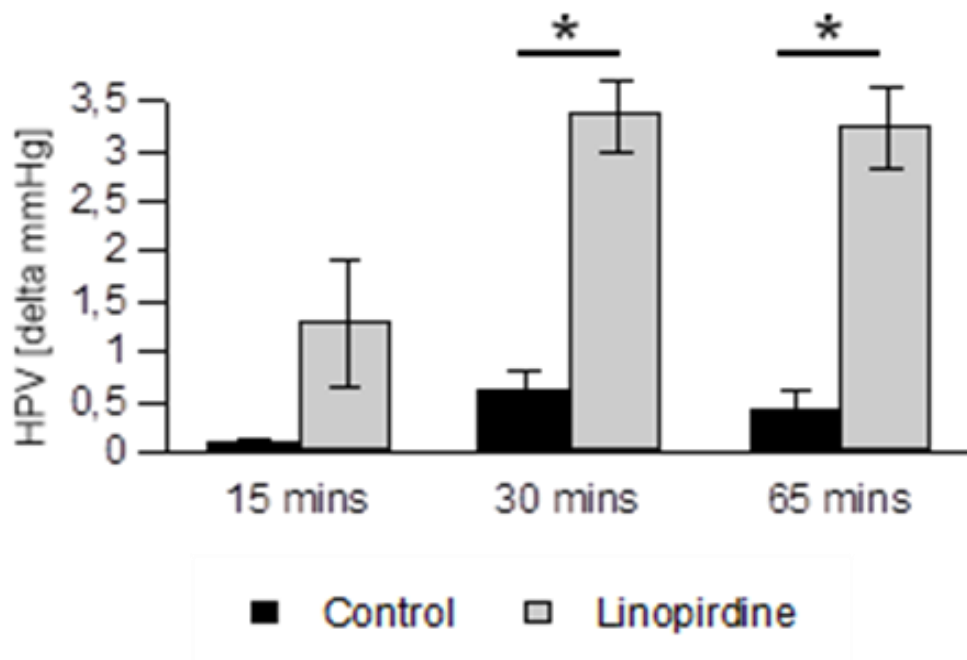
statisticky významné při $p < 0,05$.

4. Výsledky

4.1. Akutní hypoxie – výsledky

Experiment 1A – priming HPV linopirdinem

Bazální perfúzní tlak se v celém průběhu experimentu mezi oběma skupinami nelišil. Po 15 minutách perfúze byl $10 \pm 1,5$ mmHg u kontrolní skupiny a $8,1 \pm 0,57$ mmHg u skupiny, kde byl na začátku podán linopirdin, za 30 minut $9 \pm 1,1$ mmHg u kontrol a $7,89 \pm 0,46$ mmHg u skupiny primované linopirdinem, za 65 minut $9 \pm 1,1$ mmHg vs. $8 \pm 0,52$ mmHg. Bez předchozího primingu tedy linopirdin nezpůsobuje vazokonstrikci. U kontrolní skupiny, kde nebyl žádný priming, byla velmi malá odpověď na hypoxii, na rozdíl od skupiny s linopirdinem, kde ventilace hypoxickou směsí způsobila vazokonstrikci, která byla po 30 a 65 minutách asi 7 x větší než u kontrolní skupiny (Obr. 4.1.).



Obr. 4.1. Priming hypoxické plicní vazokonstrikce (HPV) linopirdinem v izolovaných plicích perfundovaných solným roztokem. HPV po 15, 30 a 65 minutách perfúze u kontrolních plic (bez primingu, černé, n=5) a plic, kde na začátku perfúze byl podán bolus linopirdinu 230 μ g

(odpovídá koncentraci cca 12 $\mu\text{mol/l}$ v perfuzátu) (šedé, n=6). *p < 0,05.

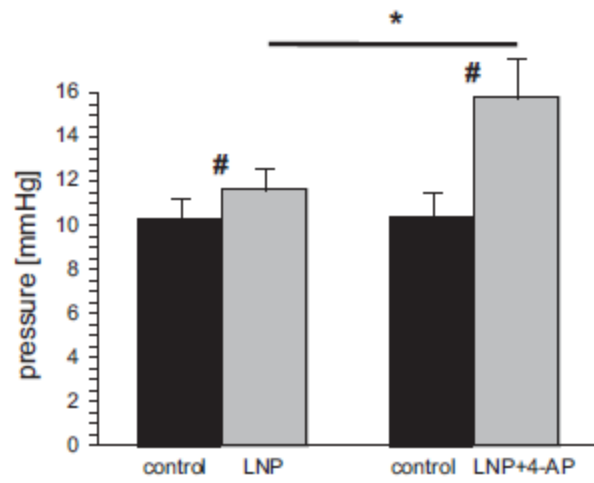
Experiment 1B – HPV po linopirdinu a 4-AP

Bazální perfúzní tlak, reakce na ANG II a HPV se před podáním blokátorů Kv kanálů mezi oběma skupinami nelišily. Podání linopirdinu (12 $\mu\text{mol/l}$) způsobilo u obou skupin vzestup perfúzního tlaku. Vazokonstrikce vyvolaná linopirdinem se mezi skupinami nelišila: $1,4 \pm 0,24$ mmHg u skupiny pouze s linopirdinem (n=6) vs. $2,0 \pm 0,7$ mmHg u skupiny, kde byl později přidán 4-AP (n=6). Linopirdin v izolovaných plicích perfundovaných solným roztokem, pokud je navozena jejich reaktivita - priming (zde 2 cykly ANG II - hypoxie) způsobuje vazokonstrikci. Přidání 4-AP do perfuzátu (3 mmol/l) u druhé skupiny způsobilo další nárůst tlaku o $4,3 \pm 0,37$ mmHg (Obr. 4.2.A).

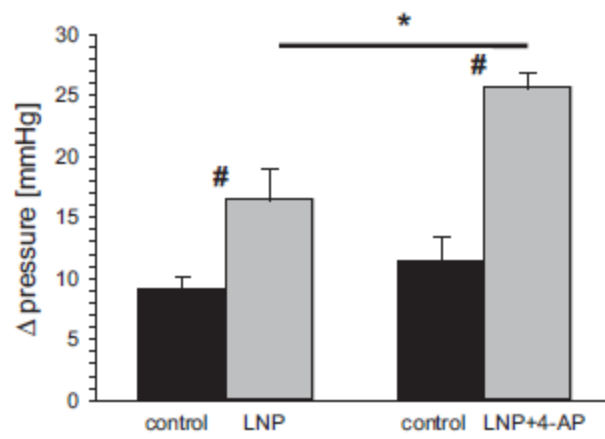
Vazokonstrikce způsobená ANG II byla potencována linopirdinem a dále ještě zvýšena, pokud byl k linopirdinu přidán 4-AP (Obr. 4.2.B). Naproti tomu HPV byla sice potencována linopirdinem, ale v druhé skupině, kde byl v perfuzátu i 4-AP k dalšímu zvýšení již nedošlo (Obr. 4.2.C). Linopirdin zvýšil HPV u první skupiny z 14 ± 3 mmHg na 26 ± 4 mmHg (p < 0,05), u druhé skupiny linopirdin spolu s 4-AP potencoval HPV z 15 ± 4 mmHg na 23 ± 4 (p < 0,05), což není odlišné od zvýšení pouze linopirdinem u první skupiny.

Obr. 4.2. (na následující stránce). Ovlivnění plicní cévní reaktivity blokátory Kv kanálů. Bazální tlak (A), angiotensinem II indukovaná vazokonstrikce (B) a hypoxická plicní vazokonstrikce (C) u plic před podáním Kv blokátorů (kontrolní černé sloupce) a po podání 12 $\mu\text{mol/l}$ linopirdinu (LNP) nebo 12 $\mu\text{mol/l}$ linopirdinu plus 3 mmol/l 4-aminopyridinu (LNP+4-AP) (šedé sloupce). # p < 0,05 kontroly vs. LNP nebo LNP+4-AP, * p < 0,05 LNP vs LNP+4-AP, n=6 pro obě skupiny, NS není signifikantní.

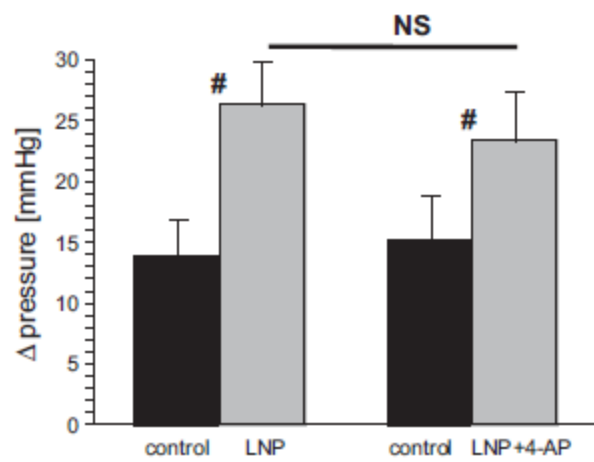
A baseline pressure



B angiotensin II induced contraction



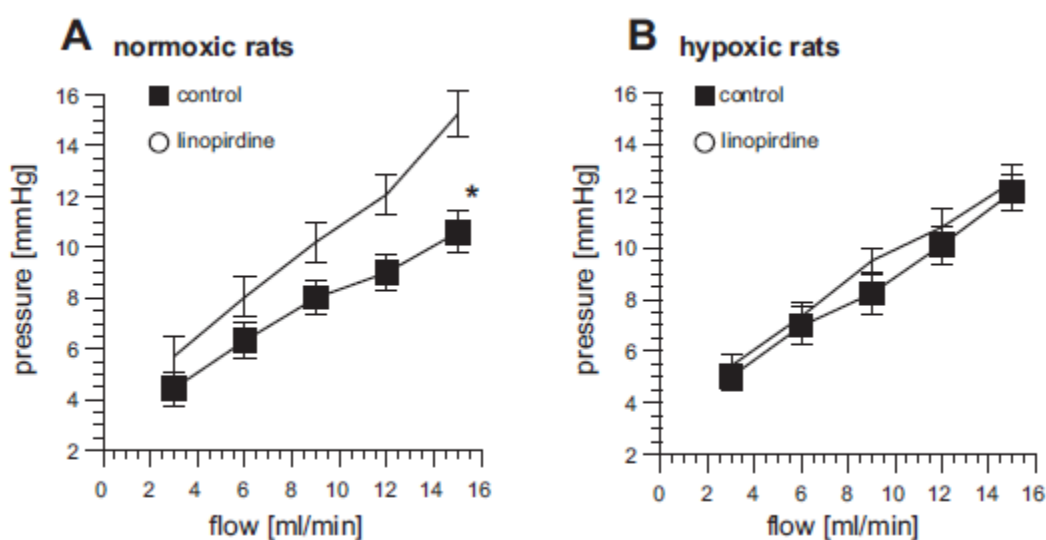
C hypoxic pulmonary vasoconstriction



4.2. Chronická hypoxie – výsledky

Experiment 2A – akutní podání linopirdinu u chronické hypoxie

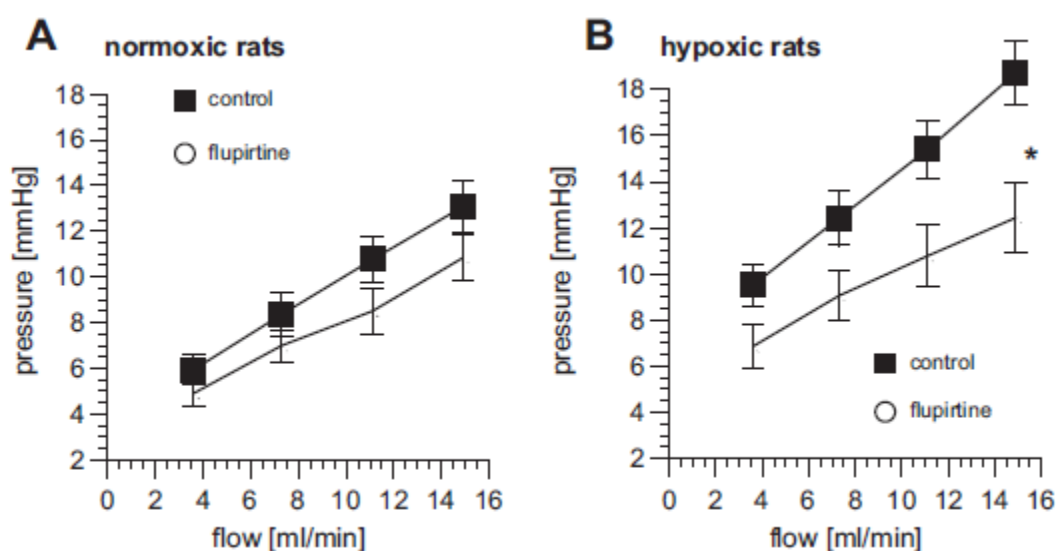
Závislost tlaku na zvyšujícím průtoku (P/Q) byla u potkanů vystavených hypoxii i kontrolních normoxických lineární ($R^2 > 0,94$). P/Q závislost u potkanů vystavených 3-denní hypoxii ($n=6$) a normoxických kontrol ($n=6$) se nelišila (Obr. 4.3. normoxické kontroly panel A vs. hypoxické kontroly panel B). Podání linopirdinu ($10 \mu\text{mol/l}$) u normoxických potkanů vedlo ke zvýšení perfúzního tlaku, na rozdíl od potkanů vystavených hypoxii, kde podání linopirdinu nemělo žádný efekt. Rozdíl je patrný v hodnocení P/Q křivek, kdy u P/Q závislosti u normoxických potkanů došlo k signifikantnímu posunu P/Q křivky po podání linopirdinu (Obr. 4.3. A), zatímco u hypoxických potkanů stejná koncentrace linopirdinu neměla žádný efekt (Obr. 4.3. B). U normoxických potkanů linopirdin zvýšil sklon P/Q přímky z $0,49 \pm 0,01$ na $0,81 \pm 0,08 \text{ mmHg} \cdot \text{min/ml}$ ($p < 0,05$) a neovlivnil průsečík s tlakovou osou. U hypoxických potkanů linopirdin neovlivnil sklon ani průsečík P/Q přímky.



Obr. 4.3. Linopirdin nekontrahuje plicní cévy u hypoxických potkanů. P/Q křivky u normoxických kontrol (A) a potkanů vystavených 3-denní hypoxii (B) před (kontroly, černé čtverce) a po podání linopirdinu ($10 \mu\text{mol/l}$). * $p < 0,05$ linopirdin vs. kontroly před jeho podáním; $n=6$ pro obě skupiny.

Experiment 2B – akutní podání flupirtinu u chronické hypoxie

Opačný efekt než v předchozím pokusu mělo podání KCNQ aktivátoru flupirtinu. Flupirtin (20 $\mu\text{mol/l}$) neměl žádný efekt u normoxických potkanů, ale způsobil vazodilataci u potkanů vystavených 5-denní hypoxii. P/Q závislost u hypoxických potkanů po podání flupirtinu byla signifikantně nižší než u skupiny bez podání flupirtinu (Obr. 4.4. B). Sklon P/Q přímky poklesl z $0,75 \pm 0,07 \text{ mmHg} \cdot \text{min/ml}$ na $0,49 \pm 0,05 \text{ mmHg} \cdot \text{min/ml}$ po podání flupirtinu ($p < 0,05$), průsečík s tlakovou osou zůstal stejný. U normoxických potkanů neměl flupirtin na sklon ani průsečík žádný vliv (Obr. 4.4. A).



Obr. 4.4. Flupirtin dilatuje plicní cévy u hypoxických potkanů. Efekt flupirtinu (20 $\mu\text{mol/l}$) na P/Q křivky u normoxických kontrol (A) a potkanů vystavených 5-denní hypoxii (B).

* $p < 0,05$ flupirtin vs. kontroly; $n=5$ pro každou skupinu.

Experiment 2C – léčba flupirtinem v průběhu chronické hypoxie, měření NOx

Výsledky experimentu, kdy byli potkani v průběhu expozice 5-denní hypoxii léčeni flupirtinem (30 mg/kg/den) shrnuje tabulka 4.1. Potkani po 5 dnech v hypoxickém prostředí měli signifikantně vyšší sklon P/Q přímky. Léčba flupirtinem v průběhu expozice hypoxii zamezila zvýšení P/Q sklonu, zatímco podávání samotného rozpouštědla (DMSO) takový efekt nemělo. Průsečík s tlakovou osou se u jednotlivých skupin nelišil, ale je patrná tendence

k vyšší hodnotě u potkanů léčených v průběhu hypoxie flupirtinem. Dále byla hodnocena reaktivita plicních cév na ANG II a ventilační hypoxii (HPV). Potkani vystaveni hypoxii měli větší HPV než normoxické kontroly, tomuto zvýšení zabránilo podávání flupirtinu, nikoliv pouze DMSO. Efekt byl selektivní k HPV, protože vazokonstrikce indukovaná ANG II byla potencována ve všech hypoxických skupinách bez ohledu na léčbu.

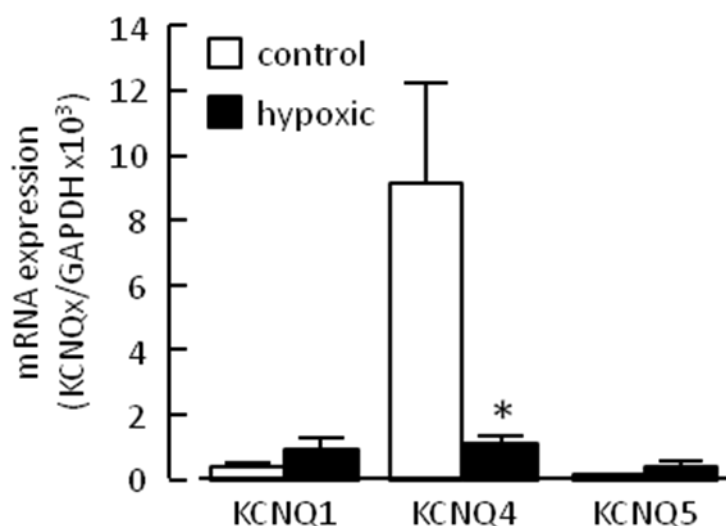
Kv7 aktivátory dilatují plicní arterie přímo působením na hladký sval (Joshi *et al.*, 2009). Aktivátory K_{ATP} kanálů hyperpolarizují hladký sval, dilatují pulmonální arterie a inhibují HPH (Clapp *et al.*, 1992; Oka *et al.*, 1993). Nedávné studie soudí, že efekt aktivátorů K_{ATP} kanálů při HPH je přes endoteliální K_{ATP} kanály, které obnovují produkci NO (Zong *et al.*, 2012). Důvod pro měření NO_x byl objasnit, zda flupirtin neovlivňuje produkci NO během chronické hypoxie. Tabulka 4.1. ukazuje, že koncentrace NO_x byla zvýšená u všech hypoxických potkanů a nebyla ovlivněna léčbou flupirtinem.

Skupina	P/Q sklon [mmHg*min/ml]	P/Q průsečík [mmHg]	HPV [Δ mmHg]	ANG II kontrakce [Δ mmHg]	NO _x v plasmě [μM]
Normoxie	0.541±0.052	3.6±0.7	5.3±1.0	5.6±0.6	26.0±2.5
Hypoxie	0.672±0.05 *	3.7±0.4	8.5±1.1 *	9.3±1.3 *	46.6±8.3 *
Hypoxie + Flupirtin	0.475±0.022 #	5.3±0.5	4.9±1.0 #	11.7±1.4 *	47.5±2.6 *
Hypoxie + DMSO	0.678±0.111 *	3.6±1.1	9.6±1.4 *	9.0±0.8 *	40.0±2.5 *

Tab. 4.1. Parametry P/Q přímky (sklon a průsečík s tlakovou osou), hypoxická plicní vazokonstrikce (HPV), angiotensinem II (ANG II) indukovaná vazokonstrikce a koncentrace oxidačních produktů NO (nitrity, nitráty, NO_x) v plasmě u potkanů vystavených 5-denní hypoxii (Hypoxie), léčených v průběhu hypoxie flupirtinem (30 mg/kg/den) (Hypoxie + Flupirtin), léčených pouze rozpouštědlem DMSO (Hypoxie + DMSO) a kontrolní normoxické skupiny (Normoxie). *p < 0,05 vs. Normoxie, # p < 0,05 vs. Hypoxie a Hypoxie + DMSO; n=6 pro všechny skupiny.

Experiment 2D – exprese KCNQ mRNA (RT-qPCR) u chronické hypoxie

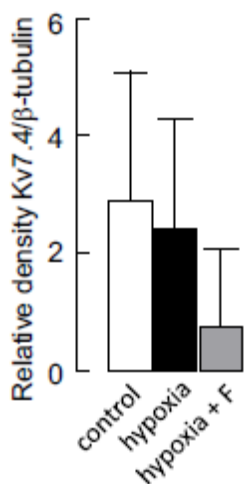
Obrázek 4.5. ukazuje relativní exprese KCNQ 1, KCNQ 4 a KCNQ 5 mRNA v plicních arteriích u potkanů vystavených 3-denní hypoxii a normoxických kontrol. U KCNQ 1 a KCNQ 5 mRNA nebyl patrný v expresi žádný rozdíl, ale hypoxie významně snížila množství KCNQ 4 mRNA v plicních arteriích.



Obr. 4.5. Expresní profil mRNA KCNQ 1, KCNQ 4 a KCNQ 5 podjednotek v plicních arteriích u potkanů vystavených 3-denní hypoxii a normoxických kontrol. Detekce pomocí RT-qPCR a vztaženo na expresi GAPDH. * $p < 0,05$ hypoxie vs. kontroly; $n=3$ pro obě skupiny.

Experiment 2E – exprese Kv7.4 proteinu (Western blot) u chronické hypoxie, efekt léčby flupirtinem

Obrázek 4.6. ukazuje expresi Kv7.4 proteinu v plicních arteriích u potkanů vystavených 4-denní hypoxii, kontrolní skupiny a potkanů léčených v průběhu expozice flupirtinem. Densitometrická analýza proužků proteinů neukázala významný rozdíl v množství Kv7.4 proteinu (vztaženo k β -tubulinu) mezi jednotlivými skupinami.

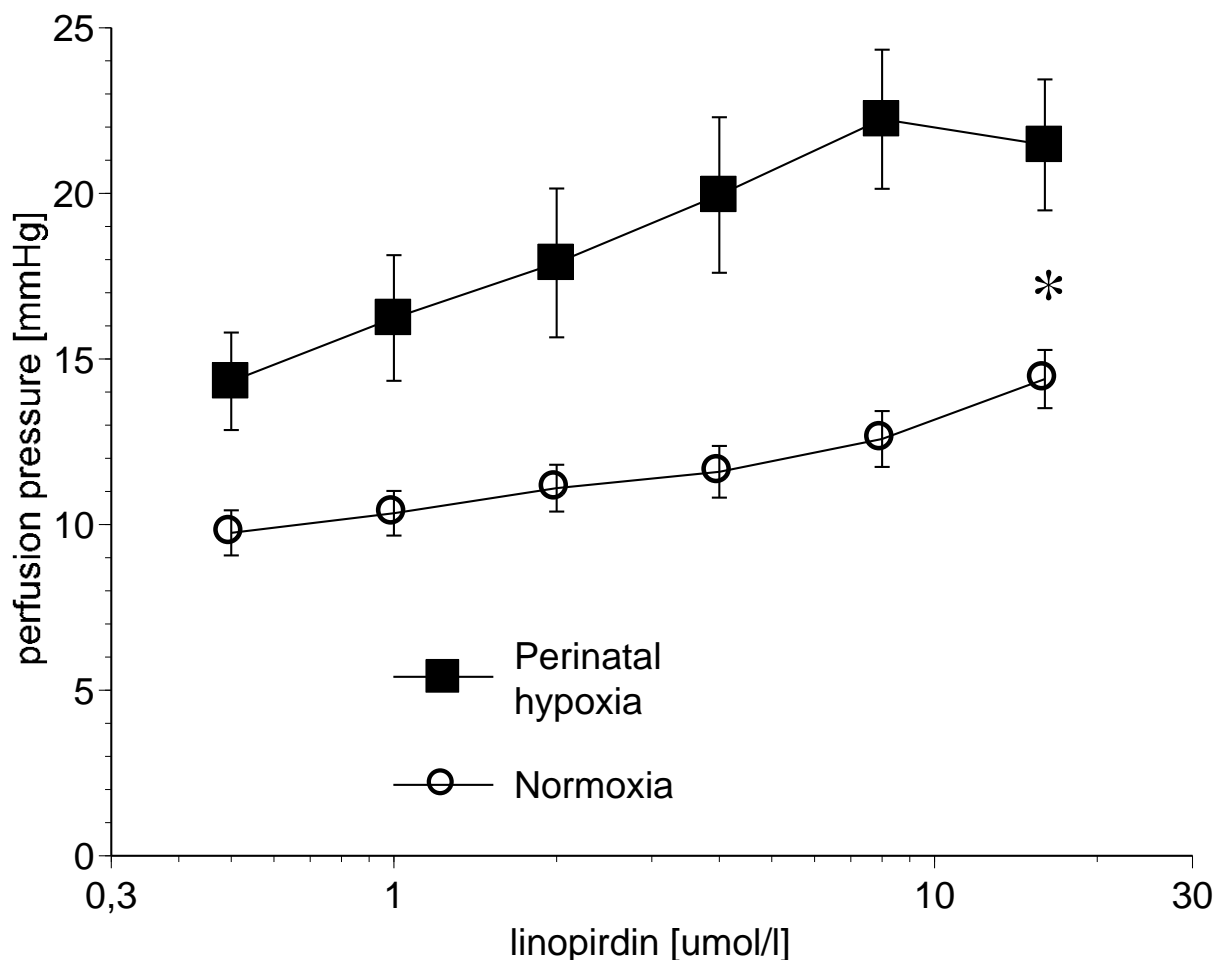


Obr. 4.6. Densitometrická analýza Western blotu Kv7.4 proteinu vztaženého k β -tubulinu kontrolní skupiny, potkanů vystavených 4-denní hypoxii a hypoxických potkanů léčených v průběhu hypoxie flupirtinem 30 mg/kg/den. N=4 pro všechny skupiny.

4.3. Perinatální hypoxie – výsledky

Experiment 3A – akutní podání linopirdinu u perinatální hypoxie

Perinatálně hypoxické samice (n=4) měli signifikantně vyšší bazální perfúzní tlak než normoxické kontroly (n=6): $11,5 \pm 0,8$ mmHg vs. $7,6 \pm 0,5$ mmHg ($p < 0,05$). Bazální perfúzní tlak u samců se nelišil: $11,0 \pm 1,1$ mmHg u potkanů vystavených perinatální hypoxii (n=4) vs. $9,7 \pm 0,6$ mmHg u kontrol (n=6). Reakce na linopirdin byla shodná u obou pohlaví. Potkani vystaveni perinatální hypoxii byli citlivější k linopirdinu. Vazokonstrikce způsobená maximální koncentrací linopirdinu ($16 \mu\text{mol/l}$) byla u perinatálně hypoxických potkanů (n=8) $10,2 \pm 1,6$ mmHg, zatímco u kontrol (n=12) pouze $5,0 \pm 0,8$ mmHg ($p < 0,05$). Závislost perfúzního tlaku na zvyšující koncentraci linopirdinu v perfuzátu ($0,5 - 16 \mu\text{mol/l}$) je znázorněna na obr. 4.7.

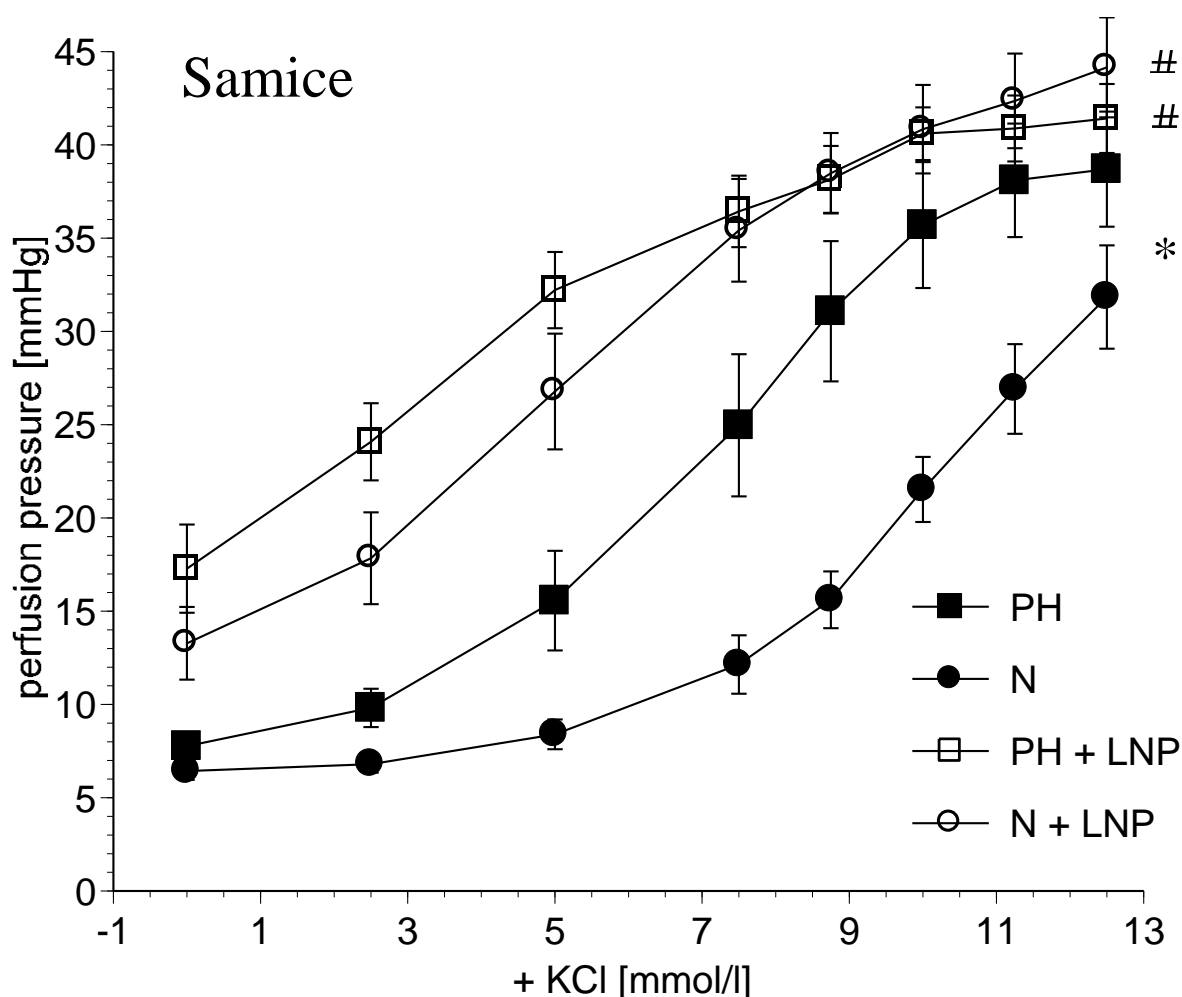


Obr. 4.7. Závislost perfúzního tlaku na zvyšující koncentraci linopirdinu u potkanů vystavených perinatální hypoxii (n=8) a normoxických kontrol (n=12). Osa x má logaritmické měřítko. *p < 0,05 perinatální hypoxie vs. normoxie.

Experiment 3B – vazokonstrikce indukovaná KCl, efekt linopirdinu

KCl indukovaná vazokonstrikce byla odlišná u samců a samic. U samic expozice perinatální hypoxii signifikantně posune křivku k vyšším perfúzním tlakům. Již nižší koncentrace K^+ způsobí větší vazokonstrikci u perinatálně hypoxických samic než u normoxických kontrol. Perfúzní tlak po přidání 10 mmo/l KCl do perfuzátu byl u samic vystavených perinatální hypoxii (n=6) $35,7 \pm 3,4$ mmHg zatímco u kontrol (n=7) $21,5 \pm 1,7$ mmHg (p < 0,05). Přidání linopirdinu do perfuzátu (3 μ mol/l) posunulo dose-response křivky k vyšším perfúzním tlakům u obou skupin samic. Perfúzní tlak po postupném přidávání KCl

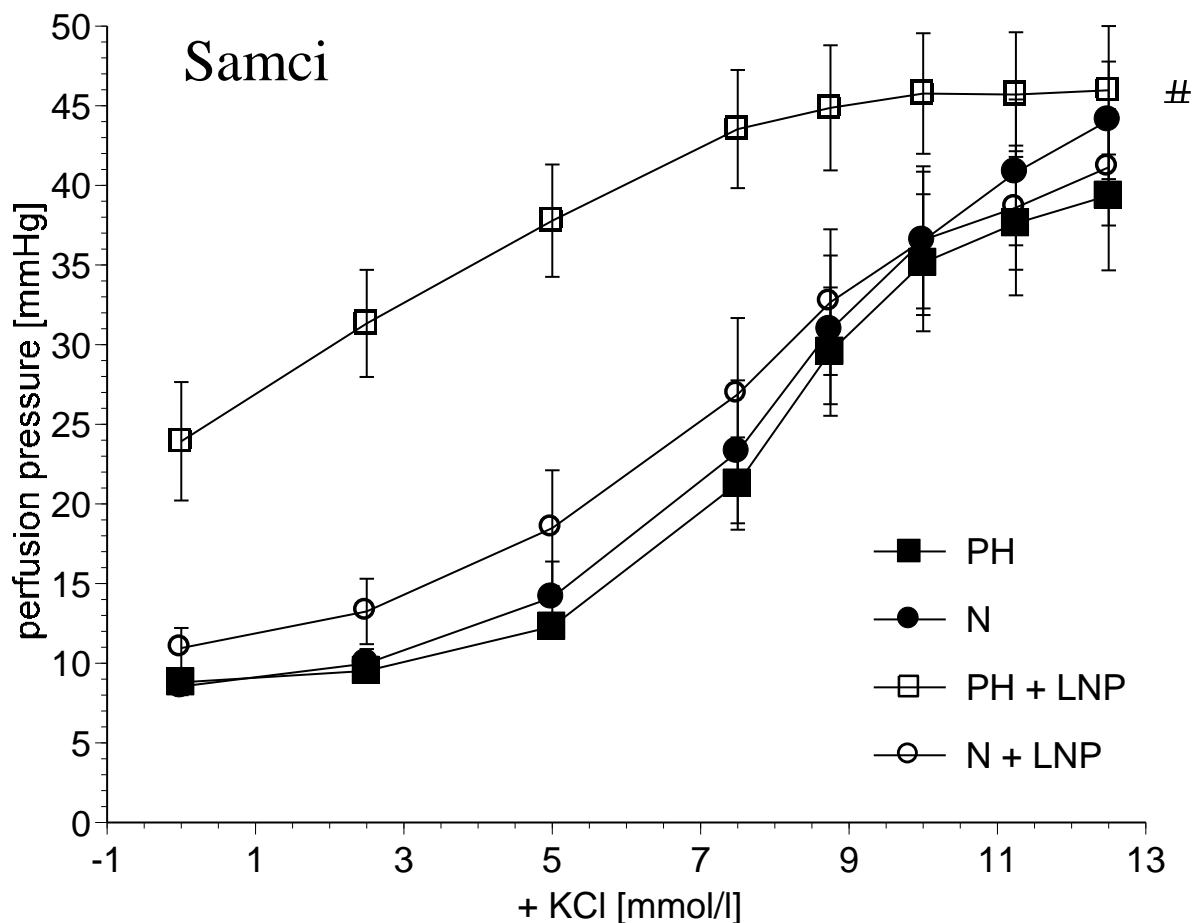
do perfuzátu u samic je na obr. 4.8.



Obr. 4.8. KCl indukovaná vazokonstrikce u samic. Perinatální hypoxie zvyšuje citlivost ke KCl, KCNQ kanály se uplatňují v KCl indukované vazokonstrikci u perinatálně hypoxických i normoxických potkanů. PH - potkani vystaveni perinatální hypoxii (n=6), N - normoxické kontroly (n=7), PH+LNP - potkani vystaveni perinatální hypoxii, v perfuzátu 3 μ mol/l linopirdinu (n=6), N+LNP - normoxické kontroly, v perfuzátu 3 μ mol/l linopirdinu (n=5), *p < 0,05 PH vs. N, #p < 0,05 PH vs. PH+LNP a N vs. N+LNP.

Na rozdíl od samic, u samců samotná expozice perinatální hypoxii neovlivnila velikost KCl indukované vazokonstrikce. Perfúzní tlak byl u samců po přidání 10 mmol/l KCl u obou skupin stejný, u perinatálně hypoxických (n=5) $35,1 \pm 4,3$ mmHg, respektive

36,5 ± 4,7 mmHg u kontrol (n=7). Naopak předchozí inhibice KCNQ kanálů linopirdinem (3 μmol/l) posunula dose-response křivku pouze u perinatálně hypoxických potkanů, u potkanů bez expozice hypoxii žádný efekt neměla. Perfúzní tlak po postupném přidávání KCl do perfuzátu u samců je na obr. 4.9.



Obr. 4.9. KCl indukovaná vazokonstrikce u samců. Expozice perinatální hypoxii neovlivňuje KCl indukovanou vazokonstrikci, KCNQ kanály se uplatňují v KCl indukované vazokonstrikci pouze u perinatálně hypoxických potkanů. PH - potkani vystaveni perinatální hypoxii (n=5), N - normoxické kontroly (n=7), PH+LNP - potkani vystaveni perinatální hypoxii, v perfuzátu 3 μmol/l linopirdinu (n=6), N+LNP - normoxické kontroly, v perfuzátu 3 μmol/l linopirdinu (n=6), #p < 0,05 PH vs. PH+LNP.

5. Diskuze

Naše práce ukazuje význam KCNQ kanálů v reakci plicního cévního řečiště na akutní hypoxii (HPV), při rozvoji HPH a v mechanismech dlouhodobých následků perinatální hypoxie. Specifický KCNQ blokátor linopirdine navozuje odpověď izolovaných plic perfundovaných solným roztokem k ventilační hypoxii (HPV) a potencuje HPV v plicích s již navozenou reaktivitou (priming). KCNQ kanály mají tedy inhibiční roli při HPV, hyperpolarizují membránu PSMCs a brání influxu Ca^{2+} . Několika denní expozice hypoxii vede ke snížení exprese KCNQ 4 mRNA a ztrátě odpovědi na linopirdin. To značí sníženou aktivitu KCNQ 4 kanálů, která se může podílet na změně reaktivitě hypoxických plicních cév. Množství Kv7.4 proteinu avšak není u hypoxických plic změněno. Naopak KCNQ aktivátor flupirtin dilatuje hypoxické plicní cévy a jeho podávání v průběhu hypoxie zabrání rozvoji HPH. Podávání flupirtinu nemění koncentraci oxidačních produktů NO v plasmě a tedy pravděpodobně působí přímo na PSMCs a nikoliv přes úpravu endoteliální dysfunkce navozené hypoxií. Změny navozené perinatální hypoxií jsou více vyjádřené u samic. Perinatálně hypoxické samice mají vyšší bazální perfúzní tlak a větší vazokonstrikční odpověď na KCl. Linopirdin potencuje reakci plicních cév na KCl u samic nezávisle na expozici perinatální hypoxii, ale u samců pouze po předchozí expozici hypoxii v perinatálním období.

Reakce plicních cév na hypoxii závisí na jejich tonu v situaci, kdy je snížen pO_2 . Tonus plicních cév je nízký (Emery *et al.*, 1981), částečně aktivitou K^+ kanálů. Proud K^+ iontů ven z buněk drží negativní membránový potenciál, tím brání depolarizaci, aktivaci napěťově řízených Ca^{2+} kanálů a vazokonstrikci. Bylo popsáno několik typů K^+ kanálů zodpovědných za trvalý eflux K^+ , ale některým chybí důležité vlastnosti, aby mohly takto fungovat (Gurney, 2002; Gurney *et al.*, 2006; Osipenko *et al.*, 1997). Vlastnosti Kv7 kanálů naznačují, že jsou aktivní při membránovém potenciálu PSMCs a podílí se na trvalém efluxu K^+ (Gurney *et al.*, 2010). Homo- či heteromultimery Kv7 kanálů z KCNQ 1, KCNQ 4 a KCNQ 5 podjednotek mají nízký aktivační práh (pod - 60 mV) a jsou stále otevřeny i při dlouhotrvající depolarizaci (Robbins, 2001).

V izolovaných plicích perfundovaných solným roztokem Kv7 blokátor linopirdin (0,5-10 $\mu\text{mol/l}$) způsobuje na dávce závislou vazokonstrikci (Joshi *et al.*, 2009). Nálezy ukazují, že v klidovém stavu jsou Kv7 kanály otevřené a jejich aktivita se podílí na klidovém

membránovém potenciálu PASMCs. Při těchto pokusech ale byla nejprve reaktivita plic navozena 2 cykly ANG II - hypoxie (priming). Pokud plíce nejsou primovány, linopirdin (12 $\mu\text{mol/l}$) vazokonstrikci nezpůsobí (Experiment 1A). Linopirdin působí tedy na izolované plíce perfundované solným roztokem podobně jako hypoxie, která způsobí vazokonstrikci pouze u plic, které jsou předem primovány vazokonstrikčním stimulem (McMurtry, 1984). Navíc, i když linopirdin neovlivnil bazální perfúzní tlak u nepřimovaných plic, byl schopen navodit HPV a výrazně ji potencovat. Pravděpodobné vysvětlení tohoto jevu je, že linopirdin depolarizuje PASMCs a tím umožňuje efekt hypoxie, ale depolarizace sama je nedostatečná k tomu, aby aktivovala napěťově závislý Ca^{2+} influx a tím vazokonstrikci (Clapp *et al.*, 1991).

Proč potřebuje linopirdin k tomu, aby vyvolal vazokonstrikci v izolovaných plicích perfundovaných solným roztokem priming stejně jako hypoxie, není známo. Linopirdin i hypoxie depolarizují myocyty o 10-15 mV (Joshi *et al.*, 2009; Osipenko *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1993). Pokud budou myocyty před primingem hyperpolarizovány, nestačí depolarizace k otevření Ca^{2+} kanálů. Druhou možností je vazodilatační efekt endotelu nebo dalších buněk v plicích, které mohou působit proti depolarizaci nebo influxu Ca^{2+} . I když meklofenamát a L-NAME byly přidány do perfuzátu k potlačení produkce prostaglandinů a NO, nemůžeme vyloučit vliv jiných vazodilatačních substancí (Herget *et al.*, 1987).

Další možností je, že priming souvisí se složitou homeostázou Ca^{2+} v myocytech, která je řízena řadou iontových kanálů a transportérů na plasmatické membráně, sarkoplasmatickém retikulu (SR) a mitochondriích (Lee *et al.*, 2002). Opakované cykly ANG II - hypoxie stimulují myocyty ke kontrakci díky opakovanému zvyšování intracelulární koncentrace Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) influxem Ca^{2+} z extracelulárního prostoru a jeho mobilizací ze SR. Při déletrvajícím kontrakci Ca^{2+} , který vstupuje do buněk, slouží k doplnění zásob v SR. Při klidových podmínkách také malé množství Ca^{2+} vstupuje do buněk, je ale rychle z cytosolu odstraněno SR na periferii a dále do extracelulárního prostoru (Lee *et al.*, 2002). Tedy pokud myocyty nejsou stimulovány, není dostatek Ca^{2+} v centrálním SR, který je nutný ke kontrakci a priming může sloužit k doplnění zásob Ca^{2+} do SR. Takto může priming zajistit HPV, kdy je nezbytné Ca^{2+} z SR (Sylvester *et al.*, 2012), ale nevysvětluje priming nutný ke kontrakci linopirdinem, protože ta závisí na Ca^{2+} z extracelulárního prostoru (Joshi *et al.*, 2006). Možným vysvětlením může být, že vzestup $[\text{Ca}^{2+}]_i$ při primingu aktivuje Ca^{2+} dependentní enzymy, které ovlivní Kv kanály, aktivační práh pro Ca^{2+} kanály nebo sensitivitu k Ca^{2+} (Lee

et al., 2002). Další možností je, že aktivace dráhy Rho-kinázy nebo proteinkinázy C ANG II během primingu zvýší citlivost k Ca^{2+} , a tím potence vazokonstrikční odpověď na následný vstup Ca^{2+} do myocytů.

Vzestup perfúzního tlaku po podání linopirdinu u primovaných plic je dán vazokonstrikcí a tím zvýšením cévní rezistence. Odpor zvyšujícímu průtoku měřený jako sklon P/Q křivky byl po podání linopirdinu zvýšen (Obr. 4.3. A). Tento nálezn je ve shodě s předchozími, kdy linopirdin kontrahuje izolované plicní cévy, kdy jako priming se běžně používá opakovaná stimulace KCl (Joshi *et al.*, 2006). Následné podání 4-AP potence vazokonstrikci vyvolanou linopirdinem (Obr. 4.2. A). Testovaná koncentrace linopirdinu 12 μ mol/l kontrahuje plicní arterie s maximálním efektem (Joshi *et al.*, 2006), koncentrace 4-AP 3 mmol/l plně blokuje 4-AP citlivé Kv kanály (Cox, 2005). Aditivní efekt linopirdinu a 4-AP na perfúzní tlak značí, že obě látky působí odlišnými mechanismy, pravděpodobně inhibicí různých iontových kanálů, a tím dosahují aditivního efektu na membránový potenciál.

Linopirdin potence vazokonstrikci indukovanou ANG II i HPV (Obr. 4.2. B, C). Oba efekty mohou být vysvětleny zvýšením $[Ca^{2+}]_i$ způsobeným depolarizací vyvolanou linopirdinem. Zvýšení HPV není způsobeno zvýšením bazálního tonu, protože další zvýšení bazálního tonu 4-AP nevyšší HPV. 4-AP potence HPV (Hasunuma *et al.*, 1991). Efekt 4-AP a linopirdinu na HPV není aditivní, což značí, že obě látky působí stejným mechanismem, pravděpodobně depolarizací. Nález je v souladu s myšlenkou, že citlivost k hypoxii je navozena depolarizací, která aktivuje Kv kanály citlivé na O_2 , které by jinak působily proti depolarizaci a minimalizovaly by tak influx Ca^{2+} , ale jsou inhibovány hypoxií (Turner *et al.*, 1997). Nezáleží však, čím je tato depolarizace vyvolána. Aditivní efekt linopirdinu a 4-AP na vazokonstrikci vyvolanou ANG II svědčí o tom, že odpověď na ANG II a hypoxii je řízena odlišnými mechanismy.

Podání linopirdinu u potkanů vystavených 3-denní hypoxii nevede k vazokonstrikci plicních cév (Obr. 4.3. B). Ztráta efektu linopirdinu u hypoxických potkanů koreluje s nižší expresí KCNQ 4 mRNA, množství KCNQ 1 a 5 mRNA se nezměnilo (Obr. 4.5.) . To znamená, že linopirdin vyvolává vazokonstrikci plicního řečiště inhibicí Kv kanálů obsahující KCNQ 4 podjednotku. Kv7.4 kanály jsou downregulovány v časně fázi rozvoje HPH a pravděpodobně se podílejí na depolarizaci PSMCs v období rozvoje HPH (Hong *et al.*, 2004). Množství Kv7.4 proteinu u hypoxických a normoxických potkanů se neliší.

Snížení množství proteinů se může projevit za delší časové období než snížení mRNA. Množství Kv7.4 proteinu jsme stanovili v celých intrapulmonálních cévách, nikoliv pouze v membránách PSMCs. Ztráta funkce Kv7 kanálů tedy může být způsobena jejich nedostatkem v membránách PSMCs. Ke správné asemblaci Kv7.4 proteinu do plasmatické membrány je potřeba molekulární chaperon heat shock protein 90 (Hsp 90) (Gao *et al.*, 2013). Na nedostatku Kv7.4 proteinů v membráně se může podílet chybná interakce s Hsp 90. 3-denní expozice hypoxii narušila interakci mezi Hsp 90 a NO syntázou a ovlivnila NO dependentní vazodilataci u prasat (Fike *et al.*, 2010).

Kv7 aktivátor flupirtin nemá žádný efekt na plicní perfúzní tlak a neovlivňuje sklon P/Q křivky u normoxických potkanů (Obr. 4.4. A). Nález je v souladu s nízkým bazálním tonem plicních cév, pro průkaz dilatace izolovaných plicních cév je nutná jejich prekonstrikce (Joshi *et al.*, 2009). U potkanů vystavených hypoxii, přesto že je snížena funkce Kv7.4 kanálů (viz výše), flupirtin snižuje odpor zvyšujícímu průtoku měřený jako sklon P/Q křivky (Obr. 4.4. B). Důvodem pro vasodilataci způsobenou flupirtinem je pravděpodobně zvýšený tonus plicních cév při hypoxii, ale mechanismus není jasný. Vysvětlením může být, že snížená exprese Kv7 nebo jiných Kv kanálů (Hong *et al.*, 2004) vede ke zvýšení resistance membrány a tím zvětšením hyperpolarizace způsobené aktivací menšího počtu Kv7 kanálů. Přímý důkaz pro změněnou resistenci membrány při hypoxii není, ale snížení resistance je pravděpodobné (Suzuki *et al.*, 1982). Flupirtin může vazodilataci způsobit otevřením zbylých Kv7.4 kanálů nebo aktivací Kv7.5 kanálů, ev. jejich heteromultimery. V plicních arteriích jsou exprimovány i Kv7.1 kanály, ty ale flupirtin neaktivuje (Robbins, 2001). Jiným mechanismem vazodilatace vyvolané flupirtinem může být blokáda Ca²⁺ kanálů, popsaná u flupirtinu (20 μmol/l) a jeho analogu retigabinu (Mani *et al.*, 2013).

Schopnost flupirtinu dilatovat cévy v hypoxických plicích je pravděpodobně dána působením proti depolarizaci vyvolané hypoxií, která způsobuje Ca²⁺ influx a tím nejen vazokonstrikci, ale i proliferaci hladkých svalových buněk (Platoshyn *et al.*, 2000). Normalizace membránového potenciálu PSMCs flupirtinem může být výhodnější než blokáda Ca²⁺ kanálů, protože nezabrání pouze influx Ca²⁺ ale i normalizuje membránový potenciál a tím zabrání napět'ově vázanému přestupu i jiných iontů přes buněčnou membránu. Pozitivní vliv podávání flupirtinu byl popsán u plicní hypertenze u myši vyvolané jak hypoxií tak nadměrnou expresí serotoninového transportéru (Morecroft *et al.*, 2009). Naše práce

ukazuje, že podávání flupirtinu během časné fáze expozice hypoxii má vliv na rozvoj HPH a proto by léčebný potenciál aktivátorů Kv7 kanálů měl být studován u pacientů s plicní hypertenzí.

Perinatální hypoxie způsobuje změny plicního cévního řečiště, které jsou více vyjádřeny u samic. Perinatálně hypoxické samice měli zvýšený bazální perfúzní tlak, který odráží zvýšený cévní odpor. Nález je ve shodě s předchozími výsledky, kdy perinatálně hypoxické samice mají v dospělosti na rozdíl od samců hypertrofii pravé komory (Hampl *et al.*, 2003). Odpověď perinatálně hypoxických cév na vazokonstrikční stimuly je obvykle popisována jako snížená jak u ANG II (Hampl *et al.*, 2000) nebo u KCl (Jones *et al.*, 2004). Naše výsledky ukazují zvýšenou KCl indukovanou vazokonstrikci u perinatálně hypoxických samic a stejnou u perinatálně hypoxických samců. Předchozí práce se pohlavními rozdíly nezabývaly a pokusy byly prováděny převážně u samců. Soudí se, že hypoxický inzult kolem porodu naruší přestavbu vysokotlakého fetálního plicního řečiště na nízkotlaké adultní. Fetální plicní řečiště se podobá změněnému plicnímu řečišti následkem chronické hypoxie (remodelace, zvýšený tonus). Reaktivita chronicky hypoxických plicních cév je odlišná (Karamsetty *et al.*, 1995). Odlišná reaktivita u perinatálně hypoxických potkanů může být způsobena nedostatečnou přestavbou fetálního na adultní plicní řečiště způsobené expozicí hypoxii kolem porodu.

Perinatální hypoxie zvyšuje citlivost izolovaných plic k linopirdinu, aktivita KCNQ kanálů je tedy u perinatálně hypoxických potkanů vyšší. Nález je ve shodě se zvýšenou aktivitou Kv kanálů v plicních arteriích u perinatálně hypoxických myší (Marino *et al.*, 2007). Linopirdin potencuje KCl indukovanou vazokonstrikci u samic nezávisle, zda byly vystaveni perinatální hypoxii, ale pouze u perinatálně hypoxických samců. Odlišná odpověď na KCl může být dána odlišným zastoupením K⁺ kanálů v membráně PSMCs.

6. Závěr

KCNQ kanály ovlivňují reakci plicního cévního řečiště na akutní i chronickou hypoxii a mají význam pro dlouhodobé následky perinatální hypoxie.

1. KCNQ blokátor linopirdin navozuje reaktivitu izolovaných plic perfundovaných solným roztokem k akutní ventilační hypoxii. V izolovaných plicích s již navozenou reaktivitou (priming) linopirdin potencuje HPV. Následně podaný 4-AP sice působí další vazokonstrikci, potencuje vazokonstrikci indukovanou ANG II, ale již neovlivňuje HPV. Blokáda KCNQ kanálů má na reakci plicních cév na akutní hypoxii důležitější význam než blokáda ostatních Kv kanálů.

2. Několika denní expozice hypoxii vede ke ztrátě vazokonstrikční odpovědi na linopirdin. Nález koreluje se snížením exprese Kv7.4 mRNA, avšak množství celkového Kv7.4 proteinu v plicních cévách není expozicí hypoxii ovlivněno. Naopak akutní podání KCNQ aktivátoru flupirtinu působí vazodilataci u potkanů vystavených hypoxii. Navíc podávání flupirtinu v průběhu expozice hypoxii (30 mg/kg/den) zabrání zvýšení plicní vaskulární resistance a normalizuje odpověď na akutní hypoxii. Flupirtin neovlivňuje produkci NOx, působí tedy pravděpodobně přímo na PSMCs.

3. Perinatální hypoxie zvyšuje aktivitu KCNQ kanálů v dospělosti. Perinatálně hypoxické samice mají vyšší bazální perfúzní tlak a větší KCl indukovanou vazokonstrikci. KCNQ kanály brání vazokonstrikci indukované KCl u samic nezávisle na expozici perinatální hypoxii, ale u samců pouze pokud byli vysaveni hypoxii kolem porodu. Aktivita KCNQ kanálů je tedy odpovědná za dlouhodobé změny způsobené perinatální hypoxií a podílí se i na pohlavních rozdílech.

7. Abstrakt

Plicní cévní řečiště se odlišuje od systémového reakcí na hypoxii. Akutní hypoxie způsobuje vazokonstrikci (HPV), která je nezbytná pro udržení optimálního pO_2 v organismu, chronická hypoxie plicní hypertenzi (HPH) a pokud je organismus vystaven hypoxii kolem porodu (perinatální hypoxie), tak navodí dlouhodobé změny ve vlastnostech plicních cév, které zvyšují náchylnost k plicní hypertenzi v dospělosti. Při reakci hladkých svalových buněk plicních arterií (PASMCs) na hypoxii dochází k depolarizaci membrány inhibicí napěťově řízených draselných (Kv) kanálů. Mezi nimi mají KCNQ (Kv7) kanály důležité elektrofyziologické vlastnosti, které naznačují jejich klíčovou roli v reakci na hypoxii.

Specifický blokátor KCNQ kanálů linopirdin navozuje reaktivitu izolovaných plic perfundovaných sodným roztokem na akutní hypoxii (priming), ale sám o sobě bez předchozího primingu nezpůsobuje vazokonstrikci, působí tedy na plicní cévy podobně jako akutní ventilační hypoxie. Navíc potencuje HPV a tím brání zvětšení HPV nespecifickým Kv blokátorem 4-aminopyridinem. Zdá se tedy, že pro HPV má inhibice KCNQ kanálů klíčovou roli.

U potkanů vystavených 3-5 denní hypoxii (normobarická komora, FiO_2 0,1) jsme zkoumali vlastnosti plicního cévního řečiště pomocí závislosti perfúzního tlaku na zvyšujícím průtoku (P/Q křivky). U hypoxických potkanů, na rozdíl od kontrol, linopirdin nezpůsobuje vazokonstrikci. Ztráta vazokonstrikční odpovědi na linopirdin byla doprovázena snížením exprese mRNA Kv7.4 kanálů, množství Kv7.4 proteinu nebylo ovlivněno. Naproti tomu specifický KCNQ aktivátor flupirtin dilatoval pouze plicní cévy z hypoxických potkanů, nikoliv z normoxických. Navíc podávání flupirtinu (30 mg/kg/den) v průběhu expozice hypoxii zabránilo zvýšení plicní cévní rezistence a normalizovalo odpověď na akutní hypoxii. Naše výsledky ukazují na downregulaci Kv7.4 kanálů v průběhu časně fáze rozvoje HPH a možnost ovlivnění rozvoje HPH podáváním KCNQ aktivátoru flupirtinu.

Změny navozené perinatální hypoxií (2 týdny v normobarické komoře, FiO_2 0,12) jsou více vyjádřené u samic. Dospělé perinatálně hypoxické samice mají vyšší plicní cévní rezistenci a větší reaktivitu na KCl. U perinatálně hypoxických potkanů obou pohlaví je větší citlivost plicních cév na linopirdin. KCNQ kanály se podílí na vazokonstrikční odpovědi na KCl u samic nezávisle na expozici perinatální hypoxii, ale u samců pouze po expozici

hypoxii v perinatálním období. Aktivita KCNQ kanálů se tedy podílí na odlišné reaktivitě perinatálně hypoxických plicních cév a je odpovědná i za pohlavní rozdíly.

Klíčová slova: Kv7 kanály, izolované plíce, hypoxická plicní vazokonstrikce, flupirtin, plicní hypertenze, P/Q závislost, perinatální hypoxie, pohlavní rozdíly

8. Abstract

Reaction of pulmonary vascular bed to hypoxia is different than in systemic vasculature. Acute ventilatory hypoxia constricts pulmonary arteries (HPV), diverts blood to better oxygenated alveoli and optimises arterial pO_2 . Chronic hypoxia causes pulmonary hypertension (HPH) and exposure to hypoxia at birth (perinatal hypoxia) results in longterm changes of pulmonary vasculature, which makes it more susceptible to develop pulmonary hypertension in adulthood. Reaction of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) to hypoxia involves membrane depolarization by inhibition of voltage gated potassium channels (Kv). Among them KCNQ (Kv7) channels have biophysical properties (low voltage threshold for activation and lack of inactivation during sustained depolarization) which suggest them to play a key role in hypoxic response.

Specific KCNQ channel inhibitor linopirdine primes HPV in saline perfused lungs, but in not primed lungs does not cause vasoconstriction, it behaves in the same way as acute ventilatory hypoxia. Moreover, in primed lungs linopirdin potentiates HPV and prevents non-specific Kv inhibitor 4-aminopyridine to potentiate HPV. It seems, that KCNQ channel inhibition has a key role in HPV.

In rats exposed to hypoxia for 3-5 days (normobaric chamber, FiO_2 0,1) we examined relationship of pulmonary perfusion pressure on increasing flow (P/Q plot). In hypoxic rats, contrary to controls, linopirdine fails to constrict pulmonary vessels. This loss on responsiveness to linopirdine correlates with reduced expression of Kv7.4 mRNA in hypoxic lungs, amount of Kv7.4 protein was not affected. In contrast, KCNQ channel activator flupirtine dilates only vessels from hypoxic rats, not from normoxic controls. Moreover, flupirtine treatment during exposure to hypoxia (30 mg/kg/day) prevents increase of pulmonary vascular resistance .and normalizes response to acute hypoxia. Our results point out downregulation of Kv7.4 channels in early stage of HPH development and possibility of flupirtine to influence developement of HPH.

Changes induced by perinatal hypoxia (2 weeks in FiO_2 0,12) are more expressed in females. Adult perinatal hypoxic females have increased pulmonary vascular resistance and vasoconstriction induced by KCl. Perinatal hypoxic rats of both gender are more sensitive to linopirdine. KCNQ channels are involved in KCl induced vasoconstriction in females independently on exposure to perinatal hypoxia, but in males only if they were exposed to

hypoxia at birth. KCNQ channel activity participates in different reactivity of perinatal hypoxic pulmonary vasculature and is involved in gender differences.

Key words: Kv7 channels, isolated saline perfused lungs, hypoxic pulmonary vasoconstriction, flupirtine, pulmonary hypertension, P/Q relationship, perinatal hypoxia, gender differences

9. Literatura

- Adnot S, Chabrier PE, Brun-Buisson C, Viossat I, Braquet P (1988). Atrial natriuretic factor attenuates the pulmonary pressor response to hypoxia. *J Appl Physiol* **65**(5): 1975-1983.
- Archer SL, Souil E, Dinh-Xuan AT, Schremmer B, Mercier JC, El Yaagoubi A, *et al.* (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**(11): 2319-2330.
- Archer SL, Weir EK, Reeve HL, Michelakis E (2000). Molecular identification of O₂ sensors and O₂-sensitive potassium channels in the pulmonary circulation. *Adv Exp Med Biol* **475**: 219-240.
- Barer GR, Bee D, Wach RA (1983). Contribution of polycythaemia to pulmonary hypertension in simulated high altitude in rats. *J Physiol* **336**: 27-38.
- Barker DJ (1995). Fetal origins of coronary heart disease. *Bmj* **311**(6998): 171-174.
- Barker DJ, Fall CH (1993a). Fetal and infant origins of cardiovascular disease. *Arch Dis Child* **68**(6): 797-799.
- Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS (1993b). Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* **341**(8850): 938-941.
- Clapp LH, Gurney AM (1992). ATP-sensitive K⁺ channels regulate resting potential of pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol* **262**(3 Pt 2): H916-920.
- Clapp LH, Gurney AM (1991). Modulation of calcium movements by nitroprusside in isolated vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch* **418**(5): 462-470.
- Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Tamargo J, Perez-Vizcaino F (2005). Postnatal maturational shift from PKC{zeta} and voltage-gated K⁺ channels to RhoA/Rho kinase in pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res* **66**(1): 84-93.
- Cox RH (2005). Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle. *Cell Biochem Biophys* **42**(2): 167-195.
- Davies P, Maddalo F, Reid L (1985). Effects of chronic hypoxia on structure and reactivity of rat lung microvessels. *J Appl Physiol* **58**(3): 795-801.
- Dubey RK, Jackson EK (2001). Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**(3): F365-388.
- Emery CJ, Bee D, Barer GR (1981). Mechanical properties and reactivity of vessels in isolated perfused lungs of chronically hypoxic rats. *Clin Sci (Lond)* **61**(5): 569-580.

- Evans AM, Osipenko ON, Gurney AM (1996). Properties of a novel K⁺ current that is active at resting potential in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells. *J Physiol* **496** (Pt 2): 407-420.
- Fike CD, Pfister SL, Slaughter JC, Kaplowitz MR, Zhang Y, Zeng H, *et al.* (2010). Protein complex formation with heat shock protein 90 in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in newborn piglets. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**(4): H1190-1204.
- Finlay M, Barer GR, Suggett AJ (1986). Quantitative changes in the rat pulmonary vasculature in chronic hypoxia--relation to haemodynamic changes. *Q J Exp Physiol* **71**(2): 151-163.
- Fried R, Meyrick B, Rabinovitch M, Reid L (1983). Polycythemia and the acute hypoxic response in awake rats following chronic hypoxia. *J Appl Physiol* **55**(4): 1167-1172.
- Gainé SP, Rubin LJ (1998). Primary pulmonary hypertension. *Lancet* **352**(9129): 719-725.
- Gao Y, Yechikov S, Vazquez AE, Chen D, Nie L (2013). Distinct roles of molecular chaperones HSP90alpha and HSP90beta in the biogenesis of KCNQ4 channels. *PLoS One* **8**(2): e57282.
- Gurney AM (2002). Multiple sites of oxygen sensing and their contributions to hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Respiratory Physiology & Neurobiology* **132**(1): 43-53.
- Gurney AM, Joshi S (2006). The role of twin pore domain and other K⁺ channels in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Novartis Found Symp* **272**: 218-228; discussion 228-233, 274-219.
- Gurney AM, Joshi S, Manoury B (2010). KCNQ potassium channels: new targets for pulmonary vasodilator drugs? *Adv Exp Med Biol* **661**: 405-417.
- Guyton AC, Hall JE (2006). Textbook of medical physiology, 11th edition. *Elsevier Inc.*
- Hakim TS, Michel RP, Chang HK (1982). Partitioning of pulmonary vascular resistance in dogs by arterial and venous occlusion. *J Appl Physiol* **52**(3): 710-715.
- Hampl V, Bibova J, Herget J (2000). Perinatal history of hypoxia leads to lower vascular pressures and hyporeactivity to angiotensin II in isolated lungs of adult rats. *Physiol Res* **49**(5): 567-575.
- Hampl V, Bibova J, Ostadalova I, Povysilova V, Herget J (2003). Gender differences in the long-term effects of perinatal hypoxia on pulmonary circulation in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**(2): L386-392.
- Hampl V, Herget J (1990). Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia. *Am Rev Respir Dis* **142**(3): 619-624.

Hasunuma K, Rodman DM, McMurtry IF (1991). Effects of K⁺ channel blockers on vascular tone in the perfused rat lung. *Am Rev Respir Dis* **144**(4): 884-887.

Herget J, Hampl V, Povysilova V, Slavik Z (1995a). Long-term effects of prenatal indomethacin administration on the pulmonary circulation in rats. *Eur Respir J* **8**(2): 209-215.

Herget J, Chovanec M (2011). Isolated perfused murine lung. A well characterized preparation for studying lung vascular function. *Drug Discovery Today: Disease Models*.

Herget J, Kuklik V (1995b). Perinatal lung injury extends in adults the site of hypoxic pulmonary vasoconstriction upstream. *Physiol Res* **44**(1): 25-30.

Herget J, McMurtry IF (1987). Dexamethasone potentiates hypoxic vasoconstriction in salt solution-perfused rat lungs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **253**(3): H574-581.

Herget J, Suggett AJ, Leach E, Barer GR (1978). Resolution of pulmonary hypertension and other features induced by chronic hypoxia in rats during complete and intermittent normoxia. *Thorax* **33**(4): 468-473.

Hong Z, Weir EK, Nelson DP, Olschewski A (2004). Subacute hypoxia decreases voltage-activated potassium channel expression and function in pulmonary artery myocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* **31**(3): 337-343.

Isaacson TC, Hampl V, Weir EK, Nelson DP, Archer SL (1994). Increased endothelium-derived NO in hypertensive pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol* **76**(2): 933-940.

Jones RD, Morice AH, Emery CJ (2004). Effects of perinatal exposure to hypoxia upon the pulmonary circulation of the adult rat. *Physiol Res* **53**(1): 11-17.

Joshi S, Balan P, Gurney AM (2006). Pulmonary vasoconstrictor action of KCNQ potassium channel blockers. *Respir Res* **7**: 31.

Joshi S, Sedivy V, Hodyc D, Herget J, Gurney AM (2009). KCNQ modulators reveal a key role for KCNQ potassium channels in regulating the tone of rat pulmonary artery smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **329**(1): 368-376.

Karamsetty VS, Kane KA, Wadsworth RM (1995). The effects of chronic hypoxia on the pharmacological responsiveness of the pulmonary artery. *Pharmacol Ther* **68**(2): 233-246.

Keith IM, Tjen ALS, Kraiczi H, Ekman R (2000). Three-week neonatal hypoxia reduces blood CGRP and causes persistent pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**(4): H1571-1578.

Klinger F, Geier P, Dorostkar MM, Chandaka GK, Yousuf A, Salzer I, *et al.* (2012). Concomitant facilitation of GABAA receptors and KV7 channels by the non-opioid analgesic flupirtine. *Br J Pharmacol* **166**(5): 1631-1642.

- Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lutjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, *et al.* (1999). KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* **96**(3): 437-446.
- Lachmanova V, Hnilickova O, Povysilova V, Hampl V, Herget J (2005). N-acetylcysteine inhibits hypoxic pulmonary hypertension most effectively in the initial phase of chronic hypoxia. *Life Sci* **77**(2): 175-182.
- Lamas JA, Selyanko AA, Brown DA (1997). Effects of a cognition-enhancer, linopirdine (DuP 996), on M-type potassium currents (IK(M)) and some other voltage- and ligand-gated membrane currents in rat sympathetic neurons. *Eur J Neurosci* **9**(3): 605-616.
- Langley SC, Jackson AA (1994). Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond)* **86**(2): 217-222; discussion 121.
- le Cras TD, Markham NE, Morris KG, Ahrens CR, McMurtry IF, Abman SH (2000). Neonatal dexamethasone treatment increases the risk for pulmonary hypertension in adult rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **278**(4): L822-829.
- Lee CH, Poburko D, Kuo KH, Seow CY, van Breemen C (2002). Ca(2+) oscillations, gradients, and homeostasis in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**(5): H1571-1583.
- Linehan JH, Dawson CA, Rickaby DA, Bronikowski TA (1986). Pulmonary vascular compliance and viscoelasticity. *J Appl Physiol* **61**(5): 1802-1814.
- Linehan JH, Haworth ST, Nelin LD, Krenz GS, Dawson CA (1992). A simple distensible vessel model for interpreting pulmonary vascular pressure-flow curves. *J Appl Physiol* **73**(3): 987-994.
- Madden JA, Vadula MS, Kurup VP (1992). Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* **263**(3 Pt 1): L384-393.
- Mani BK, O'Dowd J, Kumar L, Brueggemann LI, Ross M, Byron KL (2013). Vascular KCNQ (Kv7) potassium channels as common signaling intermediates and therapeutic targets in cerebral vasospasm. *J Cardiovasc Pharmacol* **61**(1): 51-62.
- Marino M, Beny JL, Peyter AC, Bychkov R, Diaceri G, Tolsa JF (2007). Perinatal hypoxia triggers alterations in K+ channels of adult pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**(5): L1171-1182.
- Massaro GD, Massaro D (1992). Formation of alveoli in rats: postnatal effect of prenatal dexamethasone. *Am J Physiol* **263**(1 Pt 1): L37-41.
- Massaro GD, Olivier J, Massaro D (1989). Short-term perinatal 10% O₂ alters postnatal development of lung alveoli. *Am J Physiol* **257**(4 Pt 1): L221-225.

Mauban JR, Remillard CV, Yuan JX (2005). Hypoxic pulmonary vasoconstriction: role of ion channels. *J Appl Physiol* **98**(1): 415-420.

McMurtry IF (1984). Angiotensin is not required for hypoxic constriction in salt solution-perfused rat lungs. *J Appl Physiol* **56**(2): 375-380.

McMurtry IF, Morris KG, Petrun MD (1980). Blunted hypoxic vasoconstriction in lungs from short-term high-altitude rats. *Am J Physiol* **238**(6): H849-857.

McMurtry IF, Petrun MD, Reeves JT (1978). Lungs from chronically hypoxic rats have decreased pressor response to acute hypoxia. *Am J Physiol* **235**(1): H104-109.

Mendelsohn ME, Karas RH (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* **340**(23): 1801-1811.

Meyrick B, Reid L (1979). Hypoxia and incorporation of 3H-thymidine by cells of the rat pulmonary arteries and alveolar wall. *Am J Pathol* **96**(1): 51-70.

Morecroft I, Murray A, Nilsen M, Gurney AM, MacLean MR (2009). Treatment with the Kv7 potassium channel activator flupirtine is beneficial in two independent mouse models of pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol* **157**(7): 1241-1249.

Nelson MT, Quayle JM (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* **268**(4 Pt 1): C799-822.

Oka M, Morris KG, McMurtry IF (1993). NIP-121 is more effective than nifedipine in acutely reversing chronic pulmonary hypertension. *J Appl Physiol* (1985) **75**(3): 1075-1080.

Osipenko ON, Evans AM, Gurney AM (1997). Regulation of the resting potential of rabbit pulmonary artery myocytes by a low threshold, O₂-sensing potassium current. *Br J Pharmacol* **120**(8): 1461-1470.

Ošťádal B, Vízek M (2003). Patologická fyziologie Srdce a cévy. *Karolinum*.

Parker TA, Afshar S, Kinsella JP, Grover TR, Gebb S, Geraci M, *et al.* (2001). Effects of chronic estrogen-receptor blockade on ovine perinatal pulmonary circulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**(3): H1005-1014.

Parker TA, Ivy DD, Galan HL, Grover TR, Kinsella JP, Abman SH (2000). Estradiol improves pulmonary hemodynamics and vascular remodeling in perinatal pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **278**(2): L374-381.

Patel AJ, Lazdunski M, Honore E (1997). Kv2.1/Kv9.3, a novel ATP-dependent delayed-rectifier K⁺ channel in oxygen-sensitive pulmonary artery myocytes. *Embo J* **16**(22): 6615-6625.

Peretz A, Degani N, Nachman R, Uziyel Y, Gibor G, Shabat D, *et al.* (2005). Meclofenamic acid and diclofenac, novel templates of KCNQ2/Q3 potassium channel openers, depress

- cortical neuron activity and exhibit anticonvulsant properties. *Mol Pharmacol* **67**(4): 1053-1066.
- Permutt S, Riley RL (1963). Hemodynamics of Collapsible Vessels with Tone: the Vascular Waterfall. *J Appl Physiol* **18**: 924-932.
- Platoshyn O, Golovina VA, Bailey CL, Limsuwan A, Krick S, Juhaszova M, *et al.* (2000). Sustained membrane depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**(5): C1540-1549.
- Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, Miettinen OS, Reid L (1979). Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am J Physiol* **236**(6): H818-827.
- Rabinovitch M, Gamble WJ, Miettinen OS, Reid L (1981). Age and sex influence on pulmonary hypertension of chronic hypoxia and on recovery. *Am J Physiol* **240**(1): H62-72.
- Reeve HL, Weir EK, Archer SL, Cornfield DN (1998). A maturational shift in pulmonary K⁺ channels, from Ca²⁺ sensitive to voltage dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **275**(6): L1019-1025.
- Remillard CV, Tigno DD, Platoshyn O, Burg ED, Brevnova EE, Conger D, *et al.* (2007). Function of Kv1.5 channels and genetic variations of KCNA5 in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**(5): C1837-1853.
- Robbins J (2001). KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Ther* **90**(1): 1-19.
- Rogawski MA (2000). KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels and the molecular pathogenesis of epilepsy: implications for therapy. *Trends Neurosci* **23**(9): 393-398.
- Rubin LJ (1997). Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **336**(2): 111-117.
- Sartori C, Allemann Y, Trueb L, Delabays A, Nicod P, Scherrer U (1999). Augmented vasoreactivity in adult life associated with perinatal vascular insult. *Lancet* **353**(9171): 2205-2207.
- Sedivy V, Joshi S, Ghaly Y, Mizera R, Zaloudikova M, Brennan S, *et al.* (2015). Role of Kv7 channels in responses of the pulmonary circulation to hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **308**(1): L48-57.
- Sobin SS, Tremer HM, Hardy JD, Chiodi HP (1983). Changes in arteriole in acute and chronic hypoxic pulmonary hypertension and recovery in rat. *J Appl Physiol* **55**(5): 1445-1455.
- SooHoo SL, Goldberg HS, Graham R, Jasper AC (1987). Zone 2 and zone 3 pulmonary blood flow. *J Appl Physiol* **62**(5): 1982-1988.

Sugita T, Hyers TM, Dauber IM, Wagner WW, McMurtry IF, Reeves JT (1983). Lung vessel leak precedes right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *J Appl Physiol* **54**(2): 371-374.

Suzuki H, Twarog BM (1982). Membrane properties of smooth muscle cells in pulmonary hypertensive rats. *Am J Physiol* **242**(5): H907-915.

Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JP (2012). Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev* **92**(1): 367-520.

Tucker A, Migally N, Wright ML, Greenlees KJ (1984). Pulmonary vascular changes in young and aging rats exposed to 5,486 m altitude. *Respiration* **46**(3): 246-257.

Turner JL, Kozlowski RZ (1997). Relationship between membrane potential, delayed rectifier K⁺ currents and hypoxia in rat pulmonary arterial myocytes. *Exp Physiol* **82**(4): 629-645.

Voelkel NF, Morris KG, McMurtry IF, Reeves JT (1980). Calcium augments hypoxic vasoconstriction in lungs from high-altitude rats. *J Appl Physiol* **49**(3): 450-455.

Walker BR, Voelkel NF, McMurtry IF, Adams EM (1982). Evidence for diminished sensitivity of the hamster pulmonary vasculature to hypoxia. *J Appl Physiol* **52**(6): 1571-1574.

Wang H-S, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, *et al.* (1998). KCNQ2 and KCNQ3 Potassium Channel Subunits: Molecular Correlates of the M-Channel. *Science* **282**(5395): 1890-1893.

Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, *et al.* (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* **12**(1): 17-23.

Wetzel RC, Zacur HA, Sylvester JT (1984). Effect of puberty and estradiol on hypoxic vasomotor response in isolated sheep lungs. *J Appl Physiol* **56**(5): 1199-1203.

Xiong Q, Gao Z, Wang W, Li M (2008). Activation of Kv7 (KCNQ) voltage-gated potassium channels by synthetic compounds. *Trends in Pharmacological Sciences* **29**(2): 99-107.

Yeung SY, Pucovsky V, Moffatt JD, Saldanha L, Schwake M, Ohya S, *et al.* (2007). Molecular expression and pharmacological identification of a role for K(v)7 channels in murine vascular reactivity. *Br J Pharmacol* **151**(6): 758-770.

Yuan XJ, Goldman WF, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP (1993). Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *Am J Physiol* **264**(2 Pt 1): L116-123.

Zong F, Zuo XR, Wang Q, Zhang SJ, Xie WP, Wang H (2012). Iptakalim rescues human pulmonary artery endothelial cells from hypoxia-induced nitric oxide system dysfunction.

Exp Ther Med **3(3)**: 535-539.

10. Přílohy

Publikace autora vážící se k tématu dizertační práce:

1. Joshi S, **Sedivy V**, Hodyc D, Herget J and Gurney AM (2009) KCNQ modulators reveal a key role for KCNQ potassium channels in regulating the tone of rat pulmonary artery smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **329**:368-376.
2. **Sedivy V**, Joshi S, Ghaly Y, Mizera R, Zaloudikova M, Brennan S, Novotna J, Herget J and Gurney AM (2015) Role of Kv7 channels in responses of the pulmonary circulation to hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **308**:L48-57.

KCNQ Modulators Reveal a Key Role for KCNQ Potassium Channels in Regulating the Tone of Rat Pulmonary Artery Smooth Muscle

Shreena Joshi, Vojtech Sedivy, Daniel Hodyc, Jan Herget, and Alison M. Gurney

Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Manchester, United Kingdom (S.J., A.M.G.); and Centre for Cardiovascular Research and Department of Physiology, Charles University-Second Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic (V.S., D.H., J.H.)

Received October 22, 2008; accepted January 15, 2009

ABSTRACT

Potassium channels are central to the regulation of pulmonary vascular tone. The smooth muscle cells of pulmonary artery display a background K^+ conductance with biophysical properties resembling those of KCNQ (K_v7) potassium channels. Therefore, we investigated the expression and functional role of KCNQ channels in pulmonary artery. The effects of selective KCNQ channel modulators were investigated on K^+ current and membrane potential in isolated pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs), on the tension developed by intact pulmonary arteries, and on pulmonary arterial pressure in isolated perfused lungs and in vivo. The KCNQ channel blockers, linopirdine and XE991 [10,10-bis(4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone], inhibited the noninactivating background K^+ conductance in PASMCs and caused depolarization, vasocon-

striction, and raised pulmonary arterial pressure without constricting several systemic arteries or raising systemic pressure. The KCNQ channel openers, retigabine and flupirtine, had the opposite effects. PASMCs were found to express KCNQ4 mRNA, at higher levels than mesenteric artery, along with smaller amounts of KCNQ1 and 5. It is concluded that KCNQ channels, most probably KCNQ4, make an important contribution to the regulation of pulmonary vascular tone, with a greater contribution in pulmonary compared with systemic vessels. The pulmonary vasoconstrictor effect of KCNQ blockers is a potentially serious side effect, but the pulmonary vasodilator effect of the openers may be useful in the treatment of pulmonary hypertension.

The pulmonary circulation delivers deoxygenated blood to the lungs at less than 20% of systemic pressure. This low pressure is maintained, at least in part, by the activity of K^+ channels in pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs), which mediate a background efflux of K^+ , driving the membrane potential to a negative value and preventing the opening of voltage-gated Ca^{2+} channels. The vasoconstrictor effect of agents causing membrane depolarization (Hara et al., 1980; Hasunuma et al., 1991) and vasodilation by drugs causing hyperpolarization (Clapp et al., 1993) illustrate the importance of membrane potential for pulmonary artery (PA) function.

The resting potential of PASMCs generally is agreed to

This work was supported by the Biotechnology and Biological Sciences Research Council [Grant BBS/B/11761/2]; Tenovus Scotland; Leonardo da Vinci Programme; the Grant Agency of Charles University [Grant 2419/2007]; the Centre for Cardiovascular Research [Grant MSMT 1M 0510]; and the Czech Science Foundation [Grant 305/08/0108].

Article, publication date, and citation information can be found at <http://jpet.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/jpet.108.147785.

depend on a noninactivating K^+ conductance, but the molecular nature of the underlying K^+ channels is disputed. The voltage-gated channels, $K_v1.5$ (Archer et al., 1998; Moudgil et al., 2006; Remillard et al., 2007) and $K_v2.1/K_v9.3$ (Patel et al., 1997), have been widely studied as mediators of resting potential. Recent work suggests roles for the voltage-independent, two-pore domain channels, TASK-1 (Gurney et al., 2003; Olschewski et al., 2006) and TASK-2 (Gönczi et al., 2006). We showed that the resting potential depends on a background K^+ current (I_{KN}) comprising voltage-dependent and -independent components (Osipenko et al., 1997; Joshi et al., 2006) and suggested that TASK channels mediate the latter (Gurney and Joshi, 2006; Gurney et al., 2003). The biophysical and pharmacological properties of the voltage-dependent component differ, however, from those of $K_v1.5$ and $K_v2.1$ channels (Evans et al., 1996). Distinguishing properties of I_{KN} include a low voltage threshold for activation (below -60 mV), slow activation (time constant, ~ 1 s), absence of inactivation (Evans et al., 1996), and low sensitivity to 4-aminopyridine (Osipenko et al., 1997, 1998), which de-

ABBREVIATIONS: PASMC, pulmonary artery smooth muscle cell; PA, pulmonary artery; I_{KN} , noninactivating K^+ current; PSS, physiological salt solution; PG, prostaglandin; RT, reverse transcription; PCR, polymerase chain reaction; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; AT, angiotensin II; TASK, TWIK-related acid-sensitive potassium.

polarizes PASMCS at concentrations above those required to inhibit $K_V1.5$ channels (Osipenko et al., 1997; Coetzee et al., 1999). Thus, although $K_V1.5$ may be important in preventing membrane depolarization, and it has been implicated in the development of pulmonary hypertension (Moudgil et al., 2006; Remillard et al., 2007), voltage-dependent channels with a lower activation threshold than $K_V1.5$ or $K_V2.1$ are the key determinants of I_{KN} and resting potential in PASMCS.

In early studies of I_{KN} , its kinetic properties were noted to bear a striking resemblance to the neuronal M-current (Evans et al., 1996). The channels responsible for the M-current are encoded by genes of the KCNQ (K_V7) family (Wang et al., 1998; Robbins, 2001). Together with the finding that KCNQ channel blockers are potent pulmonary vasoconstrictors (Joshi et al., 2006), the similarity of I_{KN} to the M-current led us to consider the possibility that KCNQ channels mediate the voltage-dependent component of I_{KN} . The KCNQ gene family has five members, KCNQ1 to 5, which carry out distinct functions when expressed in different tissues (Robbins, 2001). KCNQ1 is expressed in the heart, where it contributes to action potential repolarization, whereas KCNQ2, KCNQ3, and KCNQ5 contribute to the M-current and help to set the resting potential in neurons (Robbins, 2001; Wladyka and Kunze, 2006). KCNQ4 sets the resting potential and regulates submembrane Ca^{2+} concentration in inner ear hair cells (Oliver et al., 2003). KCNQ channel subunits originally were thought to be largely confined to these tissues, but it is becoming clear that they are also expressed in smooth muscle organs, including the vasculature where systemic arteries express KCNQ4 and smaller amounts of KCNQ1 and 5 (Ohya et al., 2003; Yeung et al., 2007).

This study investigated the expression and functional role of KCNQ channels in PA. Functional studies exploited a class of drugs that specifically inhibit or activate KCNQ channels at concentrations having little effect on other ion channels (Dalby-Brown et al., 2006). Linopirdine and XE991 (Dalby-Brown et al., 2006), originally developed as cognition enhancers, block KCNQ channels, with EC_{50} values in the low or submicromolar range. Both drugs are at least 20-fold less potent at inhibiting neuronal delayed rectifier, A-type, and BK_{Ca} currents and members of the EAG gene family (K_V10-12) and 100-fold less potent at inhibiting $K_V1.2$, $K_V2.1$, and $K_V4.3$ (Lamas et al., 1997; Schnee and Brown, 1998; Wang et al., 1998; Wladyka and Kunze, 2006). Retigabine and flupirtine are antiepileptic and analgesic drugs that act by selectively opening KCNQ2–5, but not homomeric KCNQ1 channels, at micromolar concentrations (Tatulian et al., 2001). The effects of these drugs were investigated on PASMCS membrane potential and I_{KN} in rat isolated PASMCS and on pulmonary vascular function in rat isolated arteries, isolated perfused lungs, and in vivo. The results suggest a key role for KCNQ channels, particularly KCNQ4, in the control of membrane potential and tone in pulmonary arteries.

Materials and Methods

The functional effects of KCNQ channel modulators were investigated on preparations of rat intrapulmonary artery (200–300- μ m external diameter), isolated saline-perfused lungs, and in vivo hemodynamics, as described previously (Herget and McMurtry, 1987; Joshi et al., 2006). Experiments on isolated lungs and in vivo hemodynamics were carried out in Prague and used adult male Wistar rats (age, 7–8 weeks; 240 ± 15 g), treated in accordance with the Declaration of Helsinki and the *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (Institute of Laboratory Animal Resources, 1996). All procedures were approved by the Animal Studies Committee at Charles University, Prague. For experiments on isolated vessels and cells (in Manchester), male Sprague-Dawley rats (250–300 g) were killed by cervical dislocation in accordance with the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986, and the lungs were excised into physiological salt solution (PSS) containing 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.5 mM NaH_2PO_4 , 0.5 mM KH_2PO_4 , 10 mM HEPES, 10 mM glucose, and 1 mM $CaCl_2$, pH 7.4.

Myography. PA rings were mounted in a wire myograph (DMT A/S, Aarhus, Denmark) in PSS at 37°C, under 5 mN basal tension. After 30 min equilibration, vessels were challenged three times with 50 mM KCl, and subsequent responses to drug application were measured as a percentage of the final KCl constriction. Where indicated, the endothelium was removed by rubbing the vessel lumen with a human hair. Linopirdine and XE991 (hydrochloride salts from Tocris Bioscience, Bristol, UK) were applied to vessels at resting tone, and the increase in force was measured relative to the response to 50 mM KCl. The effects of retigabine and flupirtine were tested on vessels precontracted with phenylephrine (1 μ M), prostaglandin (PG) $F_{2\alpha}$ (3 μ M), or 50 mM K^+ . The K^+ in the PSS was raised by equimolar replacement of Na^+ .

Isolated Saline-Perfused Lungs. Rats were anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg i.p.) and ventilated (peak inspiratory pressure, 12 cm of H_2O ; positive end expiratory pressure, 2 cm of H_2O) through a tracheal cannula with normoxic gas mixture (21% O_2 , 5% CO_2 , 74% N_2). The main PA and left ventricle were cannulated, and the lungs were perfused at 4 ml/min/100 g via the PA with bicarbonate-buffered salt solution containing albumin (4 g/100 ml) and meclofenamate (17 μ M) in 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.16 mM $MgSO_4$, 17 mM $NaHCO_3$, 1.18 mM KH_2PO_4 , 3.2 mM $CaCl_2$, and 5.5 mM D-glucose. The pulmonary perfusion pressure was measured via a transducer connected to the inflow cannula (PowerLab; ADInstruments Ltd., Chalfrove, Oxfordshire, UK), and after equilibration for 15 min, two cycles of angiotensin II (0.2 μ g) followed by hypoxia (0% O_2 , 5% CO_2 , 95% N_2) were delivered to check viability. When pressure returned to baseline, linopirdine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) dissolved in dimethyl sulfoxide (0.5–10 μ M) was infused, and pressure was measured after reaching a stable level. Constrictor responses were measured as the peak increase in pulmonary perfusion pressure.

In Vivo Hemodynamics. Hemodynamic measurements were made in spontaneously breathing rats anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg i.p.). Mean systemic arterial pressure was measured via a cannula in the left carotid artery, and pulmonary arterial pressure was measured by a transducer introduced into the pulmonary artery via the jugular vein and right ventricle. Linopirdine dihydrochloride (Tocris Bioscience), dissolved in PSS, was injected via a venous catheter at 10-min intervals in cumulative bolus doses of 1, 5, and 5 mg/kg. Because 2.5 mg/kg i.v. linopirdine given to rats provided an immediate plasma concentration of 5.9 μ M (Rakestraw et al., 1994), these doses are expected to produce plasma concentrations covering the range over which linopirdine causes pulmonary vasoconstriction (Joshi et al., 2006). With a plasma half-life of 36 min (Rakestraw et al., 1994) the plasma concentration of linopirdine would decline by around 17% between doses and remain elevated at the end of each experiment.

Electrophysiology. PASMCS were isolated, and resting membrane potential and K^+ currents were studied using the whole-cell patch-clamp technique as described previously (Osipenko et al., 1998). Pipette solution contained 130 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 20 mM HEPES, and 0.5 mM Na_2GTP , pH 7.2. To isolate I_{KN} from other K^+ currents in the cell, 10 mM tetraethylammonium chloride and 10 μ M glibenclamide were added to the PSS, and the membrane was clamped at 0 mV for ≥ 5 min (Evans et al., 1996).

KCNQ Subunit Expression. RNA was extracted from rat arteries, brain, heart or isolated PSMCs and mRNA expression identified using reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR), as described previously (Gurney et al., 2003). Primer sequences for amplifying KCNQ transcripts are listed in Table 1. Cycle parameters were typically 95°C for 10 min, followed by 20 to 35 cycles at 95°C for 1 min, 52°C to 58°C for 30 s, and 68°C for 1 min. Reverse transcriptase was omitted from control cDNA reactions. Products were resolved by agarose gel electrophoresis, purified, and verified by sequencing. Experiments were repeated on separate samples of RNA isolated from at least three rats.

Real-time quantitative RT-PCR with SYBR Green detection was used to quantify expression levels of KCNQ mRNAs, using the primers listed in Table 1. Reactions were carried out in 250 µl volumes containing 1 µl of cDNA, 12.5 µl of SYBR Green master mix, and 7.5 pmol each primer, using an Applied Biosystems 7500 PCR system according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA). Cycling parameters were 95°C for 15 min followed by 40 cycles at 95°C for 1 min, 58°C for 40 s, and 68°C for 40 s. A dissociation step was performed for melting curve analysis, a single peak representing specificity. An absolute quantification method was used in which the input copy number was determined by relating the PCR signal to a standard curve. Expression levels were then normalized against glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), measured simultaneously in the same samples. Experiments were carried out in triplicate from the pooled RNA of three rats and repeated on separate extractions from two sets of animals.

To determine whether KCNQ4 protein was expressed in PSMCs, immunofluorescence experiments were carried out using three different KCNQ4 antibodies (G14, S18, and N10, 1:100 or 1:200 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) as described previously (Gurney et al., 2003). Staining was detected using the Alexa fluor 594-conjugated secondary antibody (Molecular Probes, Carlsbad, CA). Control cells were processed without primary antibody or with primary antibody preincubated with excess antigen.

Results

Pulmonary-Selective Effects of KCNQ Channel Blockers.

Linopirdine and XE991 were shown previously to constrict PA while having little effect on mesenteric arteries (Joshi et al., 2006). XE991 has since been shown to constrict systemic arteries, especially if tone is already raised (Yeung et al., 2007). To directly assess the selectivity of the KCNQ blockers for PA, we compared the effects of linopirdine and XE991 on rat pulmonary, renal, mesenteric, femoral, coronary, carotid, cerebral, and tail arteries under identical conditions, using drug concentrations previously shown to maximally constrict PA (Joshi et al., 2006). The original traces in Fig. 1A (inset) confirm that 10 µM linopirdine and 1 µM XE991 constricted PA almost as effectively as 50 mM K⁺ but had a small effect on the renal artery, which responded to the drugs with constrictions of only 15 ± 5% (n = 4) and 17 ± 10% (n = 4), respectively, of the response to K⁺. The mesenteric artery was even less sensitive, with linopirdine and XE991 inducing only 5 ± 2% (n = 5) and 4 ± 1% (n = 6), respectively, of the response to K⁺. All other vessels failed to respond to either drug, despite robust responses to K⁺ (Fig. 1A).

The vasoconstrictor action of linopirdine was apparent in isolated, saline-perfused lungs (Fig. 1Bi). The effect was slow to develop compared with the response to angiotensin II (AT), taking ~10 min to reach maximum. This is consistent with the slow time course of constriction seen in isolated arteries (Joshi et al., 2006; see Fig. 1A, inset). In the absence of linopirdine, pressure remained stable over the same time course in at least five preparations, and reproducible responses to bolus injection of AT before and after perfusion

TABLE 1
Primers for RT-PCR and quantitative RT-PCR

Forward (For) and reverse (Rev) primers for genes with the indicated accession numbers amplify transcripts of the size indicated. Internal (Int) primers amplified a region inside that was spanned by outer (Out) primer pairs and were used for real-time PCR.

Gene	Primer	Primer Pair Sequences (5'–3')	Predicted Size	Accession Number
			<i>bp</i>	
KCNQ1	Out.For 1	AGC AGA GGC AGA AGC ACT TCA ACC	447	NM_0320773
	Rev1	GCA GCT GTG ACA CAT GGG TGA TG		
	Out.For 2	GGCATACTTGGCTCTGGGTTTG	194	
	Rev2	CTGGGGGAGAGCAAAGTGTG		
KCNQ2	Int. For1	GGCTCTGGGTTTGCACTG	106	NM_133322
	Rev1	CATAGCACCTCCATGCAGTC	460	
	Out.For 1	ACG CCT TCT ACC GCA AGC TGC		
	Rev1	TAC CGA TCC CAA GAG CTT CCA GG	354	
KCNQ3	Out.For 2	CCGCAAGCTGCAGAATTTC		NM_031597
	Rev2	AAGACATTGCCCTGGGAGCC		
	Out.For1	AAG ACC AAA GCA TGA TGG GGA AGT T	807 (765)	
	Rev1	TGG AAG GGG TCC ATA TGG AAT CTG		
KCNQ4	Out.For2	AAG ACC AAA GCA TGA TGG GGA AGT T	731	XM_233477
	Rev2	CCC AGT GGA TGA CAT AGG CAT G		
	Out.For 1	CGCTTCCGGGCTCTCTAAGAC	561	
	Rev1	GTCTCTGGTCTACAGGGCTGTG		
KCNQ5	Int. For1	CCCCGCTGCTCTACTGAG	86	XM_237012
	Rev1	ATGACATCATCCACCGTGAG		
	Out.For1	GAT GCC AGT GTG ACG TCT CTG TGG	386	
	Rev1	CCT TTC CGG AGG ACC TGT TGA TAG		
GAPDH	Out.For2	GATGCCAGTGTGACGTGTCCGTGG	394	NC_005103.2
	Rev2	CCTTCCGGGAGGACCTGCTGGTAG		
	Int. For1	CGAGACAACGACAGATGACC	77	
	Rev1	TGGATTCAATGGATTGTACCTG		
GAPDH	For	CACCAGCATCACCCATT	157	
	Rev	CCATCAAGGACCCCTTCATT		

bp, base pair.

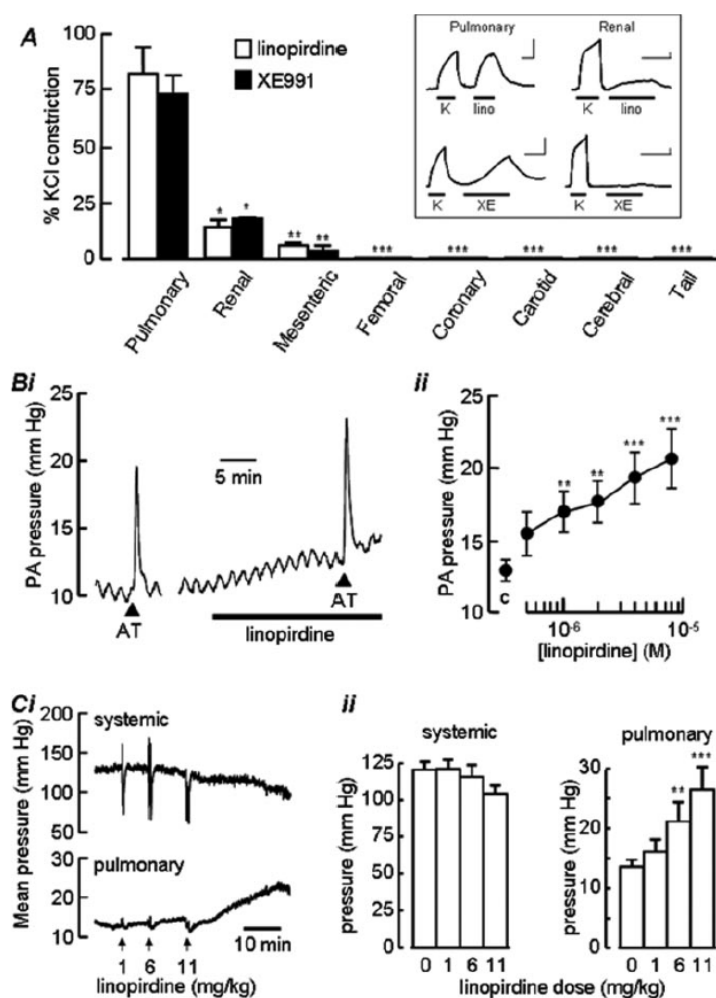


Fig. 1. PA effects of KCNQ blockers. A, constriction evoked by linopirdine (10 μ M) and XE991 (1 μ M) in the arteries indicated. Measured as percentage of K^+ -induced constriction ($n = 4-6$). Inset, original traces showing responses to linopirdine, XE991, and 50 mM K^+ (K) in pulmonary (left) and renal (right) arteries. Calibration bars, 1 mN vertical and 10 min horizontal. Bi, PA perfusion pressure in isolated, salt-perfused lungs before and during bolus injection of AT and infusion of linopirdine (10 μ M). Bii, concentration dependence of linopirdine-induced PA pressure increase; control pressure (c) in the absence of drug plotted for comparison; $n = 4$. Ci, mean systemic and PA pressures recorded in vivo before and during intravenous linopirdine at doses shown. Cii, dose-dependent increase in PA but not systemic pressure by linopirdine ($n = 5$). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; unpaired Student's t test versus PA (A); analysis of variance followed by Tukey's comparison versus control (Bii and Cii).

with linopirdine indicated that the lungs remained viable. The increase in pulmonary perfusion pressure caused by linopirdine was concentration dependent, reaching significance above 0.5 μ M (Fig. 1Bii). Linopirdine also raised mean PA pressure in vivo, without raising mean systemic pressure (Fig. 1C). Figure 1Cii shows that the in vivo effect was dose dependent and significant above 1 mg/kg.

Vasodilator Effect of KCNQ Channel Activators.

When applied to rat PA, the KCNQ activator retigabine reduced the contractile response to phenylephrine in a concentration-dependent manner (Fig. 2A). Responses reached steady state within 10 to 15 min, but recovery took 40 min or so and required copious washing. To determine the site of action of retigabine, responses were compared in intact vessels and vessels with endothelium removed and nitric oxide and prostacyclin synthesis blocked by the addition of N^G -nitro-L-arginine methyl ester (100 μ M) and indomethacin (10 μ M). Figure 2B shows that the vasodilator action of retigabine occurred independently of a functional endothelium. Figure 2B also shows that flupirtine, an analog of retigabine,

produced concentration-dependent dilation of pulmonary arteries, but with an approximately 5-fold lower potency. The phenylephrine-induced precontraction was 50% reversed by retigabine at $13 \pm 4 \mu$ M ($n = 5$) and by flupirtine at $62 \pm 12 \mu$ M ($n = 5$, $p < 0.05$). The effect of flupirtine was also endothelium-independent (data not shown).

If vasodilation were due to the opening of KCNQ channels, it should be inhibited by reducing the transmembrane K^+ gradient. As shown in Fig. 2C, the effect of retigabine was greatly reduced when the artery was precontracted with raised extracellular K^+ (50 mM). Figure 2D compares the effects of retigabine and flupirtine on vessels precontracted with either 50 mM K^+ or the receptor agonists phenylephrine (10 μ M) or $PGF_{2\alpha}$ (3 μ M). At 10 and 100 μ M, retigabine and flupirtine were both significantly less effective ($p < 0.01$) at relaxing vessels constricted with K^+ than those constricted with phenylephrine or $PGF_{2\alpha}$. Retigabine reduced $PGF_{2\alpha}$ constrictions by 50% at $14 \pm 5 \mu$ M ($n = 4$), not significantly different from the concentration causing 50% inhibition of phenylephrine constriction.

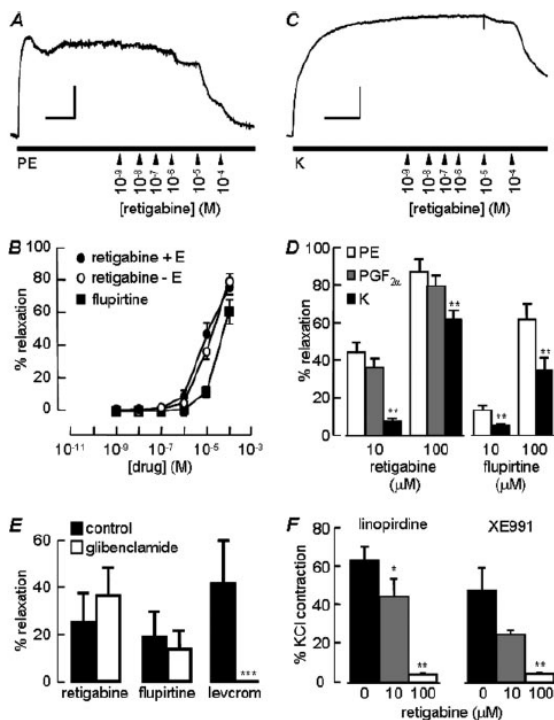


Fig. 2. Effect of KCNQ channel openers on rat PA. **A**, sustained constriction induced by 10 μM phenylephrine followed by relaxation upon cumulative application of retigabine at concentrations indicated. Calibration bars, 1 mN vertical and 10 min horizontal. **B**, concentration-response curves for retigabine-induced relaxation in the presence (+E) or absence (-E) of endothelium and flupirtine ($n = 5$). Relaxation measured as percentage of constrictor-induced pretone. **C**, constriction induced by 50 mM K^+ followed by relaxation upon cumulative application of retigabine at concentrations indicated. Calibration as in **A**. **D**, histogram comparing mean relaxation amplitudes for flupirtine and retigabine (10 and 100 μM) when the preconstrictor agent was phenylephrine (10 μM), $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3 μM), or 50 mM K^+ ; $n = 4-6$. **E**, histogram comparing relaxation responses to KCNQ activators and levromakalim (levrom), all at 10 μM , in the absence and presence of 10 μM glibenclamide ($n = 3$). **F**, histogram comparing constrictor effects of linopirdine (10 μM) and XE991 (1 μM) in the presence and absence of retigabine at the concentrations indicated ($n = 4$). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, paired Student's t test versus control.

Activation of K_{ATP} channels relaxes PA (Clapp and Gurney, 1992). To test whether the vasodilation caused by KCNQ activators could be explained by K_{ATP} channel opening, the ability of the K_{ATP} blocker glibenclamide (10 μM) to inhibit their effects was investigated. Figure 2E shows that glibenclamide did not inhibit vasodilation evoked by retigabine (10 μM) or flupirtine (10 μM), but it did abolish vasodilation caused by the K_{ATP} channel opener levromakalim (10 μM).

If the KCNQ blockers and activators act on the same channels, their effects might be expected to be antagonistic. Figure 2F shows that retigabine reduced the vasoconstrictor effects of linopirdine (10 μM) and XE991 (1 μM) in a concentration-dependent manner, with 100 μM almost abolishing vasoconstriction. Flupirtine (10 μM) had a similar effect (data not shown), increasing the linopirdine EC_{50} from 0.5 ± 0.1 to 2 ± 0.4 μM ($n = 5$, $p < 0.05$) and the XE991 EC_{50} from 0.1 ± 0.03 to 1.8 ± 0.2 μM ($n = 5$, $p < 0.05$).

Electrophysiological Effects of KCNQ Channel Blockers. The resting potential of rat PASMCs was -44 ± 2 mV ($n = 71$). Recordings were allowed to stabilize for at least 1 min before measuring or applying drugs. Both linopirdine and XE991 evoked depolarization (Fig. 3, A and B), which could take several minutes to reach steady state and often showed only partial recovery over the time course of the experiments (≤ 30 min), as found previously with recombinant KCNQ channels (Wickenden et al., 2001). Linopirdine depolarized cells by 9 mV (from -45 ± 3 to -36 ± 3 mV; $n = 8$, $p < 0.05$) at 1 μM and by 15 mV (from -48 ± 3 to -33 ± 7 mV; $n = 5$, $p < 0.05$) at 10 μM . Similar responses were seen with XE991 (Fig. 3B), and because the depolarization evoked by 5 μM XE991 was not significantly larger than that evoked by 1 μM , these seem to be maximal concentrations, consistent with XE991-induced vasoconstriction (Joshi et al., 2006). Note that these measurements include six of 30 cells that showed no response.

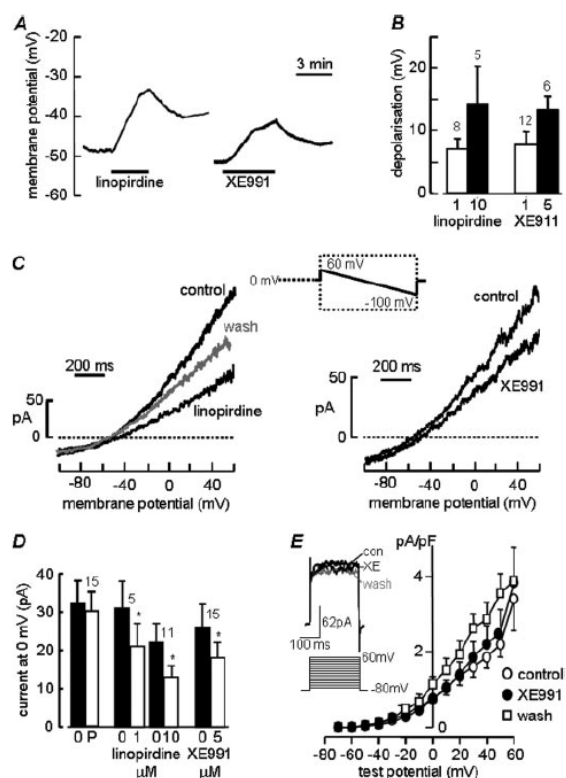


Fig. 3. Effects of KCNQ channel blockers on membrane potential and I_{KN} . **A**, membrane potential traces show depolarization upon application of linopirdine (10 μM) or XE991 (5 μM). **B**, mean depolarizations induced by linopirdine and XE991 at the concentrations shown (n indicated above bars). **C**, I_{KN} under control conditions, in the presence of 10 μM linopirdine (left) or 5 μM XE991 (right) and after 15 to 20 min of washing. Inset, voltage protocol. **D**, histogram comparing linopirdine and XE991 effects on I_{KN} measured at 0 mV (paired data, n indicated above bars). P, control PSS application in place of drug. *, $p < 0.05$. **E**, mean amplitude of delayed rectifier K^+ current, under control conditions, after 5 μM XE991 application, then washout ($n = 5$). Inset, voltage protocol and typical traces before (con) and during (XE) XE991 application and after drug washout, recorded with a step to +40 mV.

Figure 3C illustrates reversible effects of linopirdine and XE991 on the noninactivating, background K^+ current, I_{KN} , which mirror their effects on membrane potential. The application of linopirdine or XE991 reduced I_{KN} amplitude at potentials above -60 mV. As shown in Fig. 3D, at 0 mV, linopirdine reduced current amplitude by 29% at $1 \mu\text{M}$ and 38% at $10 \mu\text{M}$, whereas XE991 reduced it by 36% at $5 \mu\text{M}$. As found with their effects on membrane potential and vessel tone, the inhibition took several minutes to develop, and recovery required washing for 15 min or more.

Linopirdine and XE991 can inhibit non-KCNQ channels at higher concentrations than used here (Lamas et al., 1997; Wang et al., 1998). Therefore, we tested the effects of the blockers on the delayed rectifier current of PASMCS, under the same conditions used to study I_{KN} . PASMCS were clamped at -80 mV, and a family of delayed rectifier currents, evoked by 200-ms steps to increasingly depolarized potentials, was applied at 5-s intervals. Figure 3E shows that $5 \mu\text{M}$ XE991 had no significant effect on the delayed rectifier current.

Electrophysiological Effects of KCNQ Channel Activators. The KCNQ activators, retigabine and flupirtine, both hyperpolarized PASMCS (Fig. 4A). Retigabine ($10 \mu\text{M}$) hyperpolarized five of seven cells with an average response of -7 ± 3 mV ($n = 7$). When applied to cells clamped at 0 mV, neither retigabine ($10 \mu\text{M}$) nor flupirtine ($10 \mu\text{M}$) had a measurable effect on I_{KN} . Because KCNQ channel activation may be saturated at 0 mV, precluding further activation by drugs (Tatulian et al., 2001), we investigated the effects of KCNQ activators at negative potentials where I_{KN} is too small to measure under physiological conditions. To facilitate measurements, the extracellular K^+ concentration was raised to 130 mM by equimolar substitution of Na^+ , shifting

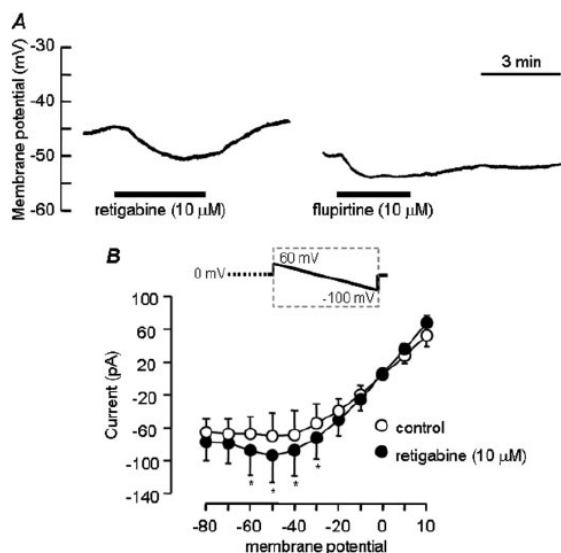


Fig. 4. Effects of KCNQ channel openers on membrane potential and I_{KN} . A, membrane potential traces upon application of retigabine ($10 \mu\text{M}$) or flupirtine ($10 \mu\text{M}$). B, mean I_{KN} amplitude over a range of potentials, under control conditions (130 mM K^+) and after application of $10 \mu\text{M}$ retigabine ($n = 4$). Inset, voltage protocol. *, $p < 0.05$, paired Student's t test versus control.

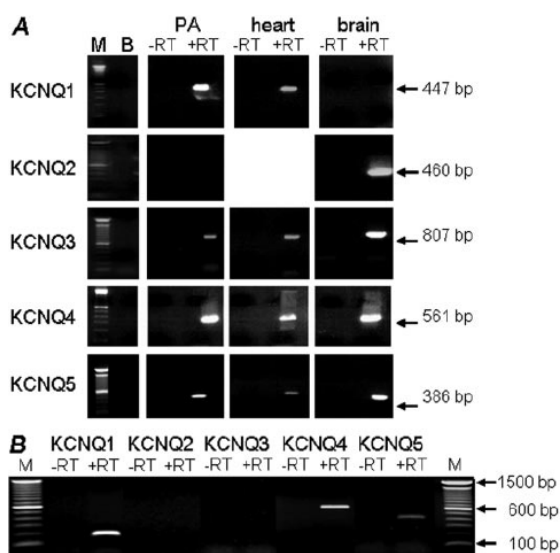


Fig. 5. KCNQ transcripts in pulmonary artery. RT-PCR detection of KCNQ transcripts in whole-rat PA, heart, and brain (A) and isolated PASMCS (B). Each column represents a separate reaction with (+RT) or without (-RT) reverse transcriptase. M, size marker; B, water blank.

the K^+ equilibrium potential to 0 mV and amplifying I_{KN} (now inward) at negative potentials. Figure 4B shows that under these conditions, retigabine increased I_{KN} amplitude between -20 and -70 mV. At -60 mV, retigabine ($10 \mu\text{M}$) increased I_{KN} by 34% from a control amplitude of -70 ± 32 to -94 ± 37 pA ($n = 5$, $p < 0.05$).

KCNQ Channel Expression in PASMCS. The expression of KCNQ subunit mRNAs in whole pulmonary and mesenteric artery measured relative to the housekeeping gene GAPDH. KCNQ4 was the most highly expressed subunit in both vessels, but its expression in PA was significantly higher (>10 -fold) than in the mesenteric artery. The highest expression of KCNQ1 was also in PA, but KCNQ5 expression was low in both vessels. Normalizing PA expression relative to the control tissues of brain and heart revealed that PA expresses KCNQ1 almost as well as heart, KCNQ4 expression is almost 20-fold higher in PA than brain, but KCNQ5 expression is small in PA compared with brain (Fig. 6B). Figure 6C shows that KCNQ4 protein is expressed in PASMCS. A similar staining pattern was seen with three antibodies directed against different parts of the KCNQ4 protein. In each case, staining had a

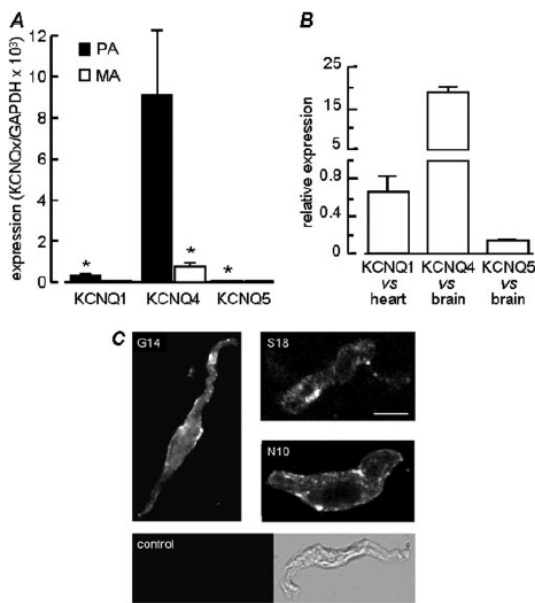


Fig. 6. Expression of KCNQ. **A**, expression profile of KCNQ1, 4, and 5 channels in whole-rat PA and mesenteric artery (MA) measured with qRT-PCR and normalized to GAPDH ($n = 3$). *, $p < 0.05$, analysis of variance with Tukey's pair-wise comparison versus KCNQ4 in PA. **B**, KCNQ subunit expression in PA expressed relative to brain and heart ($n = 3$). **C**, fluorescence images of PSMCs labeled separately with three different anti-KCNQ4 antibodies, G14, S18, and N10. Staining was absent in control cells treated identically but without primary antibody (fluorescence and bright-field images of the same cell shown). Calibration bar, 20 μm.

punctate distribution and was present at the membrane. Labeling was consistently observed in PSMCs from three separate preparations, but not when the primary antibody was omitted from the incubation or was preincubated with excess antigen.

Discussion

This study demonstrates a key role for KCNQ channels, notably KCNQ4, in setting the resting membrane potential of PSMCs and regulating the intrinsic tone of PAs. We previously demonstrated a potent pulmonary vasoconstrictor action of the KCNQ channel blockers, linopirdine and XE991, on isolated vessels (Joshi et al., 2006). This study shows that the KCNQ blocking drugs preferentially constrict PAs over systemic arteries from different anatomical locations and that the pulmonary vasoconstriction results in elevated PA pressure, both in isolated lungs and in vivo. It is important that the rise in PA pressure occurred without a rise in systemic pressure, confirming a preferential action of KCNQ blockers on the pulmonary circulation.

The vasodilation produced by the KCNQ activators, retigabine and flupirtine, and their ability to antagonize the constrictor effects of KCNQ blockers, provide further evidence of a role for KCNQ channels in the pulmonary circulation. Vasodilation was endothelium-independent and inhibited by reducing the K^+ gradient across the plasmalemma, consistent with an action involving the activation of smooth muscle K^+ channels. The

vasodilation was not mediated by K_{ATP} channels because it was not prevented by glibenclamide. Retigabine and flupirtine relaxed agonist-constricted vessels with potencies comparable with their effects on KCNQ channels in other tissues. For example, flupirtine activated M-current in rat visceral sensory neurons at 10 to 20 μM (Wladyka and Kunze, 2006), and retigabine activated the M-current in sympathetic neurones, with an EC_{50} of ~1 μM (Tatulian et al., 2001). Retigabine is generally more potent than flupirtine (Blackburn-Munro et al., 2005), as found with their effects on PA.

The simplest explanation for the effects of KCNQ blockers and activators on PA is that by modulating KCNQ channels, they change the membrane potential and influence voltage-gated Ca^{2+} entry. The effects of the KCNQ modulators on isolated PSMCs confirm that they affect the background K^+ conductance and membrane potential. Both linopirdine and XE991 reduced I_{KN} and evoked membrane depolarization, whereas retigabine and flupirtine enhanced I_{KN} at negative potentials and evoked membrane hyperpolarization. The KCNQ blockers inhibited I_{KN} at potentials as low as -50 to -60 mV, implying an action on voltage-gated K^+ channels with a low activation threshold and similar to the effects of linopirdine on the neuronal M-current (Lamas et al., 1997). The ability of retigabine to enhance I_{KN} between -70 and -20 mV is also consistent with activation of a low threshold channel and is similar to its effects on the M-current in sympathetic neurons and several recombinant KCNQ channels (Tatulian et al., 2001). It is important that I_{KN} inhibition by linopirdine occurred without an effect on the delayed rectifier current, activated with short depolarizing steps from -80 mV, indicating a selective action on the slower activating, background K^+ conductance that regulates resting potential in PSMCs.

Linopirdine and XE991 evoked maximal depolarization at 10 and 1 μM, respectively, which mirrors the concentration dependence of their effects on vessel tone. These concentrations are comparable with those inhibiting the M-current in rat hippocampal neurons and sympathetic ganglia (Lamas et al., 1997; Schnee and Brown, 1998) and background K^+ current in the node of Ranvier (Schwarz et al., 2006) and visceral sensory neurons (Wladyka and Kunze, 2006) but lower than required to inhibit a range of other K^+ channels (Lamas et al., 1997; Schnee and Brown, 1998; Wang et al., 1998; Wladyka and Kunze, 2006). Nevertheless, even at maximal concentrations, linopirdine and XE991 reduced I_{KN} (at 0 mV) and membrane potential by only 40%. That is probably because more than one channel mediates I_{KN} , reflected in voltage-dependent and -independent components (Gurney and Joshi, 2006; Gurney et al., 2003; Joshi et al., 2006). We previously reported that TASK channel blockers inhibited I_{KN} and membrane potential by 50% at most, and some PSMCs failed to respond (Gurney et al., 2003), in the same way that some PSMCs failed to respond to KCNQ modulators. Thus, KCNQ and TASK channels may contribute variably to I_{KN} and resting potential in different PSMCs.

PSMCs expressed KCNQ1, KCNQ4, and KCNQ5 subunits, with KCNQ4 mRNA the most abundant. The higher expression of KCNQ4 compared with the other subunits suggests that it is most probably responsible for the pharmacological effects of KCNQ modulators on pulmonary arterial smooth muscle. The higher expression of KCNQ4 in PA compared with mesenteric artery is also consistent with KCNQ4

mediating the larger pulmonary vasoconstrictor responses to linopirdine and XE991. Therefore, KCNQ4 subunits are likely to be mediators of I_{KN} and resting potential in PSMCs. Because the pharmacology of recombinant KCNQ channels is incompletely understood (Robbins, 2001), the sensitivity of the PA channels to KCNQ modulators is of limited help in identifying the specific subunits involved. We can rule out a major contribution from homomeric KCNQ1 channels because they are insensitive to retigabine (Tatulian et al., 2001). Homomeric KCNQ4 channels are less sensitive to block by linopirdine and XE991 (Robbins, 2001) than I_{KN} and the resting potential of PSMCs. On the other hand, KCNQ channel pharmacology can be influenced by interactions with KCNE proteins and other ancillary subunits (Strutz-Seebohm et al., 2006), and we have yet to determine which, if any, of these are present in PA. It is also possible that KCNQ4 expressed in PSMCs is a specialized splice variant (Beisel et al., 2005), or it is expressed with KCNQ5 in a heteromeric channel assembly (Xu et al., 2007).

Expression of KCNQ4, with lower levels of KCNQ1 and 5, was recently reported in systemic arteries (Yeung et al., 2007; Mackie et al., 2008), and these studies did find effects of KCNQ modulators on systemic vessels. In agreement with the present work, however, XE911 was ineffective on mouse mesenteric artery and had little effect on femoral and carotid arteries, unless they were precontracted with phenylephrine (Yeung et al., 2007). Although the aorta was more responsive, constriction to 10 μ M XE991 was only 26% of the response to KCl (Yeung et al., 2007), compared with 75% at 1 μ M in PA. Perhaps lower KCNQ4 expression in systemic vessels gives rise to a smaller contribution to the resting potential, so that KCNQ channel inhibition alone provides insufficient depolarization to activate substantial voltage-gated Ca^{2+} entry. In contrast to our results and those of Yeung et al. (2007), however, linopirdine constricted mesenteric arteries mounted in a pressure myograph, albeit by only 35% of maximum (Mackie et al., 2008). Perhaps in these conditions, vessels experienced some pretone, but because vessel diameter was >300 μ m, myogenic tone was unlikely to be present (Sun et al., 1992). Harder to reconcile is the report that intravenous linopirdine raised mean arterial pressure (Mackie et al., 2008). In our study, systemic pressure was unchanged or even decreased at the highest dose of linopirdine. We cannot explain the discrepancy, but our findings concur with reports that linopirdine does not affect blood pressure in humans (Saletu et al., 1989; Pieniaszek et al., 1995).

Overall, this study implicates KCNQ channels, especially KCNQ4, as determinants of resting K^+ conductance and membrane potential in PSMCs. The results challenge the widely held view that $K_{V1.5}$ and $K_{V2.1}$ channels are the most important K^+ channels for regulating and modulating PA tone (Patel et al., 1997; Archer et al., 1998; Moudgil et al., 2006; Remillard et al., 2007) and provide evidence that KCNQ channels contribute to the regulation of PA tone in vivo. The results additionally indicate that pulmonary vasoconstriction is a potentially serious side effect of KCNQ blockers, which should be considered as a possible limitation to their development for clinical use. On the other hand, the ability of KCNQ activator drugs to dilate pulmonary arteries suggests that these drugs could provide an effective treat-

ment for lowering pulmonary vascular resistance in pulmonary hypertension.

Acknowledgments

We thank Roth Tate and Robin Plevin (University of Strathclyde, Glasgow, UK) for help with RT-PCR and AstraZeneca Pharmaceuticals (Alderley Park, Cheshire, UK) for the gift of retigabine.

References

- Archer SL, Souil E, Dinh-Xuan AT, Schremmer B, Mercier JC, El Yaagoubi A, Nguyen-Huu L, Reeve HL, and Hampf V (1998) Molecular identification of the role of voltage-gated K^+ channels, $K_{V1.5}$ and $K_{V2.1}$, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. *J Clin Invest* 101:2319–2330.
- Beisel KW, Rocha-Sanchez SM, Morris KA, Nie L, Feng F, Kachar B, Yamoah EN, and Fritsch B (2005) Differential expression of KCNQ4 in inner hair cells and sensory neurons is the basis of progressive high-frequency hearing loss. *J Neurosci* 25:9285–9293.
- Blackburn-Munro G, Dalby-Brown W, Mirza NR, Mikkelsen JD, and Blackburn-Munro RE (2005) Retigabine: chemical synthesis to clinical application. *CNS Drug Rev* 11:1–20.
- Clapp LH, Davey R, and Gurney AM (1993) ATP-sensitive K^+ channels mediate vasodilation produced by lemakalim in rabbit pulmonary artery. *Am J Physiol* 264:H1907–H1915.
- Clapp LH and Gurney AM (1992) ATP-sensitive K^+ channels regulate resting potential of pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol* 262:H916–H920.
- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, et al. (1999) Molecular diversity of K^+ channels. *Ann N Y Acad Sci* 868:233–285.
- Dalby-Brown W, Hansen HH, Korsgaard MP, Mirza N, and Olesen SP (2006) K_7 channels: function, pharmacology and channel modulators. *Curr Top Med Chem* 6:999–1023.
- Evans AM, Osipenko ON, and Gurney AM (1996) Properties of a novel K^+ current that is active at resting potential in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells. *J Physiol* 496:407–420.
- Gönczi M, Szentandrassy N, Johnson IT, Heagerty AM, and Weston AH (2006) Investigation of the role of TASK-2 channels in rat pulmonary arteries: pharmacological and functional studies following RNA interference procedures. *Br J Pharmacol* 147:496–505.
- Gurney AM and Joshi S (2006) The role of twin pore domain and other K^+ channels in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Novartis Found Symp* 272:218–228; discussion 228–233, 274–279.
- Gurney AM, Osipenko ON, MacMillan D, McFarlane KM, Tate RJ, and Kempshall FE (2003) Two-pore domain K channel, TASK-1, in pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 93:957–964.
- Hara Y, Kitamura, and Kuriyama H (1980) Actions of 4-aminopyridine on vascular smooth muscle tissues of the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 68:99–106.
- Hasunuma K, Rodman DM, and McMurty IF (1991) Effects of K^+ channel blockers on vascular tone in the perfused rat lung. *Am Rev Respir Dis* 144:884–887.
- Herget J and McMurty IF (1987) Dexamethasone potentiates hypoxic vasoconstriction in salt solution-perfused rat lungs. *Am J Physiol* 253:H574–H581.
- Institute of Laboratory Animal Resources (1996) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 7th ed, Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, Washington, DC.
- Joshi S, Balan P, and Gurney AM (2006) Pulmonary vasoconstrictor action of KCNQ potassium channel blockers. *Respir Res* 7:31–41.
- Lamas JA, Selyanko AA, and Brown DA (1997) Effects of a cognition-enhancer, linopirdine (DuP 996), on M-type potassium currents (I_{KM}) and some other voltage- and ligand-gated membrane currents in rat sympathetic neurons. *Eur J Neurosci* 9:605–616.
- Mackie AR, Bruggemann LI, Henderson KK, Shiels AJ, Cribbs LL, Scroggin KE, and Byron KL (2008) Vascular KCNQ potassium channels as novel targets for the control of mesenteric artery constriction by vasopressin, based on studies in single cells, pressurized arteries, and in vivo measurements of mesenteric vascular resistance. *J Pharmacol Exp Ther* 325:475–483.
- Moudgil R, Michelakis ED, and Archer SL (2006) The role of K^+ channels in determining pulmonary vascular tone, oxygen sensing, cell proliferation, and apoptosis: implications in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary arterial hypertension. *Microcirculation* 13:615–632.
- Ohya S, Sergeant GP, Greenwood IA, and Horowitz B (2003) Molecular variants of KCNQ channels expressed in murine portal vein myocytes: a role in delayed rectifier current. *Circ Res* 92:1016–1023.
- Oliver D, Knipper M, Derst C, and Fakler B (2003) Resting potential and submembrane calcium concentration of inner hair cells in the isolated mouse cochlea are set by KCNQ-type potassium channels. *J Neurosci* 23:2141–2149.
- Olschewski A, Li Y, Tang B, Hanze J, Eul B, Bohle RM, Wilhelm J, Morty RE, Brau ME, Weir EK, et al. (2006) Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 98:1072–1080.
- Osipenko ON, Alexander D, MacLean MR, and Gurney AM (1998) Influence of chronic hypoxia on the contributions of non-inactivating and delayed rectifier K currents to the resting potential and tone of rat pulmonary artery smooth muscle. *Br J Pharmacol* 124:1335–1337.
- Osipenko ON, Evans AM, and Gurney AM (1997) Regulation of the resting potential of rabbit pulmonary artery myocytes by a low threshold, O_2 -sensing potassium current. *Br J Pharmacol* 120:1461–1470.
- Patel AJ, Lazdunski M, and Honoré E (1997) $K_{V2.1}/K_{V9.3}$, a novel ATP-dependent

- delayed-rectifier K⁺ channel in oxygen-sensitive pulmonary artery myocytes. *EMBO J* 16:6615–6625.
- Pieniaszek HJ Jr, Fiske WD, Saxton TD, Kim YS, Garner DM, Xilinas M, and Martz R (1995) Single-dose pharmacokinetics, safety, and tolerance of linopirdine (DuP 996) in healthy young adults and elderly volunteers. *J Clin Pharmacol* 35:22–30.
- Rakestraw DC, Bilski DA, and Lam GN (1994) Determination of linopirdine and its N-oxide metabolites in rat plasma by liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 12:1055–1061.
- Remillard CV, Tigno DD, Platoshyn O, Burg ED, Brevnova EE, Conger D, Nicholson A, Rana BK, Channick RN, Rubin LJ, et al. (2007) Function of Kv1.5 channels and genetic variations of KCNA5 in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C1837–C1853.
- Robbins J (2001) KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Ther* 90:1–19.
- Saletu B, Darragh A, Salmon P, and Coen R (1989) EEG brain mapping in evaluating the time-course of the central action of DUP 996: a new acetylcholine releasing drug. *Br J Clin Pharmacol* 28:1–16.
- Schnee ME and Brown BS (1998) Selectivity of linopirdine (DuP 996), a neurotransmitter release enhancer, in blocking voltage-dependent and calcium-activated potassium currents in hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 286:709–717.
- Schwarz JR, Glassmeier G, Cooper EC, Kao TC, Nodera H, Tabuena D, Kaji R, and Bostock H (2006) KCNQ channels mediate I_{Kr}, a slow K⁺ current regulating excitability in the rat node of Ranvier. *J Physiol* 573:17–34.
- Strutz-Seebom N, Seebom G, Fedorenko O, Baltaev R, Engel J, Knirsch M, and Lang F (2006) Functional coassembly of KCNQ4 with KCNE-β-subunits in *Xenopus* oocytes. *Cell Physiol Biochem* 18:57–66.
- Sun D, Messina EJ, Kaley G, and Koller A (1992) Characteristics and origin of myogenic response in isolated mesenteric arterioles. *Am J Physiol* 263:H1486–H1491.
- Tatulian L, Delmas P, Abogadie FC, and Brown DA (2001) Activation of expressed KCNQ potassium currents and native neuronal M-type potassium currents by the anti-convulsant drug retigabine. *J Neurosci* 21:5535–5545.
- Wang HS, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, Dixon JE, and McKinnon D (1998) KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282:1890–1893.
- Wickenden AD, Zou A, Wagoner PK, and Jegla T (2001) Characterization of KCNQ5/Q3 potassium channels expressed in mammalian cells. *Br J Pharmacol* 132:381–384.
- Wladyka CL and Kunze DL (2006) KCNQ/M-currents contribute to the resting membrane potential in rat visceral sensory neurons. *J Physiol* 575:175–189.
- Xu T, Nie L, Zhang Y, Mo J, Feng W, Wei D, Petrov E, Calisto LE, Kachar B, Beisel KW, et al. (2007) Roles of alternative splicing in the functional properties of inner ear-specific KCNQ4 channels. *J Biol Chem* 282:23899–23909.
- Yeung SY, Pucovsky V, Moffatt JD, Saldanha L, Schwake M, Ohya S, and Greenwood IA (2007) Molecular expression and pharmacological identification of a role for K_v7 channels in murine vascular reactivity. *Br J Pharmacol* 151:758–770.

Address correspondence to: Alison M Gurney, Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Floor 2, Core Technology Facility, 46 Grafton Street, Manchester, UK M13 9NT. E-mail: alison.gurney@manchester.ac.uk

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

Vojtech Sedivy,^{1,4} Shreena Joshi,² Youssef Ghaly,¹ Roman Mizera,¹ Marie Zaloudikova,³ Sean Brennan,² Jana Novotna,⁵ Jan Herget,¹ and Alison M. Gurney²

¹Department of Physiology, Charles University - Second Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic; ²Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Manchester, United Kingdom; ³Department of Pathophysiology, Charles University - Second Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic; ⁴Department of Paediatrics, Charles University - Second Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; and ⁵Department of Biochemistry, Charles University - Second Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic

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

Sedivy V, Joshi S, Ghaly Y, Mizera R, Zaloudikova M, Brennan S, Novotna J, Herget J, Gurney AM. Role of Kv7 channels in responses of the pulmonary circulation to hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 308: L48–L57, 2015. First published October 31, 2014; doi:10.1152/ajplung.00362.2013.—Hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) is a beneficial mechanism that diverts blood from hypoxic alveoli to better ventilated areas of the lung, but breathing hypoxic air causes the pulmonary circulation to become hypertensive. Responses to airway hypoxia are associated with depolarization of smooth muscle cells in the pulmonary arteries and reduced activity of K⁺ channels. As Kv7 channels have been proposed to play a key role in regulating the smooth muscle membrane potential, we investigated their involvement in the development of HPV and hypoxia-induced pulmonary hypertension. Vascular effects of the selective Kv7 blocker, linopirdine, and Kv7 activator, flupirtine, were investigated in isolated, saline-perfused lungs from rats maintained for 3–5 days in an isobaric hypoxic chamber (F_iO₂ = 0.1) or room air. Linopirdine increased vascular resistance in lungs from normoxic, but not hypoxic rats. This effect was associated with reduced mRNA expression of the Kv7.4 channel α -subunit in hypoxic arteries, whereas Kv7.1 and Kv7.5 were unaffected. Flupirtine had no effect in normoxic lungs but reduced vascular resistance in hypoxic lungs. Moreover, oral dosing with flupirtine (30 mg/kg/day) prevented short-term in vivo hypoxia from increasing pulmonary vascular resistance and sensitizing the arteries to acute hypoxia. These findings suggest a protective role for Kv7.4 channels in the pulmonary circulation, limiting its reactivity to pressor agents and preventing hypoxia-induced pulmonary hypertension. They also provide further support for the therapeutic potential of Kv7 activators in pulmonary vascular disease.

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

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

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

to which this contributes to HPV is controversial, opinions ranging from essentially no role (46) to its being a key initiator of HPV (3, 32, 34). Whether or not depolarization is required for HPV, it is clear that it has the potential to promote or enhance the response. With a sufficiently large depolarization, the membrane potential will reach the threshold for L-type Ca²⁺ channel activation (5), causing Ca²⁺ influx and promoting vasoconstriction. The nature of the K⁺ channels contributing to hypoxia-induced depolarization is also debated. Voltage-gated Kv1.5 and Kv2.1/9.3 channels have both been implicated (2–3, 32), as have voltage-independent, two-pore domain TASK channels (12, 38). Kv7 channels are new potential candidates, because several genes encoding Kv7 channel α -subunits (KCNQ1, KCNQ4, and KCNQ5) are expressed in PASMC and the channels appear to be active at the resting membrane potential (24, 25). This was demonstrated by the selective Kv7 channel inhibitors, linopirdine and XE991, causing pulmonary selective, endothelium-independent, but Ca²⁺-influx dependent vasoconstriction (24). The low voltage threshold for activation of Kv7 channels and their lack of inactivation during sustained depolarization suit Kv7 channels to a role in regulating the resting membrane potential (13). The susceptibility of Kv7 channels to pharmacological manipulation additionally makes them an attractive therapeutic drug target.

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

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

the development of HPH in mice exposed chronically to hypoxia (35).

This study investigated the role of Kv7 channel activity in the reaction of the rat pulmonary vascular bed to acute and short-term (3–5 days) hypoxia, in isolated, saline-perfused lungs. This preparation develops large pressor responses to airways hypoxia, but only if the lungs are first prestimulated, or primed, with a vasoactive substance that raises the basal perfusion pressure and overall vasoreactivity (16, 18, 33). The mechanism responsible for this priming effect is unknown, but it can be induced by the nonspecific Kv channel inhibitor 4-aminopyridine (4-AP) and other agents promoting smooth muscle depolarization and Ca^{2+} influx (15, 33). The ability of the Kv7 blocker, linopirdine, to modulate HPV was therefore investigated in both priming of the lungs to hypoxia and the steady-state HPV in preprimed, saline-perfused lungs. To assess the potential involvement of Kv7 channels in the development of HPH, we investigated how *in vivo* exposure to hypoxia for 3–5 days affects Kv7 channel expression and the responsiveness of the pulmonary circulation to Kv7 modulators. This period corresponds to the earliest time that structural changes and a rise in mean pulmonary artery pressure can be detected (19, 44). The mechanisms investigated may differ from those operating in established PH but are likely to be important during the onset of disease. In each case pulmonary vascular resistance, which is elevated in hypoxic rats (7), was measured from the slope of the pressure-flow (P/Q) relationship. Oral dosing with flupirtine assessed its ability to prevent early changes in pulmonary vascular reactivity that take place during the development of HPH in rats.

METHODS

Experiments employed male Wistar rats aged 1–2 mo, weighing 290 ± 10 g (Biotest, Konarovice, Czech Republic) and were approved by the Animal Studies Committee at Charles University Second Medical School, in accordance with European Community and US National Institutes of Health guidelines for using experimental animals. Experiments on isolated lungs and *in vivo* exposure to hypoxia (normobaric chamber, FiO_2 0.1) were carried out in Prague. Arteries from lungs excised in Prague were either snap-frozen in liquid nitrogen for later protein extraction, stored in RNAlater (Life Technologies, Paisley, UK) for mRNA analysis, or mounted in paraffin blocks for sectioning and immunolabeling. Samples were shipped to Manchester for analysis.

Isolated saline perfused rat lungs. Isolated perfused rat lungs were prepared as described previously (17). Rats were anaesthetized (50 mg/kg *ip* thiopental) and ventilated through a tracheal cannula [peak inspiratory pressure 10 cmH_2O , positive end-expiratory pressure (PEEP) 2 $\text{cm H}_2\text{O}$, 50 breaths/min]. The chest was opened, heparin introduced into the right ventricle, and the pulmonary artery and left ventricle cannulated. The heart-lung block was placed into a humidified chamber and maintained at 38°C. The lungs were ventilated with a normoxic gas mixture, containing 21% O_2 and 5% CO_2 , balanced with N_2 . The lung circulation was perfused with a physiological salt solution (PSS) containing albumin (4 g/100 ml perfusate) via the pulmonary artery, using a peristaltic pump. The perfusate dropped freely from the left ventricle cannula into a reservoir, from which it was pumped again into the pulmonary artery. PSS contained in mM: 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.16 MgSO_4 , 17 NaHCO_3 , 1.18 KH_2PO_4 , 3.2 CaCl_2 , and 5.5 D-glucose. The potentially confounding effects of endothelial vasoactive mediators like nitric oxide (NO) and prostaglandins were prevented by including inhibitors of their synthesis [17 μM meclofenamate and 50 μM nitro-L-arginine-methyl-ester (L-

NAME)] in the perfusate. Although meclofenamate activates neuronal Kv7 channels comprising KCNQ2/3 subunits with an EC_{50} of 20 μM (40), it was reported to have no effect on vasoconstriction induced by the linopirdine analog XE991 (54). Meclofenamate is not therefore expected to interfere with the vascular action of linopirdine in isolated lungs. On the other hand, because meclofenamate can dilate isolated arteries, possibly as a consequence of activating Kv7 channels (54), we omitted this drug from the perfusate when testing the effects of the Kv7 activator, flupirtine.

Isolated lung protocols. When investigating the effects of linopirdine on the pulmonary perfusion pressure and its response to stimulation, we perfused lungs at a constant flow rate of 4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100$ g^{-1} . Changes in perfusion pressure therefore directly reflected changes in vascular resistance. The relationship between pulmonary perfusion pressure and perfusion flow (P/Q plot) was measured by increasing flow in a stepwise manner until it reached ~150% of the basal level. Lungs were not ventilated during this protocol and the alveolar pressure was 2 cmH_2O (PEEP). Before beginning P/Q measurements the lungs were perfused with PSS for 15 min to ensure a stable perfusion pressure, followed by priming with two cycles of angiotensin II application (0.2 μg added into the inflow cannula) followed by ventilation for 7 min with a hypoxic gas mixture (0% O_2 , 5% CO_2 , 95% N_2) to induce HPV. After linopirdine or flupirtine was added to the perfusate the drugs could not be washed out to test for recovery. We therefore investigated drug effects by comparing groups of untreated lungs with treated lungs.

The effect of linopirdine on the responsiveness of the pulmonary circulation to hypoxia was first investigated in lungs that had been continually perfused with PSS for various periods but not primed with any vasoconstrictor stimulus. Linopirdine (230 μg) was administered as a bolus injection into the inflow cannula at the start of the experiment to give an effective concentration of ~12 μM . This concentration was maximally effective at constricting rat pulmonary arteries *in vitro* (24) and within the range of EC_{50} values reported for Kv7 channel inhibition (45), while having little effect on a wide range of other ion channels (27, 36, 52, 53). Hypoxic pressor responses were elicited after 15, 30, and 65 min of lung perfusion by switching the ventilation gas mixture. HPV was then compared between lungs exposed to linopirdine ($n = 6$) and untreated, control lungs ($n = 5$).

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

The effects of flupirtine were tested on isolated lungs that had been primed by two cycles of angiotensin II followed by acute airways hypoxia. Flupirtine was added to the reservoir to give a circulating concentration of 20 μM . At this concentration flupirtine evokes nearly 50% of its maximum pulmonary vasodilator effect (25) and activates Kv7 channels, while having minimal effects on a number of other ion channels (26). Higher concentrations were not tested, because even at 20 μM , flupirtine caused partial inhibition of Ca^{2+} channel currents in bladder smooth muscle cells (1).

In vivo treatment. This part of the study was designed to investigate the *in vivo* effects of the Kv7 activator flupirtine on hypoxic pulmonary hypertension induced by ventilatory hypoxia. Groups of rats

were exposed to an hypoxic environment by maintaining them in an isobaric hypoxic chamber (F_{IO_2} 0.1) for 5 days (14). An age-matched control group of rats was kept in room air (normoxia, $n = 6$). One group of rats exposed to hypoxia was administered flupirtine 15 mg/kg twice a day by gavage ($n = 6$) throughout the exposure period. As flupirtine was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), a further group exposed to hypoxia was administered the same volume of DMSO as a vehicle control ($n = 6$). A third group (hypoxia control) was exposed to hypoxia but received no other treatment ($n = 6$). At the end of the treatment period, isolated perfused lungs were prepared as above for subsequent *in vitro* experiments.

mRNA analysis. As many intrapulmonary arteries as possible were dissected from rat lungs and used for the extraction of total RNA with an RNeasy Micro Kit (Qiagen). Real-time quantitative PCR was performed on cDNA synthesized from the DNase-treated RNA. Primers were designed with Gene Runner software (version 3, Hasting software) and Vector NTI (Invitrogen) for KCNQ1, KCNQ4 and KCNQ5, using GenBank sequences with the respective accession numbers NM_0320773, XM_233477, and XM_237012. Where possible, primers were designed to span introns, to detect any contamination by genomic DNA. The primer sequences are listed in Table 1. Reactions were carried out in 25 μ l volumes containing 1 μ l cDNA, 12.5 μ l SYBR Green master mix, 10 μ l H₂O, and 7.5 pmol of each primer, using an Applied Biosystems 7500 PCR system, according to the manufacturer's instructions. Amplicons were 77–106 bp long. The cycling parameters were 95°C for 15 min, followed by 40 cycles at 95°C for 1 min, 58°C for 40 s, and 68°C for 40 s. A dissociation step was performed at the end of the reaction for melting curve analysis, a single peak in the curve representing specific production of the product. ABI 7500 software was used for data analysis. An absolute quantification method was used, in which we determined the input copy number by relating the PCR signal to a standard curve. Expression levels were then normalized against the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, measured simultaneously in the same samples using the primers listed in Table 1. Experiments were carried out in triplicate from the pooled RNA of three rats exposed to normoxia or hypoxia.

Protein expression. Kv7.4 protein expression was measured in arteries from control rats, rats exposed to hypoxia for 4 days, and rats administered flupirtine (30 mg/kg/day) for 1 day before and during exposure to hypoxia for 4 days ($n = 4$). As many arteries as possible were collected from each lung and homogenized with a Wheaton glass tissue grinder (VWR International, Lutterworth, UK) in ice-cold RIPA buffer, containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 1 \times cOmplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Burgess Hill, UK). Samples were centrifuged at 1,000 g for 2 min, and we analyzed the supernatant by Western blotting after determining the total protein concentration using a BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Cramlington, UK). Supernatant samples were incubated for 7 min at 95°C with Laemmli loading buffer containing 25 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 2% SDS, and 0.04% bromophenol blue. Proteins were

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

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

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

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

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

Gene	GenBank Accession Number	Primer Pair Sequences (5'-3') Forward; Reverse	Span Region
KCNQ1	NM_032073	GGCTCTGGGTTTGCACCTG; CATAGCACCTCCATGGAGTC	1131–1236
KCNQ4	XM_233477	CCCGGCTGCTCTACTGAG; ATCAGATCATCCACCGTGAG	1181–1266
KCNQ5	NM_001134643	CGAGACAACGACAGATGACC; TGGATTCAATGGATTGTACCTG	2012–2088
GAPDH	NM_017008	CCATCAAGGACCCCTTCATT; CACCAGGATGACCCATT	164–343

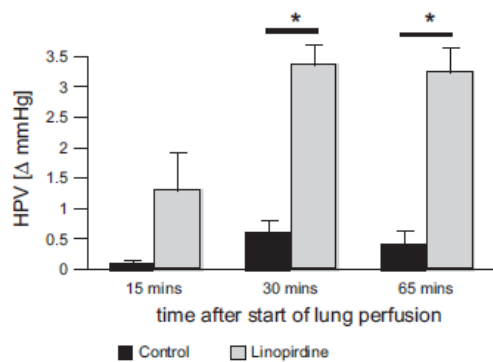


Fig. 1. Linopirdine primes hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) in saline-perfused rat lungs. HPV response measured in unprimed lungs 15, 30, or 65 min after bolus injection of 230 μ g linopirdine into the inflow cannula to give an effective concentration of \sim 12 μ M (gray, $n = 6$) and in time-matched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

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

Drugs. Linopirdine dihydrochloride and flupirtine maleate were purchased from Tocris Bioscience and prepared as 10 mM stock solutions dissolved, respectively, in water or DMSO. Aliquots of the stock solutions were stored frozen and thawed once for each experiment. All other drugs were from Sigma Aldrich. 4-AP was dissolved in PSS and 0.2 ml added to 40 ml of circulating perfusate for each lung preparation.

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

RESULTS

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

Linopirdine potentiates HPV in primed lungs. The effects of linopirdine on primed lungs are summarized in Fig. 2. Before Kv channel blockers were administered, the basal perfusion pressure and the reactivity to angiotensin II and hypoxia did not differ between the groups at any time point. The administration of linopirdine to primed lungs, either on its own or with 4-AP, caused an increase in basal perfusion pressure (Fig. 2A), reflecting its vasoconstrictor action. The rise in pressure caused by linopirdine alone was the same in both groups: 1.4 ± 0.24

mmHg ($n = 6$) in lungs exposed to linopirdine only and 2.0 ± 0.7 mmHg ($n = 6$) in lungs that were later exposed to 4-AP as well. The addition of 4-AP caused a further increase in perfusion pressure, of 4.3 ± 0.37 mmHg over and above that induced by linopirdine.

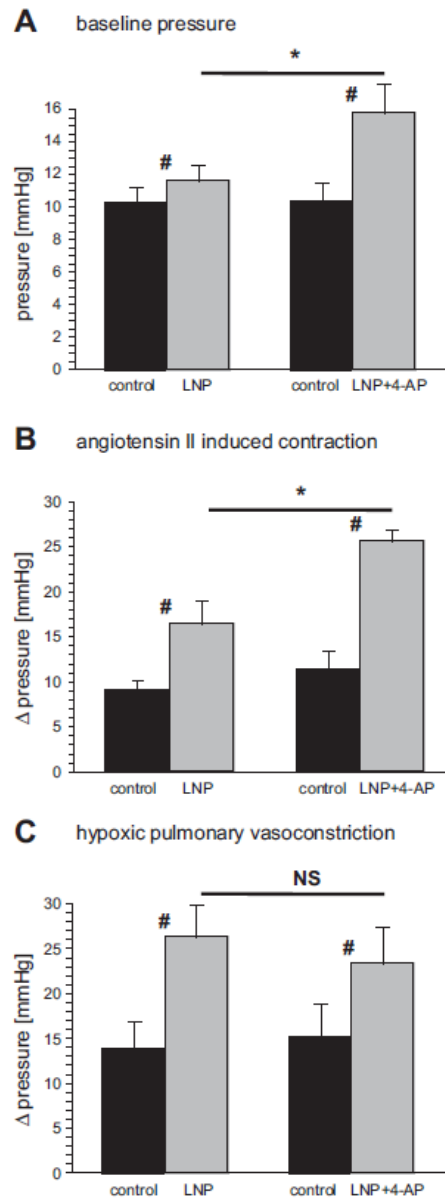


Fig. 2. Kv channel inhibition modulates pulmonary vascular responses to hypoxia and angiotensin II in primed lungs. Baseline perfusion pressure (A), angiotensin II-induced vasoconstriction (B), and HPV (C) measured in primed lungs before (control, black bars) and after exposure to 12 μ M linopirdine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

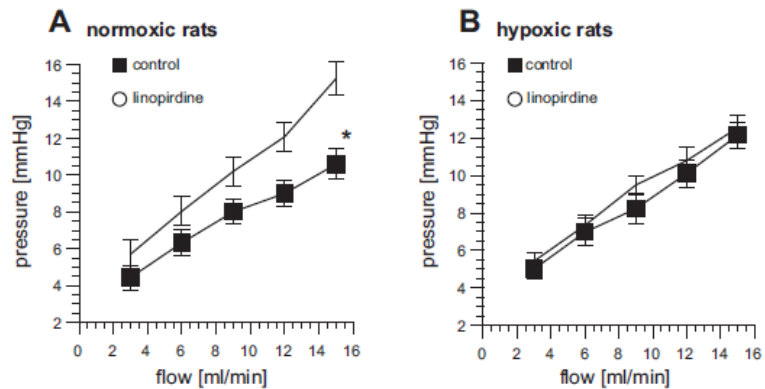


Fig. 3. Loss of response to linopirdine in chronic hypoxia. Pressure-flow (P/Q) plots measured in primed lungs from normoxic (A) and 3-day hypoxic (B) rats in control conditions and after exposure to linopirdine (10 μ M). * $P < 0.05$ linopirdine vs. control; $n = 6$ for each group.

The pressor response to angiotensin II in primed lungs was enhanced by linopirdine, and it was further enhanced when 4-AP was added (Fig. 2B). In contrast, although HPV was potentiated by the Kv channel blockers, the addition of 4-AP did not cause any greater increase than that produced by linopirdine on its own (Fig. 2C). Linopirdine caused the pressor response to hypoxia to increase from 14 ± 3 to 26 ± 4 mmHg ($P < 0.05$, paired t -test). With the combined administration of linopirdine and 4-AP, the pressor response to hypoxia increased from 15 ± 4 to 23 ± 4 mmHg (paired t -test, $P < 0.05$), which was not significantly different from that seen with linopirdine alone.

Loss of Kv7 channel activity early in the development of HPH. The P/Q relationships measured during stepwise increases in flow rate were linear ($R^2 > 0.94$) in all primed lungs studied, whether from rats exposed for 3–5 days to isobaric hypoxia or maintained in a normoxic environment. The slope of the line corresponds to incremental flow resistance and the pressure axis intercept to the average critical closing pressure (41, 48). The P/Q relationships measured in normoxic lungs ($n = 6$) and 3-day hypoxic lungs ($n = 6$) did not differ significantly (Fig. 3; compare normoxic control in A with hypoxic control in B). The ability of linopirdine to constrict pulmonary vessels in primed lungs was, however, lost in the hypoxic rats. Although linopirdine caused a significant eleva-

tion of the baseline pulmonary perfusion pressure in the lungs of rats exposed to normoxic air, it had no effect in the lungs from matched hypoxic rats. This difference is apparent in the P/Q relationships measured before and 10 min after the addition of linopirdine (10 μ M) to the reservoir (Fig. 3): two-factor ANOVA indicates a significant effect in control, but not hypoxic lungs. Linopirdine increased the slope of the P/Q relationship in normoxic lungs from 0.49 ± 0.01 to 0.81 ± 0.08 mmHg·min/ml ($P < 0.05$, paired t -test), without changing the intercept with the pressure axis (Fig. 3A). Neither the slope nor the pressure intercept in hypoxic lungs were affected by linopirdine (Fig. 3B).

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

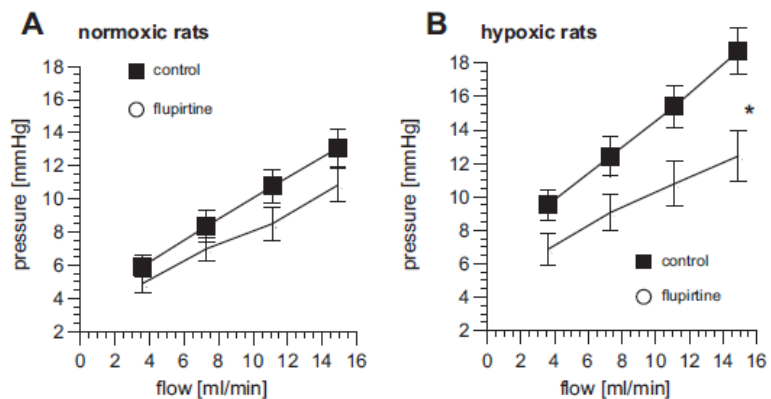


Fig. 4. Flupirtine causes pulmonary vasodilatation in chronic hypoxia. Effect of flupirtine (20 μ M) on P/Q plots measured in primed lungs from normoxic controls (A) and rats exposed for 5 days to hypoxia (B). * $P < 0.05$ flupirtine vs. control; $n = 5$ for each group.

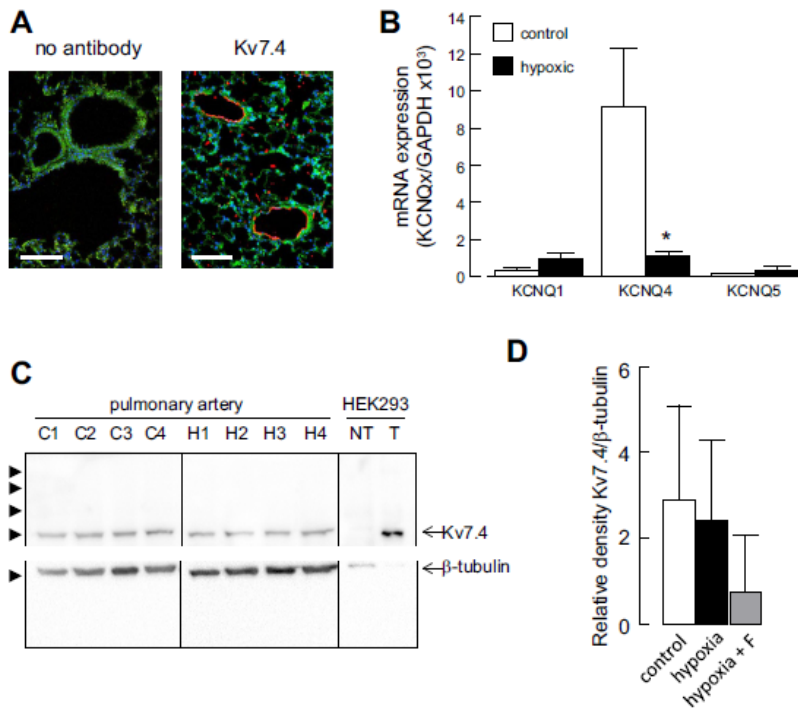


Fig. 5. Hypoxia downregulates Kv7.4 mRNA expression. **A:** fluorescence images of lung sections from normoxic rats showing auto-fluorescence (green) and labeling with an anti-Kv7.4 antibody (red) and the nuclear marker 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue). Sections were treated identically, except for omission of the Kv7.4 antibody in the control. Calibration bars 100 μ m. **B:** expression profile of KCNQ1, KCNQ4, and KCNQ5 subunit mRNAs in rat pulmonary artery from rats maintained in a normoxic (control) or hypoxic environment for 3 days. Detected with quantitative RT-PCR and normalized to the expression of GAPDH ($n = 3$). * $P < 0.05$ hypoxic vs. control. **C:** Western blots of pulmonary artery proteins from 5 separate normoxic (C1–C4) and hypoxic (H1–H4) rats and proteins from nontransfected HEK-293T cells (NT) and HEK-293T cells overexpressing Kv7.4 channels (T). Proteins were separated on a 10% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane, which was cut between the 50 and 75 kDa markers and probed separately with antibodies against Kv7.4 and β -tubulin. Arrowheads indicate the positions of molecular weight markers (kDa). **D:** densitometric analysis of Western blots showing Kv7.4 expression normalized to β -tubulin in arteries from normoxic (control) and hypoxic rats, as well as rats administered flupirtine (F, 30 mg/kg/day) and exposed to hypoxia for 5 days ($n = 4$).

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

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

protein (measured relative to β -tubulin) in vessels from hypoxic rats, whether or not they were administered flupirtine (Fig. 5D).

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

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

Group	P/Q Slope, mmHg·min/ml	P/Q Intercept, mmHg	HPV, Δ mmHg	ANG II Constriction, Δ mmHg	NOx in Plasma, μ M
Normoxia	0.541 ± 0.052	3.6 ± 0.7	5.3 ± 1.0	5.6 ± 0.6	26.0 ± 2.5
Hypoxia	$0.672 \pm 0.05^*$	3.7 ± 0.4	$8.5 \pm 1.1^*$	$9.3 \pm 1.3^*$	$46.6 \pm 8.3^*$
Hypoxia + flupirtine	$0.475 \pm 0.022^\ddagger$	5.3 ± 0.5	$4.9 \pm 1.0^\ddagger$	$11.7 \pm 1.4^*$	$47.5 \pm 2.6^*$
Hypoxia + vehicle	$0.678 \pm 0.111^*$	3.6 ± 1.1	$9.6 \pm 1.4^*$	$9.0 \pm 0.8^*$	$40.0 \pm 2.5^*$

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

vasoconstriction to angiotensin II was potentiated in all groups exposed to hypoxia (Table 2).

Plasma NO levels. Kv7 activators dilate pulmonary arteries through a direct action on smooth muscle (25). Activators of K_{ATP} channels also dilate pulmonary arteries by hyperpolarizing the smooth muscle (4) and inhibit HPH (37). Recent studies suggest, however, that the effectiveness of K_{ATP} channel activators in HPH may be due to an action on endothelial K_{ATP} channels, which rescues NO production from the dysfunction induced by hypoxia (57). As Kv7 channel expression in endothelial cells has not been addressed, we tested the possible involvement of such an effect in the response to short-term *in vivo* hypoxia and the protective effect of flupirtine by measuring plasma levels of NO and its oxidation products (NOx). Table 2 shows that the plasma concentration of NOx was increased in all groups of rats exposed to hypoxia, but it was unaffected by flupirtine.

DISCUSSION

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

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

We previously reported that blockade of Kv7 channels with linopirdine (0.5–10 μ M) causes dose-dependent vasoconstriction in saline-perfused rat lungs (25), consistent with Kv7 channels being open and contributing to the PASMCM resting potential. In that study, we tested linopirdine after priming the

lungs with cycles of angiotensin II-hypoxia stimulation. We have now found that without priming, linopirdine (at 12 μ M) does not cause a detectable change in the baseline pulmonary perfusion pressure. In this respect linopirdine behaves much like hypoxia, which only raises pulmonary artery pressure in saline-perfused lungs after they have been primed with a substance that enhances vasoreactivity (33). Interestingly, despite the lack of effect of linopirdine on the baseline perfusion pressure in unprimed lungs, it was able to prime the lungs for HPV, causing marked enhancement of the HPV response. The most likely explanation for this is that linopirdine depolarized the PASMCM, thereby facilitating the effects of hypoxia, but the depolarization was too small by itself to activate sufficient Ca^{2+} influx for contraction (5).

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

The increase in perfusion pressure induced by linopirdine in primed lungs was due to vasoconstriction and an increase in pulmonary vascular resistance, because it was accompanied by an increase in the slope of the P/Q relationship. This agrees with its vasoconstrictor effect on isolated pulmonary artery, where it was measured after routine priming with repeated exposure to KCl (24). The pressor response to linopirdine could be further potentiated by 4-AP. At the concentration tested (12 μ M), linopirdine is maximally effective on isolated rat pulmonary arteries (24), and 3 mM 4-AP is expected to

fully block 4-AP-sensitive Kv channels (6). The additive nature of their effects on pulmonary perfusion pressure is consistent with the drugs acting through independent mechanisms, most likely by inhibiting different ion channels to give an additive effect on membrane potential.

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

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

The Kv7 activator, flupirtine, had little effect on the perfusion pressure recorded from primed normoxic lungs. This probably reflects the low basal pulmonary vascular tone in these lungs, because to see a dilator effect on rat isolated artery preparations it was necessary to precontract the vessels (25). Interestingly, despite the apparent loss of functional Kv7.4 channels in hypoxic lungs, flupirtine produced a drop in pulmonary perfusion pressure, due to reduced vascular resistance. The ability to evoke vasodilation probably reflects raised intrinsic tone in the hypoxic lungs, but the mechanism is less

clear. One possibility is that the loss of expression of Kv7 function and/or another K^+ channel (21) led to an increase in membrane resistance, thereby amplifying the hyperpolarization produced by activating a small number of Kv7 channels. Direct evidence for altered membrane resistance in response to hypoxia is lacking, but a decrease in resistance seems more likely (49). Although flupirtine could have produced its effects by activating residual Kv7.4 channels, activation of Kv7.5 channels or a heterologous combination of Kv7.4/7.5 is also possible. Flupirtine does not activate Kv7.1 channels (45), so although they are expressed in pulmonary artery, Kv7.1 channels could not mediate the drug's effects. Blockade of Ca^{2+} channels could also contribute to the dilator action of flupirtine, because both flupirtine (at 20 μ M) and its structural analog retigabine have been reported to cause inhibition of Ca^{2+} channel currents in smooth muscle cells (31).

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

ACKNOWLEDGMENTS

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

GRANTS

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

DISCLOSURES

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

AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

REFERENCES

- Anderson UA, Carson C, Johnston L, Joshi S, Gurney AM, McCloskey KD. Functional expression of KCNQ (Kv 7) channels in guinea pig bladder smooth muscle and their contribution to spontaneous activity. *Br J Pharmacol* 169: 1290–1304, 2013.
- Archer SL, Souil E, Dinh-Xuan AT, Schremmer B, Mercier JC, El Yaagoubi A, Nguyen-Huu L, Reeve HL, Hampl V. Molecular identifi-

- cation 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, 1998.
3. Archer SL, Weir EK, Reeve HL, Michelakis E. Molecular identification of O₂ sensors and O₂-sensitive potassium channels in the pulmonary circulation. *Adv Exp Med Biol* 475: 219–240, 2000.
 4. Clapp LH, Gurney AM. ATP-sensitive K⁺ channels regulate resting potential of pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 262: H916–H920, 1992.
 5. Clapp LH, Gurney AM. Modulation of calcium movements by nitroprusside in isolated vascular smooth muscle cells. *Pflügers Arch* 418: 462–470, 1991.
 6. Cox RH. Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle. *Cell Biochem Biophys* 42: 167–195, 2005.
 7. Emery CJ, Bee D, Barer GR. Mechanical properties and reactivity of vessels in isolated perfused lungs of chronically hypoxic rats. *Clin Sci (Lond)* 61: 569–580, 1981.
 8. Fike CD, Pfister SL, Slaughter JC, Kaplowitz MR, Zhang Y, Zeng H, Frye NR, Aschner JL. Protein complex formation with heat shock protein 90 in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in newborn piglets. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H1190–H1204, 2010.
 9. Fishman AP. Hypoxia on the pulmonary circulation. How and where it acts. *Circ Res* 38: 221–231, 1976.
 10. Gao Y, Yechikov S, Vazquez AE, Chen D, Nie L. Distinct roles of molecular chaperones HSP90alpha and HSP90beta in the biogenesis of KCNQ4 channels. *PLoS One* 8: e57282, 2013.
 11. Gurney AM. Multiple sites of oxygen sensing and their contributions to hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Respir Physiol Neurobiol* 132: 43–53, 2002.
 12. Gurney AM, Joshi S. The role of twin pore domain and other K⁺ channels in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Novartis Found Symp* 272: 218–228, 2006.
 13. Gurney AM, Joshi S, Manoury B. KCNQ potassium channels: new targets for pulmonary vasodilator drugs? *Adv Exp Med Biol* 661: 405–417, 2010.
 14. Hampl V, Herget J. Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia. *Am Rev Respir Dis* 142: 619–624, 1990.
 15. Hasunuma K, Rodman DM, McMurtry IF. Effects of K⁺ channel blockers on vascular tone in the perfused rat lung. *Am Rev Respir Dis* 144: 884–887, 1991.
 16. Herget J, Chovanec M. Isolated perfused murine lung: a well characterized preparation for studying lung vascular function. *Drug Discov Today Dis Models* 7: 131–135, 2010.
 17. Herget J, Hampl V, Povysilova V, Slavik Z. Long-term effects of prenatal indomethacin administration on the pulmonary circulation in rats. *Eur Respir J* 8: 209–215, 1995.
 18. Herget J, McMurtry IF. Dexamethasone potentiates hypoxic vasoconstriction in salt solution-perfused rat lungs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 253: H574–H581, 1987.
 19. Hislop A, Reid L. New findings in pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Br J Exp Pathol* 57: 542–554, 1976.
 20. Hodyc D, Johnson E, Skoumalova A, Tkaczyk J, Maxova H, Vizek M, Herget J. Reactive oxygen species production in the early and later stage of chronic ventilatory hypoxia. *Physiol Res* 61: 145–151, 2012.
 21. Hong Z, Weir EK, Nelson DP, Olschewski A. Subacute hypoxia decreases voltage-activated potassium channel expression and function in pulmonary artery myocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 337–343, 2004.
 22. Isaacson TC, Hampl V, Weir EK, Nelson DP, Archer SL. Increased endothelium-derived NO in hypertensive pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol* 76: 933–940, 1994.
 23. Jepps TA, Chadha PS, Davis AJ, Harhun MI, Cockerill GW, Olesen SP, Hansen RS, Greenwood IA. Downregulation of Kv7.4 channel activity in primary and secondary hypertension. *Circulation* 124: 602–611, 2011.
 24. Joshi S, Balan P, Gurney AM. Pulmonary vasoconstrictor action of KCNQ potassium channel blockers. *Respir Res* 7: 31, 2006.
 25. Joshi S, Sedivy V, Hodyc D, Herget J, Gurney AM. KCNQ modulators reveal a key role for KCNQ potassium channels in regulating the tone of rat pulmonary artery smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 329: 368–376, 2009.
 26. Klinger F, Geier P, Dorostkar MM, Chandaka GK, Yousuf A, Salzer I, Kubista H, Boehm S. Concomitant facilitation of GABAA receptors and KV7 channels by the non-opioid analgesic flupirtine. *Br J Pharmacol* 166: 1631–1642, 2012.
 27. Lamas JA, Selyanko AA, Brown DA. Effects of a cognition-enhancer, linopirdine (DuP 996), on M-type potassium currents [IK(M)] and some other voltage- and ligand-gated membrane currents in rat sympathetic neurons. *Eur J Neurosci* 9: 605–616, 1997.
 28. Lee CH, Poburko D, Kuo KH, Seow CY, van Breemen C. Ca²⁺ oscillations, gradients, and homeostasis in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H1571–H1583, 2002.
 29. Madden JA, Dawson CA, Harder DR. Hypoxia-induced activation in small isolated pulmonary arteries from the cat. *J Appl Physiol* 59: 113–118, 1985.
 30. Madden JA, Vadula MS, Kurup VP. Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 263: L384–L393, 1992.
 31. Mani BK, O'Dowd J, Kumar L, Brueggemann LI, Ross M, Byron KL. Vascular KCNQ (Kv7) potassium channels as common signaling intermediates and therapeutic targets in cerebral vasospasm. *J Cardiovasc Pharmacol* 61: 51–62, 2013.
 32. Mauban JR, Remillard CV, Yuan JX. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: role of ion channels. *J Appl Physiol* 98: 415–420, 2005.
 33. McMurtry IF. Angiotensin is not required for hypoxic constriction in salt solution-perfused rat lungs. *J Appl Physiol* 56: 375–380, 1984.
 34. Michelakis ED, Thebaud B, Weir EK, Archer SL. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox regulation of O₂-sensitive K⁺ channels by a mitochondrial O₂-sensor in resistance artery smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 37: 1119–1136, 2004.
 35. Morecroft I, Murray A, Nilsen M, Gurney AM, MacLean MR. Treatment with the Kv7 potassium channel activator flupirtine is beneficial in two independent mouse models of pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol* 157: 1241–1249, 2009.
 36. Neacsu C, Babes A. The M-channel blocker linopirdine is an agonist of the capsaicin receptor TRPV1. *J Pharm Sci* 114: 332–340, 2010.
 37. Oka M, Morris KG, McMurtry IF. NIP-121 is more effective than nifedipine in acutely reversing chronic pulmonary hypertension. *J Appl Physiol (1985)* 75: 1075–1080, 1993.
 38. Olschewski A, Li Y, Tang B, Hanze J, Eul B, Bohle RM, Wilhelm J, Morty RE, Brau ME, Weir EK, Kwapiszewska G, Klepetko W, Seeger W, Olschewski H. Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 98: 1072–1080, 2006.
 39. Osipenko ON, Evans AM, Gurney AM. Regulation of the resting potential of rabbit pulmonary artery myocytes by a low threshold, O₂-sensing potassium current. *Br J Pharmacol* 120: 1461–1470, 1997.
 40. Peretz A, Degani N, Nachman R, Uziyel Y, Gibor G, Shabat D, Attali B. Meclofenamic acid and diclofenac, novel templates of KCNQ2/Q3 potassium channel openers, depress cortical neuron activity and exhibit anticonvulsant properties. *Mol Pharmacol* 67: 1053–1066, 2005.
 41. Permutt S, Riley RL. Hemodynamics of collapsible vessels with tone: the vascular waterfall. *J Appl Physiol* 18: 924–932, 1963.
 42. Platoshyn O, Golovina VA, Bailey CL, Limsuwan A, Krick S, Juhászova M, Seiden JE, Rubin LJ, Yuan JX. Sustained membrane depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1540–C1549, 2000.
 43. Post JM, Hume JR, Archer SL, Weir EK. Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Cell Physiol* 262: C882–C890, 1992.
 44. Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, Miettinen OS, Reid L. Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 236: H818–H827, 1979.
 45. Robbins J. KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Ther* 90: 1–19, 2001.
 46. Robertson TP, Hague D, Aaronson PI, Ward JP. Voltage-independent calcium entry in hypoxic pulmonary vasoconstriction of intrapulmonary arteries of the rat. *J Physiol* 525: 669–680, 2000.
 47. Smirnov SV, Robertson TP, Ward JP, Aaronson PI. Chronic hypoxia is associated with reduced delayed rectifier K⁺ current in rat pulmonary artery muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 266: H365–H370, 1994.
 48. Soohoo SL, Goldberg HS, Graham R, Jasper AC. Zone 2 and zone 3 pulmonary blood flow. *J Appl Physiol* 62: 1982–1988, 1987.

49. Suzuki H, Twarog BM. Membrane properties of smooth muscle cells in pulmonary hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 242: H907–H915, 1982.
50. Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JP. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev* 92: 367–520, 2012.
51. Turner JL, Kozlowski RZ. Relationship between membrane potential, delayed rectifier K⁺ currents and hypoxia in rat pulmonary arterial myocytes. *Exp Physiol* 82: 629–645, 1997.
52. Wang HS, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, Dixon JE, McKinnon D. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282: 1890–1893, 1998.
53. Wladyka CL, Kunze DL. KCNQ/M-currents contribute to the resting membrane potential in rat visceral sensory neurons. *J Physiol* 575: 175–189, 2006.
54. Yeung SY, Pucovsky V, Moffatt JD, Saldanha L, Schwake M, Ohya S, Greenwood IA. Molecular expression and pharmacological identification of a role for K(v)7 channels in murine vascular reactivity. *Br J Pharmacol* 151: 758–770, 2007.
55. Yuan JX, Aldinger AM, Juhaszova M, Wang J, Conte JV Jr, Gaine SP, Orens JB, Rubin LJ. Dysfunctional voltage-gated K⁺ channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 98: 1400–1406, 1998.
56. Yuan XJ, Goldman WF, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 264: L116–L123, 1993.
57. Zong F, Zuo XR, Wang Q, Zhang SJ, Xie WP, Wang H. Iptakalim rescues human pulmonary artery endothelial cells from hypoxia-induced nitric oxide system dysfunction. *Exp Ther Med* 3: 535–539, 2012.

