

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Kryštof Krása

Kombinační farmakoterapie různých typů plicní hypertenze

Combination pharmacotherapy of different types of pulmonary hypertension

Disertační práce

Školitel: Prof. RNDr. Václav Hampl, DrSc.

Praha, 2023

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, 31.5.2023

MUDr. Kryštof Krása

Podpis

Poděkování:

Prof. MUDr. Václavu Hamplovi, DrSc. za podporu a moje vedení po celou dobu postgraduálního studia, zároveň za podporu při sestavování této práce a kritickou diskuzi jejího obsahu.

Dále děkuji celému týmu Fyziologického ústavu 2.LF UK a jejich externím spolupracovníkům za spolupráci na experimentálních pokusech a přípravě výstupů. Dále bych chtěl poděkovat doc. MUDr. Martinovi Malému, PhD. z kardiologického oddělení Interní kliniky 1.LF UK a ÚVN za cenné rady a podporu mé mimopracovní aktivity.

Identifikační záznam:

KRÁSA, Kryštof. Kombinační farmakoterapie různých typů plicní hypertenze. [Combination pharmacotherapy of different types of pulmonary hypertension]. Praha, 2023. 157 stran, 3 přílohy. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. Lékařská fakulta, Ústav Fyziologie 2. LF UK. Školitel: Prof. RNDr. Václav Hampl, DrSc.

Abstrakt

Plicní hypertenze je skupina onemocnění charakterizovaná zvýšeným středním tlakem v plicnici. Zvláště u skupiny 2, která je asociována se srdečními chorobami a je nejprevalentnější ze všech typů, a u skupiny 3, asociované s plicními chorobami, nebyla doposud vyvinuta žádná dostatečně efektivní léčba kromě léčby základního onemocnění, což je v řadě případů problematické. Dehydroepiandrosteron sulfát (DHEA S) a statiny mají v některých ohledech rozdílné mechanismy fungování na plicní hypertenzi, nabízela se tedy otázka efektivity jejich kombinace na plicní hypertenzi oproti každé z látek samostatně. Abychom tuto hypotézu ověřili, vyvolali jsme plicní hypertenzi u dospělých samců potkanů třítydenní expozicí hypoxií (10 % O₂) a léčili je simvastatinem (60 mg/l) a DHEA S (100 mg/l) v pitné vodě, a to buď samostatně, nebo v kombinaci. Jak simvastatin, tak DHEA S snížily střední tlak v plicnici (z průměrné hodnoty \pm s.d. $34,4 \pm 4,4$ na $27,6 \pm 5,9$ a $26,7 \pm 4,8$ mmHg), jejich kombinace však nebyla účinnější ($26,7 \pm 7,9$ mmHg). Rozdíly ve stupni oxidačního stresu (indikovaného koncentrací malondialdehydplazmy), míře produkce superoxidu (elektronová paramagnetická rezonance) nebo hladinách oxidu dusnatého v krvi (chemiluminiscence) nevysvětlovaly nedostatečnou aditivitu účinku DHEA S a simvastatinu na plicní hypertenzi. Navrhujeme, že hlavním mechanismem působení obou léčiv na plicní hypertenzi by mohl být jejich inhibiční účinek na 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A reduktázu, čímž by se vysvětlovala absence aditivty jejich účinku.

Rozvoj plicní hypertenze může být i nežádoucím efektem léků podávaných pro léčbu jiných onemocnění. Jedním z nových typů léčiv, jejichž mechanismus účinku má společné prvky s mechanismy plicní hypertenze, jsou stabilizátoryfaktorů indukovatelných hypoxií (HIF), vyvíjené pro použití při anémiích. Proto jsme testovali hypotézu, ževedlejším účinkem roxadustatu z této skupiny může být plicní hypertenze. Použili jsme izolované, bezbuněčným roztokem perfundovanéplíce laboratorního potkana. Zjistili jsme, že plicní cévní odpor (měřený jako vztah perfuzního tlaku a průtoku) je roxadustatem zvýšen, a to už po krátké expozici, kdy se ještě neprojevil vliv roxadustatu na hematokrit. Riziko plicní hypertenze při léčbě roxadustatem, je tedy reálné (byť nikoliv enormní) a je na místě ho sledovat. Vazokonstrikční reaktivita na akutní hypoxické podněty nebyla roxadustatem signifikantně ovlivněna. HIF se tedy asi příliš neuplatňují v mechanismu hypoxické plicní vazokonstrikce.

Z důvodu vysoké prevalence plicní hypertenze asociované se srdečním onemocněním, která je navíc málo prozkoumaná, a to zčásti i kvůli náročnosti dostupných experimentálních modelů,

bylo třetím cílem práce vytvořit a charakterizovat technicky jednoduchý model tohoto typu plicní hypertenze. Podstata metody spočívá v tom, že se zmenšení průřezu vzestupné aorty nedosahuje zevní svorkou (jako v dosavadních technikách vyžadujících otevření hrudníku), nýbrž částečnou intravaskulární obstrukcí pouhým povrchovým přístupem přes a. carotis (tedy bez otevření hrudníku). Zaslepená hadička se touto cestou zavede těsně nad aortální chlopeň laboratorního potkana, kde zvyšuje odpor v aortě a tedy afterload levé komory. Ukázali jsme, že tato procedura je nejen poměrně snadná, ale také že po třech týdnech od zavedení hadičky skutečně působí tlakové přetížení levého srdce (tlak v levé síni na konci diastoly $1,3 \pm 0,2$ mmHg, oproti $0,4 \pm 0,3$ mmHg u kontrol, $P < 0,0001$). Přítomnost plicní hypertenze byla dokumentována měřením tlaku v plicnici katetrizací in vivo ($22,3 \pm 2,3$ vs. $16,9 \pm 2,7$ mmHg, $P = 0,0282$) a detekcí hypertrofie pravé komory a zvýšené muskularizace periferních plicních cév. Podíl vazokonstrikce a prekapilárního cévního segmentu na zvýšené plicní cévní rezistenci byl prokázán normalizací rezistence pomocí vazodilatátoru, nitroprusidu sodného, a technikou arteriální okluze v izolovaných plicích. Intravaskulární částečná obstrukce aorty tak nabízí nenáročný model plicní hypertenze vyvolané onemocněním levého srdce, který má vazokonstrikční a prekapilární složku. Jde tedy o nový praktický model plicní hypertenze 2. typu s jasnou prekapilární komponentou, který může být využit pro další studium mechanismů a možných intervencí u této klinicky nejobvyklejší formy plicní hypertenze.

Klíčová slova

Plicní hypertenze, statin, Dehydroepiandrosteron, hypoxií-inducibilní faktor, přetížení levé komory srdeční, potkan, skupina 2 plicní hypertenze, srdeční selhání se zachovalou ejekční frakcí, plicní vaskulární reaktivita

Abstract

Pulmonary hypertension is a group of diseases characterized by increased mean pulmonary artery pressure. Especially in group 2, which is associated with heart disease and is the most prevalent of all types, and in group 3, associated with lung disease, no sufficiently effective treatment has yet been developed beyond the treatment of the underlying disease, which is problematic in many cases. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA S) and statins have different mechanisms of action on pulmonary hypertension in some respects, so the question of the effectiveness of combining them on pulmonary hypertension versus either agent alone has been offered. To test this hypothesis, we induced pulmonary hypertension in adult male rats by three weeks of exposure to hypoxia (10% O₂) and treated them with simvastatin (60 mg/L) and DHEA S (100 mg/L) in drinking water, either alone or in combination. Both simvastatin and DHEA S reduced mean pulmonary artery pressure (from a mean \pm s.d. value of 34.4 ± 4.4 to 27.6 ± 5.9 and 26.7 ± 4.8 mmHg, respectively), but their combination was not more effective (26.7 ± 7.9 mmHg). Differences in the degree of oxidative stress (as indicated by malondialdehydedehydrplasma concentration), the degree of superoxide production (electron paramagnetic resonance) or blood nitric oxide levels (chemiluminescence) did not explain the lack of additivity of the effect of DHEA S and simvastatin on pulmonary hypertension. We propose that the main mechanism of action of both drugs on pulmonary hypertension could be their inhibitory effect on 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase, thus explaining the absence of additivity of their action.

The development of pulmonary hypertension may also be a side effect of drugs administered for the treatment of other diseases. One of the new types of drugs whose mechanism of action shares common elements with those of pulmonary hypertension are hypoxia-inducible factor (HIF) stabilizers being developed for use in anemias. Therefore, we tested the hypothesis that a major effect of roxadustat from this group may be pulmonary hypertension. We used isolated, cell-free, solution-perfused lungs from a rat. We found that pulmonary vascular resistance (measured as the ratio of perfusion pressure to flow) was increased by roxadustat, even after a short exposure when the effect of roxadustat on haematocrit had not yet become apparent. The risk of pulmonary hypertension with roxadustat treatment is therefore real (although not enormous) and should be monitored. Vasoconstrictor reactivity to acute hypoxic

stimuli was not significantly affected by roxadustat. Thus, HIFs are probably not very involved in the mechanism of hypoxic pulmonary vasoconstriction.

Because of the high prevalence of pulmonary hypertension associated with heart disease, which is also poorly studied, partly due to the difficulty of the available experimental models, the third aim of the study was to develop and characterize a technically simple model of this type of pulmonary hypertension. The essence of the method is that the reduction of the cross-sectional area of the ascending aorta is achieved not by an external clamp (as in previous techniques requiring opening of the chest) but by partial intravascular obstruction by a mere superficial approach through the a. carotis (i.e. without opening the chest). A blinded tube is introduced by this route just above the aortic valve of the laboratory rat, where it increases the resistance in the aorta and thus the afterload of the left ventricle. We have shown that this procedure is not only relatively easy, but also that three weeks after insertion of the tube, it actually causes pressure overload in the left heart (left atrial pressure at end diastole 1.3 ± 0.2 mmHg, compared to 0.4 ± 0.3 mmHg in controls, $P < 0.0001$). The presence of pulmonary hypertension was documented by measurement of pulmonary artery pressure by in vivo catheterization (22.3 ± 2.3 vs. 16.9 ± 2.7 mmHg, $P = 0.0282$) and detection of right ventricular hypertrophy and increased muscularization of peripheral pulmonary vessels. The contribution of vasoconstriction and the pre-capillary vascular segment to increased pulmonary vascular resistance was demonstrated by normalizing resistance using the vasodilator, sodium nitroprusside, and the arterial occlusion technique in isolated lungs. Thus, intravascular partial aortic obstruction offers an uncomplicated model of pulmonary hypertension induced by left heart disease that has a vasoconstrictive and precapillary component. Thus, it is a new practical model of type 2 pulmonary hypertension with a clear precapillary component that can be used to further study the mechanisms and potential interventions for this most clinically common form of pulmonary hypertension.

Keywords

Pulmonary hypertension, statin, dehydroepiandrosterone, hypoxia-inducible factor, left ventricular overload, rat, group 2 pulmonary hypertension, heart failure with preserved ejection fraction, pulmonary vascular reactivity

Seznam použitých zkratk:

ACE – angiotensin-konvertující enzym

AT – receptor pro angiotensin

BKCa – vápníkem řízené kaliové kanály

BMPR – kostní morfogenetický protein

BNP – mozkový natriuretický peptid

DHEA-S – dehydroepiandrosteron sulfát

HIF – hypoxií indukovaný faktor

CHOPN – chronická obstrukční plicní nemoc

LVEDP – end-diastolický tlak levé komory

mPAP – střední tlak v plicnici

NO – oxid dusnatý

PAWP - tlak v zaklínění

PH – plicní hypertenze

P/Q – perfuzní tlak/průtok

PVR – plicní vaskulární rezistence

RAAS – renin-angiotenzin- aldosteronový systém

RVSP – systolický tlak pravé komory

SV – srdeční výdej

OBSAH

1. ÚVOD	11
1.1 Plicní hypertenze	11
1.2 Léčba plicní hypertenze podle skupin	16
1.3 Experimentální léčba plicní hypertenze	20
1.4 Animální modely plicní hypertenze	35
1.5 Léky navozená plicní hypertenze	38
2. CÍLE A HYPOTÉZY	41
3. MATERIÁL A METODY	42
3.1 Etické aspekty	42
3.2 DHEA a statin	42
3.3 Aktivátor HIF zvyšuje plicní cévní rezistenci	45
3.4 Nový experimentální model levostranného srdečního selhání u potkanů	47
3.5 Statistická analýza	51
4. VÝSLEDKY	52
4.1 DHEA a statin	52
4.2 Aktivátor HIF zvyšuje plicní cévní rezistenci	57
4.3 Nový experimentální model levostranného srdečního selhání u potkanů	60
5. DISKUZE	68
5.1 DHEA a statin	68
5.2 Aktivátor HIF zvyšuje plicní cévní rezistenci	74
5.3 Nový experimentální model levostranného srdečního selhání u potkanů	75
6. ZÁVĚR	78
7. REFERENCE	79
8. PŘÍLOHY	101

1. ÚVOD

1.1 Plicní hypertenze

Definice, patofyziologie a klasifikace

Plicní hypertenze (PH) je skupina onemocnění charakterizovaná zvýšeným plicním arteriálním tlakem a plicní cévní rezistencí (PVR) vedoucí ke zvýšení afterloadu pro pravou srdeční komoru, která adaptivně hypertrofuje, nicméně postupem času bývá tento adaptační mechanismus vyčerpán a dochází k selhání pravého srdce a smrti (Simonneau et al., 2019). Z buněk cévní stěny se na rozvoji onemocnění podílí endotelie, buňky hladkého svalstva a fibroblasty, jedná se o tzv. „panvaskulární nemoc“. Za fyziologického stavu endotel moduluje rovnováhu mezi vazodilatací a vazokonstrikcí a inhibuje proliferaci buněk hladkého svalstva za účelem udržení nízké odporového plicního řečiště. Excesivní plicní vazokonstrikce je považována za nejčasnější událost celého patofyziologického procesu a souvisí s dysfunkcí endotelu charakterizovanou sníženou produkcí vazodilatančních substancí (oxid dusnatý - NO, prostacyklin) spolu s nadměrnou expresí vazokonstriktorů (endotelin-1). Abnormální proliferace buněk hladkého svalstva je časným mikroskopicky pozorovatelným rysem vaskulární remodelace, vedoucí k hypertrofii medie periferních plicních tepen. Dále dochází k zánětlivé reakci s rozvojem fibrózy intimální vrstvy cév. V pozdním stádiu progresu některých typů PH vede tvorba plexiformních lézí a in situ trombózy k okluzi lumen cév.

Zvýšení plicního arteriálního tlaku má několik příčin jako jsou zvýšení srdečního výdeje (SV), levo-pravé zkraty, zvýšení tlaku v zaklínění (PAWP) u onemocnění levého srdce, onemocnění plicních cév, nebo hyperviskozita. V praxi je PH rozdělena do 3 skupin na základě hemodynamického profilu a do 5 skupin na základě klinických charakteristik (Tab.č.1). Onemocnění se dominantně týká malých plicních arteriol (průměr <500 μ m), lze u nich pozorovat širokou škálu buněčných změn jako proliferaci intimy, fibrotické změny,

mediální hypertrofii hladké svaloviny, perivaskulární zánětlivé infiltráty a intravaskulární trombózy (Chan and Loscalzo, 2008; Rabinovitch, 2012).

V posledních guidelines Evropské kardiologické společnosti (ESC) pro léčbu plicní hypertenze je za patologickou hodnotu středního PAP (mPAP) považován tlak nad 20 mmHg (Humbert et al., 2022). Normální hodnoty PAP za klidových podmínek a při cvičení byly stanoveny analýzou 1187 zdravých jedinců ze 47 studií kde mPAP naměřený během pravostranné katetrizace byl $14,0 \pm 3,3$ mmHg, přičemž, tato hodnota byla nezávislá na etnicitě, pohlaví a jen mírně byla ovlivněna věkem (směrem k vyšším hodnotám). Za abnormální hodnotu tlaku v plicnici byla tedy stanovena hodnota $mPAP > 20\text{mmHg}$ ($14\text{ mmHg} + 2$ standardní odchylky) (Kovacs et al., 2009), protože při mPAP vyšším než tato hodnota je prokázána narůstající morbidita a mortalita oproti pacientům kteří mají tlak $< 20\text{ mmHg}$ (Douschan et al., 2018; Kovacs et al., 2014). Hodnota mPAP sama o sobě nestačí k hemodynamickému zadefinování PH. Zásadní je též hodnota PCWP (zjistitelná při pravostranné katetrizaci) a plicní vaskulární rezistence ($PVR = (mPAP - PAWP) / SV$). Na základě znalosti těchto 3 hodnot dělíme z hemodynamického hlediska plicní hypertenzi na prekapilární ($mPAP > 20\text{ mmHg}$, $PAWP \leq 15\text{ mmHg}$ a $PVR \geq 3\text{ WU}$), izolovanou postkapilární ($mPAP > 20\text{ mmHg}$, $PAWP > 15\text{mmHg}$ a $PVR < 3\text{ WU}$) a kombinovanou pre- a post-kapilární ($mPAP > 20\text{ mmHg}$, $PAWP > 15\text{ mmHg}$ a $PVR \geq 3\text{ WU}$) (Simonneau et al., 2019).

Klinická klasifikace dělí PH do 5 skupin (Tab. č. 1) podle jejich podobného klinického projevu, patologických nálezů, hemodynamických charakteristik a léčebné strategie. Ve skupině 1 je plicní arteriální hypertenze (PAH, dříve též zvaná primární PH), ve skupině 2 je PH v důsledku postižení levého srdce, ve skupině 3 PH v důsledku plicních onemocnění a/nebo hypoxie, ve skupině 4 chronická trombembolická PH a jiné obstrukce plicních tepen a ve skupině 5 PH z neznámých příčin a/nebo s multifaktoriálním mechanismem vzniku

(Simonneau et al., 2019). U skupiny 2 pozorujeme izolovanou postkapilární plicní hypertenzi, nebo kombinovanou pre- postkapilární hypertenzi, u skupin 1,3,4 prekapilární PH a u skupiny 5 kterýkoliv z hemodynamických obrazů PH.

Souhrnná klinická klasifikace plicní hypertenze volně dle ESC Guidelines pro PH 2022	
1 Plicní arteriální hypertenze	2.5 Ostatní
1.1 Idiopatická	3 Plicní hypertenze při onemocněních plic a/nebo při hypoxemii
1.2 Dědičná	3.1 Chronická obstrukční plicní nemoc
1.2.1 při mutaci v genu pro BMPR2	3.2 Intersticiální plicní procesy
1.2.2 při jiných mutacích	3.3 Plicní onemocnění s kombinovanou ventilační poruchou
1.3 Indukovaná léky a toxickými látkami	3.4 Obstrukční spánková apnoe
1.4 Spojena:	3.5 Alveolární hypoventilace
1.4.1 se systémovými onemocněními pojiva	3.6 Chronická výšková hypoxie
1.4.2 s infekcí HIV	3.7 Vývojové abnormality
1.4.3 s portální hypertenzí	4 Chronická trombembolická plicní hypertenze a jiné obstrukce plicních tepen
1.4.4 s vrozenými srdečními vady	4.1 Chronická trombembolická plicní hypertenze
1.4.5 se schistomiázou	4.2 Jiné obstrukce plicních tepen
2 Plicní hypertenze při postižení levého srdce	5 Plicní hypertenze z jiných příčin a/nebo s multifaktoriálním mechanismem vzniku
2.1 Systolická dysfunkce levé komory	5.1 Hematologická onemocnění
2.2 Diastolická dysfunkce levé komory	5.2 Systémová onemocnění
2.3 Postižení chlopní	5.3 Metabolické choroby
2.4 Vrozená nebo získaná obstrukce vtokového a výtokového traktu levé komory, vrozené kardiomyopatie	5.4 Ostatní

Tab.č. 1 Souhrnná klinická klasifikace PH, volně dle ESC Guidelines pro PH 2022

Epidemiologie

Roční incidence PH v dospělé populaci se pohybuje kolem 28,7 případů/ 100 000 obyvatel a roční prevalence 127,3 případů/ 100 000 obyvatel, oba ukazatele mají v průběhu let

vzestupnou tendenci. U samotné PAH se prevalence pohybuje v rozmezí 15–60/ 1 000 000 obyvatel a incidence 5–10/ 1 000 000 ročně (Peacock et al., 2007). U pacientů s prokázanou PH se nejčastěji jedná o skupinu 2 (68.5%), skupinu 3 (47.0%) a skupinu 4 (9.0%).

Ve skupině 1 je nejčastější příčinou idiopatická PH (50.4%), dalšími jsou hereditární nebo lékem indukovaná.

U skupiny 2 je nejčastější příčinou systolická, nebo diastolická dysfunkce levé komory srdeční (86.8%); prevalence je tím vyšší, čím větší subjektivní potíže dle klasifikace NYHA pacient má. U levostranných chlopenních onemocnění se prevalence PH zvyšuje se závažností vady a symptomů. PH lze nalézt prakticky u všech pacientů se závažným symptomatickým onemocněním mitrální chlopně a až 65% u pacientů se symptomatickou aortální stenózou (Badesch et al., 2009; Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) et al., 2012; Oudiz, 2007). Nicméně ze všech pacientů, kteří trpí onemocněním levého srdce, se vyvine PH jen u 3,6%.

U skupiny 3 je nejčastější příčinou rozvoje PH chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) (83%). PH se u pacientů ze skupiny 3 vyskytuje u 0.7% případů.

U pacientů přeživších akutní plicní embolii se prevalence chronické trombembolické plicní hypertenze pohybuje mezi 0.5-2% (Pengo et al., 2004). Anamnéza akutní plicní embolie je hlášena u 74,8% pacientů z mezinárodního registru chronické trombembolické plicní hypertenze a přidružené stavy zahrnují trombofilní poruchy jako je nedostatek proteinu C a S, lupus antikoagulans/antifosfolipidové protilátky, rezistenci aktivovaného proteinu C včetně mutace faktoru V Leiden, mutaci protrombinového genu, deficit antithrombinu III a zvýšení faktoru VIII (Pepke-Zaba et al., 2011; Wijeratne et al., 2018). Úmrtnost u dospělých s PH činí v souhrnu všech skupin 13,0% ve 30 dnech, 36,4% v 1 roce a 62,4% v 5letech. U samotné PAH je pětiletá míra přežití u nově diagnostikovaných onemocnění závislá na funkční třídě I

až IV dle WHO (72,2 %, 71,7 %, 60,0 % a 43,8 %) (Farber et al., 2015). Úmrtnost je nejvyšší ve skupinách 2 a 3 a nejnižší ve skupině 1 (Wijeratne et al., 2018).

Diagnóza PH je stanovena na základě přítomnosti symptomů, objektivních příznaků a panelu vyšetření, který zahrnuje ultrazvuk srdce, funkční plicní testy, CT angiografii plicních tepen, V/P sken a pravostrannou katetrizaci.

Symptomy PH nejsou specifické a souvisejí hlavně s progresivní dysfunkcí pravé komory. V počáteční fázi onemocnění se příznaky objevují při námaze, s progresí onemocnění se objevují i v klidu. Zahrnují slabost, únavu, dušnost, únavu, anginu pectoris a synkopu. Mezi vzácnější příznaky patří suchý kašel a nevolnost vyvolané cvičením. U některých pacientů může být přítomna hemoptýza při ruptuře dilatovaných bronchiálních arterií, chrapot způsobený útlakem n. laryngem recurrens dilatovanou plicní arterií. U významně dilatované plicní arterie pak může dojít k disekci s následným vznikem srdeční tamponády. Při fyzikálním vyšetření jsou typicky přítomny známky pravostranného srdečního selhání (otoky dolních končetin, ascites, hepatomegalie, zvýšená náplň krčních žil). Klinický obraz bývá dále modifikován samotným základním onemocněním vyvolávajícím PH a dalšími komorbiditami.

1.2 Léčba plicní hypertenze podle skupin

Skupina č.1

U PAH je obecně doporučena fyzická aktivita, antikoncepce, prevence infekcí, psychosociální podpora, genetické poradenství, perorální antikoagulace, diuretika, O₂ a digoxin. Nejdůležitější je však léčba specifická, cílící na základní patofyziologické cesty tj. signální dráha kalciového kanálu (blokátory kalciových kanálů), signální dráha prostacyklinu (PGI₂) (agonisté dráhy PGI₂), signální dráha endotelinu (antagonisté ET receptorů) a signální dráha NO a cyklický guanosin monofosfát (cGMP).

V 70. letech 20. století byly provedeny experimentální práce, které dokumentovaly zásadní roli napěťové řízených kalciových kanálů v mechanismu hypoxické plicní vazokonstrikce (McMurtry, 1976). Toto zjištění mělo velký dopad do klinické praxe. U pacientů s PAH, kteří reagovali vasodilatací na podání intravaskulárních blokátorů kalciových kanálů během pravostranné katetrizace, tyto léky zlepšují prognózu (Dalal et al., 1981; Rich et al., 1992; Rubin et al., 1983; Sitbon et al., 2005). V první linii se i v dnešní době používají dlouhodobě působící nifedipin a diltiazem (Rich et al., 1992). Jejich slabinou je nízká selektivita pro plicní cirkulaci a tedy nemožnost je využít u řady pacientů, kde by nežádoucí efekt na systémovou cirkulaci byl příliš riskantní. Dnes je navíc známo, že zásadní roli hrají TRPC6 kanály, u nichž prozatím není léčebné ovlivnění možné (Weissmann et al., 2006).

Krátce po objevení prostaglandinů bylo zjištěno vazodilatační působení některých z nich (zejména prostacyklinu) v plicních cévách. Aktivita PGI₂ syntázy v endotelu plicních tepen klesá u pacientů s PAH (Christman et al., 1992; Tuder et al., 1999). Po rozpačitých zkušenostech s blokátory kalciového kanálu se konečně objevila terapie, která se stala základním kamenem léčebných postupů u pacientů s PAH. Suplementace PGI₂ je využívána k ovlivnění prognózy pacientů s PAH dodnes, ačkoliv její použití je drahé a nepraktické.

Krom vazodilatačního efektu, byl u této skupiny prokázán inhibiční vliv na proliferaci hladké svaloviny a na aktivaci a agregaci destiček (Humbert et al., 2004). Mezi základní zástupce prostacyklinových analog/agonistů prostacyklinových receptorů patří, iloprost, epoprostenol, treprostinil, selexipag a beraprost (Sitbon and Morrell, 2012). Léky jsou dostupné k p.o., i.v., s.c., a inhalačnímu užití v závislosti na konkrétním léku.

Další skupinou jsou antagonisté endotelinových receptorů. Zvýšené hladiny endotelinu-1 byly nalezeny jak v plazmě, tak v plicní tkáni pacientů s PAH (Giaid et al., 1993) a jejich role v patogenezi PH byla potvrzena (Galie, 2004). Endotelin-1 účinkuje jako vazokonstriktor a mitogen na hladkou svalovinu plicních cév vazbou na endotelinový receptor A. Mezi úspěšně používané blokátory endotelinových receptorů A patří ambrisentan, bosentan a macitentan (Kuntz et al., 2016). Bosentan a ambrisentan prokazatelně zlepšují parametry plicní hemodynamiky a zátěžové kapacity (zlepšení v šestiminutovém testu chůze), nicméně neovlivňují prognózu pacientů.

Poslední skupinou léků užívaných u PAH jsou léky zaměřující se na NO-cGMP signální dráhu. Rodina enzymů fosfodiesterázy (lišící se poměrem afinity k cAMP a cGMP) degraduje cGMP, který je spoluodpovědný za vazodilataci plicního cévního řečiště cestou NO/cGMP. Jedná se o nitrovasodilatační léky, tj. inhalační NO, inhibitory fosfodiesterázy 5 sildenafil, tadalafil a stimulant guanylátcyklázy (cGMP agonista) riociguat. Kromě vazodilatačního, mají inhibitory fosfodiesterázy 5 také efekt antiproliferativní (Tantini et al., 2005).

Dalšími léčebnými možnostmi mající svoje jasně dané, nicméně velmi omezené indikace jsou balónková atriální septostomie, veno-arteriální extrakorporální membránová oxygenace a transplantace plic.

Skupina č.2

PH je běžnou komplikací u chorob levého srdce (systolické srdeční selhání, diastolické

srdeční selhání, chlopenní vady, vrozené srdeční vady) a do jisté míry predikuje i závažnost základního onemocnění (Fang et al., 2012; Vachiéry et al., 2019). Nejčastěji byla PH studována u pacientů se srdečním selháním se sníženou nebo zachovalou ejekční frakcí (Fang et al., 2012; Vachiéry et al., 2019) kde, pokud byla přítomna, vedla k závažnějším příznakům, horší toleranci zátěže a ke zhoršení prognózy. Pro tuto formu PH není specifická terapie užívaná u PAH doporučena (Bonderman et al., 2013) a léčba je zaměřena na zvládnutí základního onemocnění, tj. léčba srdečního selhání, operace chlopenní vady, revaskularizace, implantace levostranné podpory s jejím unloadingem, pakliže je indikováno (Humbert et al., 2022). U těžkého srdečního selhání je zásadní optimalizace intravaskulárního volumu, někdy vyžadující invazivní monitoraci (Khush et al., 2009). U pacientů s těžko ovlivnitelným srdečním selháním s rozvinutou PH by byla žádoucí PH2 specifická terapie k subjektivnímu zlepšení a i tímto směrem by měly cílit výzkumné týmy.

Skupina č.3

Terapeutický přístup k pacientům s PH asociovanou s plicním onemocněním se opírá o optimalizaci léčby základního onemocnění, včetně oxygenoterapie a neinvazivní ventilace pokud indikována a zařazení do plicních rehabilitačních programů (Blanco et al., 2013). Existují omezené a protichůdné důkazy o užívání léků schválených pro PAH u pacientů s PH skupiny 3 a tyto léky mohou mít variabilní a někdy i škodlivé účinky na hemodynamiku, cvičební kapacitu a výměnu plynů (Ghofrani et al., 2002; Nathan et al., 2019; Olschewski et al., 1999; Raghu et al., 2013; Stolz et al., 2008). Při absenci rozsáhlých randomizovaných studií nejsou dostatečné důkazy k podpoře obecného užívání léků schválených pro PAH u pacientů s CHOPN a PH. I u této skupiny tedy platí potřeba hledání nových terapeutických možností jak pro primární onemocnění, tak následek/komplikaci jako je PH.

Skupina č.4

Diagnóza chronické trombembolické PH je stanovena za předpokladu přítomnosti plicní

trombózy a prekapilární PH po > 3 měsících antikoagulační léčby. Terapeutickými možnostmi jsou antagonisté vitamínu K, nebo léčba novými perorálními antikoagulancii, plicní endarterektomie, plicní angioplastika u pacientů, jež nemohou podstoupit endarterektomii a existují i důkazy o účinnosti riociguatu, macitentanu a bosentanu (Chen et al., 2018; Ghofrani et al., 2017)

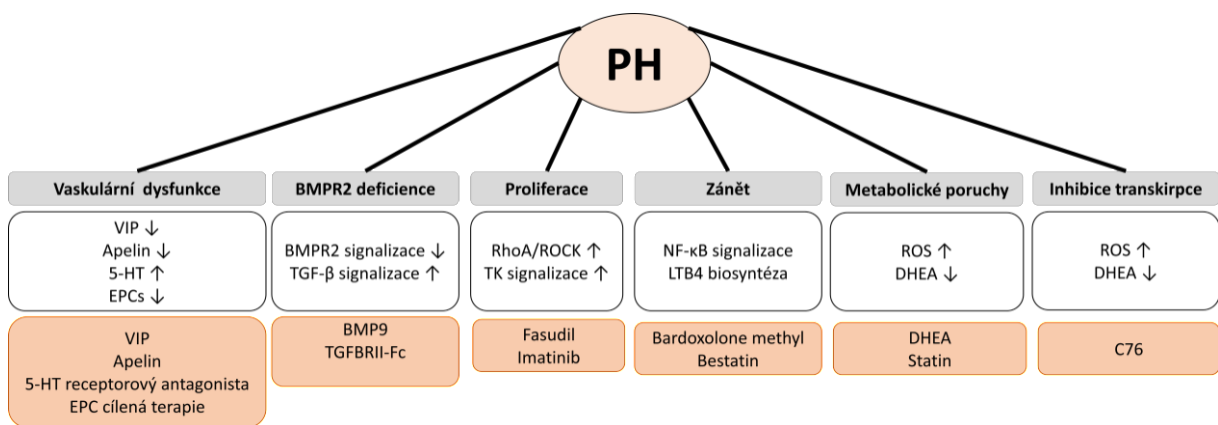
Skupina č.5

Pátá skupina sdružuje stavy, které jsou komplexní patoetiologie nebo nezařaditelné do předchozích skupin, PH je zde sekundární a i léčba je značně individualizovaná.

V souhrnu lze říci, že mortalita PH je vysoká a léčebné možnosti jsou velmi omezené zvláště u skupin 2 a 3. V posledních 2 dekáдах došlo k posunu v léčbě PH. Jsou k dispozici léky specificky působící, nicméně ani tato léčba není kurativní a spíše jen zpomaluje progresi onemocnění. Hledání nových možností léčby je tedy stále velmi aktuálním tématem.

1.3 Experimentální léčba plicní hypertenze

V posledních letech bylo identifikováno několik klíčových molekulárních, buněčných a genetických abnormalit, které jsou zásadní pro vaskulární remodelaci u PH. Terapeutické přístupy zaměřené na plicní arteriální homeostázu a proliferaci, zánět, deficienci signalizace receptoru kostního morfogenetického proteinu 2 (bone morphogenetic protein receptor - BMPR2), mitochondriální/metabolickou dysfunkci a přes ovlivnění transkripčních faktorů mohou být obzvláště slibné (Obr. č. 1)



Obr. č. 1 Experimentální léčba plicní hypertenze - bílé bloky jsou doložené poruchy u PH; růžové bloky odpovídají intervencím, které se v experimentu osvědčily.

Podpora vaskulární homeostázy

Apelin je endogenní peptid, který má vasodilatační efekt na plicní cévy. Část efektu je prostřednictvím regulace endoteliálního NO a NO syntézy (Kim, 2014). Studie s apelinem na preklinických animálních modelech, prokázaly preventabilitu PH po jeho podání (Alastalo et al., 2011; Falcão-Pires et al., 2009). Dále Hennigs et al. prokázali, že podáním Nutlinu-3 (molekula fyziologicky přítomná v hladké svalovině plicních cév) lze docílit indukce genu APLN (apelin) a JAG1 k regeneraci plicní mikrovaskulatury a zvrácení PH (Hennigs et al., 2021).

Další signalizační molekulou, která je zásadní v patogenezi PAH, je *serotonin* (*5-hydroxytryptamin*, *5-HT*). 5-HT je uvolňován z endotelu a stimuluje proliferaci hladké svaloviny a konstriktci cév přes 5-HT receptory (Liu et al., 2013; Morecroft et al., 2005). Pacienti s idipatickou PAH mají vyšší hladiny cirkulujícího 5-HT (Hervé et al., 1995). Léčba antagonisty 5-HT_{1B} receptorů redukovala 5-HT indukovanou plicní vazokonstrikci u laboratorních potkanů s PH vyvolanou 2 týdenní expozicí hypoxií (Morecroft et al., 2005). Další potenciálně léčebnou možností PAH je inhibice syntézy 5-HT (Matthes and Bader, 2018). TPH1 a TPH2 jsou tryptofanové hydroxylázy zásadní pro syntézu 5-HT. U myši brání genetická TPH1 deficiencie experimentální PH (Dempsey et al., 2008; Morecroft et al., 2007; Rothman et al., 2011). Inhibice TPH1 experimentálními léky KAR5585 a KAR 5418 snižuje PH indukovanou u potkanů alkaloidem monokrotalinem nebo kombinací hypoxie a inhibitoru cévního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) SU5416 (Aiello et al., 2017).

Vasoaktivní intestinální peptid (VIP) je neuropeptidový hormon, který inhibuje proliferaci hladké svaloviny, agregaci destiček, zachycuje reaktivní kyslíkové radikály a indukuje vasodilataci aktivací receptorů VPAC1, VPAC2 a PAC1 (Laburthe et al., 2002). Aktivací těchto receptorů stimuluje cAMP a cGMP signalizační cesty. Genetická deficiencie VIP u myši vede ke spontánnímu rozvoji PH (Said et al., 2007). Suplementace VIP nebulizací prokazatelně zlepšila hemodynamiku u pacientů s PAH, vedoucí ke snížení PVR a zlepšení šestiminutového testu chůze (Archer et al., 2010).

Endoteliální progenitorové buňky pocházejí z hemangioblastů v kostní dřeni, nebo mezodermálních kmenových buněk v periferní krvi. Z periferní krve se přesouvají k místům ischemie nebo do endoteliálního poškození, kde diferencují ve zralé endoteliální buňky, čímž přispívají k revaskularizaci a vaskulární homeostaze (Yoder, 2012). Ztráta nebo poškození endoteliální vrstvy je zásadní v rozvoji PH. Léčba endoteliálními progenitorovými buňkami z

pupečníku prokazatelně v animálním modelu zvrátí již rozvinutou PH nebo působí preventivně proti rozvoji PH (Takahashi et al., 2004; Zhao et al., 2005).

Inhibitor translace HIF-2 α (C76)

Jak HIF-1 α (hypoxií indukovaný faktor-1 α), tak HIF-2 α jsou důležitými regulátory reakce plicního oběhu na hypoxii (Semenza, 2012; Shimoda and Semenza, 2011). Ball a jeho kolegové prokázali, že genetická delece HIF-1 α v buňkách hladkého svalstva (SMC) u myši redukuje RVSP a tloušťku stěny plicní tepny v reakci na chronickou hypoxii (Ball et al., 2014), naopak „gain-of-function“ mutace HIF-2 α jsou asociovány s těžkou PH u pacientů (Gale et al., 2008). Studie s HIF-2 α inhibitorem u Sugena5416/hypoxického a monokrotalinového experimentálního potkaního modelu prokázala účinnost tohoto preparátu ve zvrácení remodelace plicních arterií, inhibici pravostranného srdečního selhání a prodloužení přežití (Dai et al., 2018).

Obnovení signalizace BMPR2

Heterozygotní ztrátové mutace v BMPR2 byly detekovány u více než 70% pacientů s hereditární PAH a u 10-40% pacientů se sporadickou idiopatickou PAH (Aldred et al., 2006). BMPR2 je členem rodiny receptorů růstových faktorů transkripčního růstového faktoru β a jeho funkce je zásadní v patogenezi PAH. Na buněčných a animálních modelech bylo prokázáno, že aktivace BMPR 2 signalizace je účinná v prevenci plicní vaskulární remodelace a snižuje rozsah plicní vaskulární proliferace (Long et al., 2015; Reynolds et al., 2007). V minulé dekádě byla vyvinuta malá peptidová molekula BMP9, jejíž podání u pacientů s PAH a mutací BMPR2 vedlo k prevenci apoptózy endoteliálních buněk v plicních arteriích (Long et al., 2015). Dále se tato substance projevila jako efektivní u SU5416-hypoxického a monokrotalinového potkaního modelu PAH (Long et al., 2015).

Inhibice proliferace

Rho kinázy jsou součástí četných intracelulárních signalizačních kaskád regulujících buněčnou adhezi, proliferaci, kontrakci, hypotrofii a apoptózu (Jaffe and Hall, 2005; Riento and Ridley, 2003). RhoA/ROCK (genová rodina Ras homologů a jeho efektor Rho asociovaná protein kináza) signalizace se podílí na patogenezi PH prostřednictvím remodelace a vazokonstrikce (Oka et al., 2008; Robertson et al., 2003, 2000). Fasudil je prvním inhibítozem ROCK a jeho podávání bylo spojeno se zlepšením patologických parametrů PH a remodelace plicních arterií u hypoxických a monokrotalinových modelů PH u potkanů (Abe et al., 2006, 2004; Li et al., 2007). U pacientů s PH vedlo i.v. podání fasudilu k akutnímu poklesu PVR (Fukumoto et al., 2005; Ishikura et al., 2006).

Protizánětlivé mechanismy

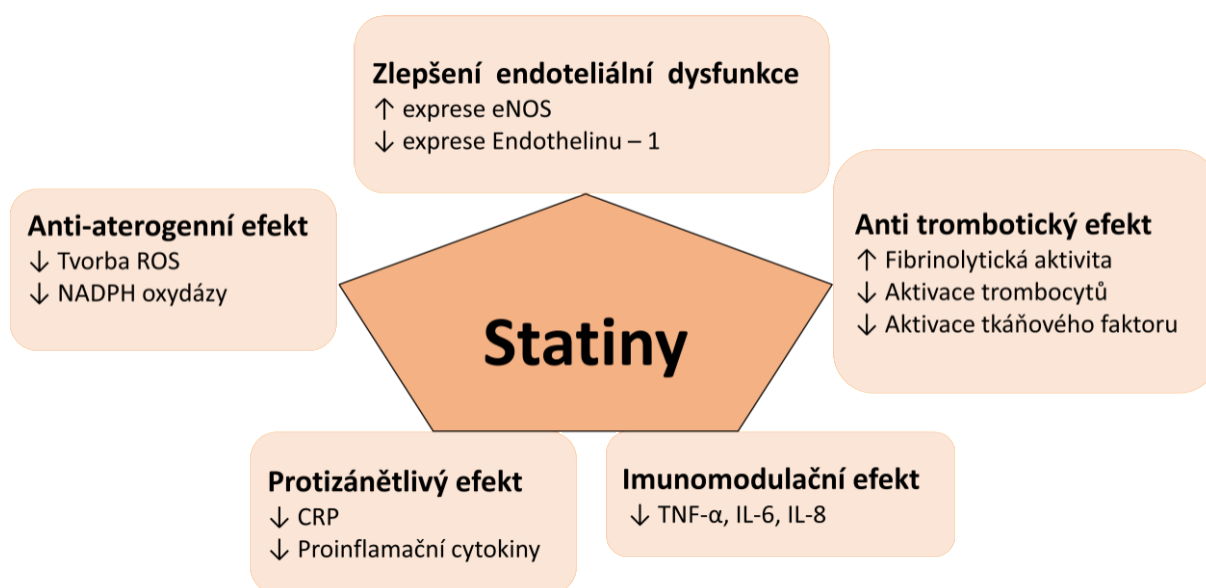
Chronický zánět je důležitým participujícím faktorem různých typů PH (Hassoun et al., 2009). Mezi zánětlivé mediátory patří cytokiny a chemokiny, které jsou u PH secernovány buňkami imunity, ale i lokálními endoteliemi a buňkami hladké svaloviny (Hassoun et al., 2009). Nejdůležitějšími zástupci z řad cytosinů a chemokinů jsou interleukin-1 β , IL-6, IL-8, tumor necrosis factor α (Rabinovitch et al., 2014). Jejich působení vede k vaskulární remodelaci u PH skrze podporu proliferace, migrace, a diferenciací cévních buněk (Rabinovitch et al., 2014). *Nukleární faktor kappa B* je transkripční faktor zodpovědný za řízení apoptózy, proliferaci a migraci buněk a jeho funkce je regulovaná cytokiny a chemokiny. Bylo prokázáno, že nukleární faktor kappa B je zásadní v patogenezi PAH skrze aktivaci proinflamačních a proliferačních stimulů v hladké svalovině plicních arterií a že je zodpovědný za uvolňování vazokonstrikčně a pro-proliferačně působícího endotelinu-1 (Wort et al., 2009). Farmakologická blokáda nukleárního faktoru kappa B u potkanů s experimentálně navozenou monokrotalinovou PH byla efektivní a vedla k poklesu PH. *Leukotrien B₄* je prozánětlivý lipid syntetizovaný v těle z arachidonové kyseliny a podání

antagonisty receptoru leukotrienu B₄ vedlo k redukci hypertrofie pravé komory monokrotalinového modelu PH u potkanů (Tian et al., 2014).

Ovlivnění metabolismu

Statiny

Statiny jsou inhibitory 3-hydroxy-methylglutaryl koenzym-A reductázy, enzymu esenciálního pro syntézu cholesterolu. Blokádou tohoto enzymu dojde v játrech ke snížení syntézy cholesterolu, což sérií komplexních dějů vede k upregulaci LDL (lipoprotein s nízkou hustotou) receptorů na povrchu hepatocytů s následnou zvýšenou clearance LDL částic z krve. (Bedi et al., 2016; Horton et al., 2002). Statiny jsou zavedenou terapií pro primární i sekundární prevenci ischemické choroby srdeční (Zhou and Liao, 2009) a k léčbě hypercholesterolemie. 4S studie byla první, která potvrdila lineární vztah mezi četností kardiovaskulárních příhod a hladině LDL-C (Group, 1994). Klinický benefit statinů byl přisuzován převážně jeho schopnosti snižovat LDL-C. Během posledních dvou dekad se ale ukázalo, že efekt statinů na sníženou četnost kardiovaskulárních příhod u pacientů s ischemickou chorobou srdeční není dán jen jejich vlivem na dostupnost cholesterolu v séru jako substrátu pro tvorbu aterosklerotických plátů (Landmesser et al., 2005; Liu et al., 2009). Opakovaně bylo prokázáno, že statiny kromě snižování LDL-C vykazují také vlastnosti antioxidační, protizánětlivé, imunomodulační, antiproliferativní, plakové stabilizace, endotelové hemostázy a prevence agregace destiček. Tyto vlastnosti, nezávislé na cholesterolu, se nazývají pleiotropní účinky statinů (Liao and Laufs, 2005; Zhou and Liao, 2009) (Obr. č.2).



Obr. č. 2 Pleiotropní účinky statinů

Výzkum mechanismů, na nichž jsou tyto účinky statinů založeny, odhalil široký dopad biosyntetické dráhy cholesterolu na biologii buněk savců od modulace buněčné signalizace až po posttranslační modifikaci proteinů a regulaci genové exprese (Buhaescu and Izzedine, 2007). Mevalonát je klíčovou molekulou pro pleiotropní účinek statinů, je prekurzorem cholesterolu a mnoha nesteroidních isoprenoidních meziproductů, jako jsou geranylgeranyl pyrofosfát, farnesyl pyrofosfát, dolicholy, isopentanyl adenosin, a polyisoprenoidní postranní řetězce ubiquinonu a heme-A. Tyto isoprenoidové meziproducty jsou zodpovědné za posttranslační modifikace a aktivace několika signálních/intracelulárních proteinů, jako jsou jaderné laminy, podjednotka γ -subjednotky heterotrimerických G-proteinů a malé GTP vázané proteiny Ras, Rho, Rab, Rac, Ral nebo Rap (Wang et al., 2008; Zhou and Liao, 2010, 2009). Tyto signální proteiny hrají nepostradatelnou roli v mnoha buněčných procesech – buněčné diferenciaci a proliferaci, myelinizaci, buněčné signalizaci a endocytotickém/exocytotickém transportu (Zhou and Liao, 2010). Ras hraje klíčovou roli v buněčném růstu a proliferaci, Rac sehrává důležitou roli při tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů a Rho v tvorbě prozánětlivých cytokinů, oba se tedy podílejí na tvorbě a udržení

zánětu. Jedním z pozitivních efektů statinů je protizánětlivý účinek. Tohoto efektu statiny dosahují již skrze redukcí LDL cholesterolu, který je ve své oxidované podobě ox-LDL silně prozánětlivý (Quist-Paulsen, 2010). Vysoce citlivý C-reaktivní protein (hsCRP) je nespecifický marker zánětlivých onemocnění a je nezávislým prediktorem rizika kardiovaskulárních onemocnění a vaskulárního rizika, nezávisle na hladinách cholesterolu (Liao and Laufs, 2005). Statiny hladinu hsCRP snižují (Montecucco et al., 2009). Klíčovými molekulami v progresi zánětu jsou reaktivní formy kyslíku. Hlavním zdrojem endoteliálních reaktivních forem kyslíku je NADPH oxidáza (Park et al., 2006; Pendyala et al., 2009), jejíž činnost podléhá regulaci statiny. Komplex NADPH oxidázy se skládá ze dvou membránově vázaných složek, Nox2 a p22phox, dále pak z několika cytosolických regulačních podjednotek včetně Rac1, p47phox a p67phox (Jones et al., 1996; Li and Shah, 2001). Stimulace extracelulárními prozánětlivými cytokiny, ischemií/reperfuzí nebo hyperoxií vede k posttranslační modifikaci a translokaci cytosolických složek, jejichž důsledkem je vytvoření aktivovaného komplexu NADPH oxidázy na membráně (Pendyala et al., 2009). Statiny zabraňují translokaci podjednotek Rac1 a p47phox k membráně. NADPH tedy nemůže být aktivována a tvorba reaktivních kyslíkových radikálů je potlačena (Chen et al., 2008)

Důležitou funkční komponentou PH je vazokonstrikce. Statiny zlepšují relaxaci závislou na endotelu prostřednictvím mechanismů, které zahrnují indukci endoteliální syntázy oxidu dusnatého a produkci NO (Kureishi et al., 2000; Laufs et al., 1997; Nishimura et al., 2002). V návaznosti na první studii, která objevila efekt statinů v léčbě experimentálně navozené plicní hypertenze (Nishimura et al., 2002), se objevila řada experimentů potvrzujících schopnost různých statinů alespoň částečně zabránit rozvoji PH u několika experimentálních modelů u potkanů, včetně chronické hypoxie (Girgis et al., 2003; Murata et al., 2005), monokrotalinového (Guerard et al., 2006; Laudi et al., 2007; Rakotoniaina et al., 2006; Satoh and Satoh, 2009; Sun and Ku, 2008), SU5416 v kombinaci s hypoxií (Taraseviciene-Stewart

et al., 2006), transgenních potkanů nadměrně exprimujících renin (DeMarco et al., 2009) a u potkanů s PH způsobenou plicní fibrózou vyvolanou neomycinem. Podobný efekt byl pozorován u potkanů (Lee et al., 2005) a morčat (Wright et al., 2011) s PH vyvolanou kouřením. Atorvastatin zabránil rozvoji PH vyvolané virem HIV u makaků (Rabacal et al., 2019).

Kromě prevence PH na zvířecích modelech bylo opakovaně ukázáno, že statiny snižují již rozvinutou PH u monokrotalinových (Jasińska-Stroschein et al., 2014; Nishimura et al., 2003; Pei et al., 2011; Satoh and Satoh, 2009) a hypoxií indukovaných (Girgis et al., 2007) potkaních modelů, ačkoliv na druhou stranu existují také zprávy o minimální účinnosti statinů proti již zavedené monokrotalinové PH (McMurtry et al., 2007; Sun and Ku, 2008).

U lidí jsou studie méně průkazné. Tři nezávislé metaanalýzy předchozích klinických studií nezjistily žádný příznivý účinek léčby statiny na PH ze všech příčin (Anand et al., 2016; Rysz-Górzynska, n.d.; Wang et al., 2016). To by mohlo souviset s paradoxem, že statiny sice snižují LDL cholesterol (Stroes, 2005), jenže ten mají pacienti s PAH nízký a úspěšná léčba PH tyto nízké hladiny naopak zvyšuje (Kopeć et al., 2017). Nicméně samostatná metaanalýza zaměřená pouze na pacienty s CHOPN zjistila sníženou PH u pacientů léčených statiny (Lu et al., 2019).

Pokud jde o mechanismy, kterými mohou statiny zmírnit PH, většina dosavadních studií se zaměřila především na obnovení exprese NO syntázy a/nebo aktivity snížené plicní hypertenzí (Guerard et al., 2006; Murata et al., 2005; Pei et al., 2011; Rakotoniaina et al., 2006). Byla také zaznamenána statinem snížená plazmatická koncentrace asymetrického dimethylargininu, endogenního inhibitoru NO syntézy (Pei et al., 2011). Zejména s ohledem na radikálové vlastnosti NO a jeho rychlou reakci se superoxidem za vzniku vysoce cytotoxického peroxynitritu nemusí ovšem zvýšení NO mít vždy příznivý efekt (Hampl and

Herget, 2000). NO navíc nemusí být při PH vždy snižené, může být dokonce kompenzatorně zvýšené (Hampl and Herget, 2000). Je známo, že produkce NO izoformou NO syntázy II (iNOS) ve skutečnosti přispívá k zahájení plicní hypertenze během prvních dnů hypoxické expozice (Hampl et al., 2006).

Důležitější může být, že statiny působí jako antioxidant, a to prostřednictvím několika mechanismů (Beltowski, 2005; Davignon et al., 2004), i když na druhé straně byl u některých experimentálních modelů hlášen i prooxidační účinek statinů (Beltowski, 2005). Zvýšený oxidační stres je významnou komponentou chronické hypoxické plicní hypertenze (Herget et al., 2000; Lachmanová et al., 2005; Lai et al., 1998). Antioxidační aktivita statinů tak může částečně vysvětlit jejich terapeutické účinky při plicní hypertenzi. Zavedeným markerem oxidačního stresu je plazmatický malondyaldehyd; hladina malondyaldehydu je výrazně snížena (Zinellu et al., 2019). Statiny také mohou působit jako antioxidanty tím, že usnadňují redukci jiných proteinů výměnou cystein thiol-disulfidu (Haendeler et al., 2004).

Pozitivní efekt statinů byl zjištěn i v kontextu dalších onemocnění. Agarwal et al. prokázali pozitivní účinky na revmatoidní artritidu inhibicí a downregulací cytokinů a chemokinů (Agarwal et al., 2010). Metaanalýza zahrnující jednu randomizovanou a devět observačních studií u téměř jednoho milionu lidí, kteří byly léčeni statiny, prokázala 42% snížení rizika hluboké žilní trombózy a 30% snížení výskytu plicní embolie (Khemasuwan et al., 2010).

Je známo, že statiny stimulují ATP senzitivní K^+ kanály (které ovšem hrají v regulaci hladkého svalstva plicních arteriálních cév nejdříve jen malou roli) (Sehra et al., 2017). Bylo ale také hlášeno, že statiny aktivují i napětově řízené K^+ kanály (K_v) obecně (Chen et al., 2016) a inhibují $K_v1.3$ kanály v rakovinných T buňkách (Teisseyre et al., 2021). U hladkého svalstva cév je upregulace $K_v1.3$ důležitá pro proliferaci a migraci (Cheong et al., 2011; Ciudad et al., 2015). Vliv statinů na aktivitu vápníkem řízených K^+ kanálů (BK_{Ca}) nebyl

hlášen, i když mohou aktivovat K_{Ca} kanály s malou vodivostí (McNeish et al., 2012). Statiny však mohou aktivovat kanály BK_{Ca} nepřímo, prostřednictvím jejich známé podpory NO aktivity. NO způsobuje plicní vazodilataci aktivací BK_{Ca} kanálů (Archer et al., 1994; Hampl et al., 1995).

Dehydroepiandrosteron

Dehydroepiandrosteron (DHEA) je přirozeně se vyskytující steroidní hormon odvozený od cholesterolu vylučovaný převážně z kůry nadledvin. U lidí slouží jako prekurzor pro syntézu androgenů a estrogenu (Labrie et al., 2001). V krvi se vyskytuje převážně ve formě 3 β -sulfátesteru (DHEA S) na který je konvertován sulfotransferázami v játrech a kortexu nadledvin. Většina efektů DHEA je zprostředkována právě skrze DHEA S formu (Celec and Stárka, 2003).

DHEA je aktivátor BK_{Ca} kanálů (Arlt et al., 1999; Peng et al., 1997) a potentní antioxidační agens (Iwasaki et al., 2004). Svým účinkem způsobuje hyperpolarizaci membrán buněk hladké svaloviny plicních arteriol s jejich následnou relaxací, rezultující ve vazodilataci. Dalšími mechanismy jak DHEA způsobuje vazodilataci je zvýšením produkce NO a cGMP (Liu and Dillon, 2002; Simoncini et al., 2003) nebo prostřednictvím přeměny na estrogen (Hayashi et al., 2000). DHEA také zabraňuje influxu Ca^{2+} skrze inhibici napěťové řízených vápníkových kanálů (T-typ) (Chevalier et al., 2012) a snižuje za hypoxie akumulaci HIF-1 α v buňkách plicních cév (Dessouroux et al., 2008).

Membránový potenciál buněk hladké svaloviny je regulován zejména kanály propustnými pro K^+ , konkrétně hlavně BK_{Ca} kanály (Peng et al., 1997), K_v kanály (Chauhan-Patel and Spruce, 1997; Michelakis et al., 2000) a $KCNQ$ kanály (Joshi et al., 2009). S rozvojem chronické hypoxické PH jsou funkce i exprese těchto draselných kanálů downregulovány (Krick et al., 2001; Olschewski et al., 2002). Mechanismem downregulace může být změna redoxního

stavu vyvolaná chronickou hypoxií (Reeve et al., 2001). Snížení hustoty draslíkem neseného proudu na membráně hladké svaloviny plicních arteriol má za následek depolarizaci (Smirnov et al., 1994), která aktivuje napětově řízené Ca^{2+} kanály a tím vede ke zvýšení hladiny intracelulárního vápenatého kationtu. Vyšší koncentrace intracelulárního Ca^{2+} (amplifikovaná kalcium-indukovaného efluxu vápníku ze sarkoplasmatického retikula) vede ke kontrakci svaloviny a k proliferaci (Platoshyn et al., 2000).

Plazmatické hladiny DHEA/DHEA S jsou u pacientů s PH prokazatelně snižené (Baird et al., 2021; Ventetuolo et al., 2016). Ve studiích byl prokázán efekt DHEA na redukcii a prevenci PH a související hypertrofii pravé komory srdeční u potkanů vystavených hypoxii odpovídající PH při chronickém plicním onemocnění (Skupina 3 dle NICE klasifikace PH) (Bonnet et al., 2003; Hampl et al., 2003b) a u potkanů s podvázanou aortou odpovídající PH při onemocnění levého srdce (Skupina 2 dle NICE klasifikace PH) (Zhang et al., 2019). U pacientů s CHOPN a PH léčba DHEA výrazně zlepšuje vzdálenost šestiminutového testu chůze, plicní hemodynamiku a difuzní kapacitu pro oxid uhelnatý, bez zhoršení výměny plynů (Dumas de La Roque et al., 2012). Zároveň bylo prokázáno, že vyšší hladiny estrogenu a nižší hladiny DHEA byly spojeny se zvýšeným rizikem PAH u lidí (Ventetuolo et al., 2016) a zvýšeným rizikem a závažností PAH u žen po menopauze (Baird et al., 2018). DHEA/DHEA S má antioxidační aktivitu související s inhibicí syntézy NADPH (Schwartz and Pashko, 2004). Vzhledem k výše zmíněným vlastnostem, a protože jeho exogenní podání je u lidí dobře snášeno, DHEA (nebo DHEA S) je atraktivní jako potenciální léčba PH.

Na základě těchto zjištění v současné době probíhá randomizovaná dvojitě zaslepená placebo kontrolovaná studie s perorálně podávaným DHEA u pacientů s PAH (EDIPHY) (Walsh et al., 2021). DHEA a DHEA S nemají pouze pozitivní efekty, byl zjištěn i jejich prooxidační účinek při vyšších dávkách (Hayashi et al., 1994; Mastrocola et al., 2003).

Alveolární makrofágy a jejich produkce reaktivních forem kyslíku se podílejí na mechanismu hypoxické PH (Žaloudíková et al., 2016, p. 1). DHEA také podobně jako statin inhibuje 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl koenzym A reduktázu (Pascale et al., 1995).

Sartany

Sartany jsou rodina vysoce selektivních antihypertenziv, které působí blokováním aktivace AT1 receptorů angiotenzinu II (Timmermans, 1999), multifunkčního peptidu s vazokonstrikčním účinkem, který je jedním z hlavních peptidů odpovědných za regulaci krevního tlaku. Když jsou receptory AT1 aktivovány, indukují vazokonstrikci, uvolňují aldosteron, způsobují zvýšení vylučování sodíku a vody, snižují objem plazmy a zvyšují krevní tlak. Mechanismus účinku sartanů je podobný mechanismu antihypertenzních inhibitorů angiotenzin konvertujícího enzymu (ACE inhibitory) (Schramm et al., 2012), ale na rozdíl od posledně jmenovaných nemají sartany žádný vliv na degradaci bradykininu, peptidu s výraznými vazodilatačními vlastnostmi. U ACE inhibitorů dochází k nedostatečné inaktivaci bradykininu a následnému výskytu nežádoucích účinků, jako je suchý dráždivý kašel a angioedém. Na rozdíl od ACE inhibitorů, nebrání AT1 inhibitory aktivaci AT2 receptorů.

Systém renin-angiotensin-aldosteron (RAAS) je uznáván jako jeden z nejsilnějších regulátorů rovnováhy sodíku, objemu tělních tekutin a krevního tlaku. S vývojem léků, které účinně blokují různé složky RAAS, se projevíly terapeutické výhody inhibice tohoto systému při hypertenzi, srdečním selhání, cukrovce a dalších patofyziologických stavech.

Renin je zodpovědný za první a důležitý regulační krok v kaskádě RAAS, bez enzymu reninu nejsou žádné angiotensiny (Danser et al., 1997). Angiotensinogen je prekurzorem všech angiotensinů a je přeměněn působením reninu na angiotensin I. Enzym konvertující angiotensin 1 pak přeměňuje angiotensin I na hlavní efektorový peptid RAAS, angiotensin II. Angiotensin II prostřednictvím stimulace receptoru angiotenzinu II typu 1 (AT1) vyvolává

všechny klasické účinky RAAS, včetně vazokonstrikce, zadržování vody a sodíku, syntézy aldosteronu, prozánětlivých účinků a růstu a remodelace, oproti tomu stimulace receptoru AT2 vede k vazodilataci a natriuríze autokrinní kaskádou zahrnující bradykinin, NO a cGMP. Bylo také zjištěno, že receptor AT2 kontroluje vazodilatační prostaglandiny, které hrají roli v regulaci krevního tlaku. Zdá se tedy, že receptor AT2 má ochrannou roli při regulaci krevního tlaku a vylučování sodíku (Carey et al., 2000). ACE2, blízký homolog ACE, jehož substrátem je rovněž angiotensin I, funguje jako negativní regulátor angiotenzinového systému. V plicích chrání ACE2 před akutním poškozením plic u zvířecích modelů ARDS (Kuba et al., 2006).

Angiotensin II (AngII) je považován za přispěvatele k patologické vaskulární remodelaci při PH. Zejména exprese ACE a receptoru AT1 jsou zvýšeny v plicní vaskulatuře modelů PH (de Man et al., 2012; Morrell et al., 1995; Orte et al., 2000). Předchozí studie prokázaly, že losartan (Morrell et al., 2005; Rondelet et al., 2005; Xie et al., 2010) a telmisartan (Okada et al., 2009) tlumí PH u lidí a zvířecích modelů, avšak jiné studie neprokázaly příznivé účinky blokátorů angiotenzinových receptorů (ARB) na PH (Saygili et al., 2007). Valsartan má příznivé účinky na systémovou arteriální hypertenzi, srdeční selhání, včetně regrese při remodelaci komor a zlepšení systémové vaskulární rezistence (Anand et al., 2005; Croom and Keating, 2004; Ridker et al., 2006). Kromě toho valsartan snižuje hladiny zánětlivých faktorů, ROS a expresi tkáňového aktivátoru plazminogenu (Manabe et al., 2005; Yang et al., 2009)

Inhibitory neprilysinu

Mozkový natriuretický peptid (BNP) je součástí systému natriuretických peptidů a je syntetizovaný převážně srdečními komorami (Suga et al., 1992). Chronická hypoxie způsobuje trvalé zvýšení afterloadu s hypertrofií pravé komory (RV), zvýšenou kontraktilitou

a nadměrnou expresí BNP v reakci na přetížení pravostranných srdečních oddílů (Nagaya et al., 1998; Tóth et al., 1994). Natriuretické peptidy mají kardio-renoprotektivní účinky. BNP relaxuje kontrahované izolované plicní tepny a tlumí hypoxickou vazokonstrikci v izolovaných plicích experimentálních potkanů (Hill et al., 1994), dále má antiproliferativní účinek na hladké svalstvo (Schirger et al., 2000) a snižuje produkci reaktivních kyslíkových radikálů a tím oxidativní stres v plicích během zánětu (Chiurchiù et al., 2008). Natriuretické peptidy působí v opozici vůči angiotenzinu II (ANG II), ET-1 a sympatickému nervovému systému (Sigurdsson and Swedberg, 1996), a proto mají potenciál zlepšit funkci RV u pacientů s PAH.

Cirkulující natriuretické peptidy jsou matabolizovány a eliminovány 2 cestami. První je vazba na natriuretický peptidový receptor-C s následnou endocytózou a lysozomální degradací (Almeida et al., 1989). Druhou cestou je štěpení peptidu neutrální endopeptidázou 24.11 (NEP, neprilysin) (Soleilhac et al., 1992). Poločas rozpadu BNP je 20 minut (Espiner et al., 1995).

Terapeutické zvýšení hladin BNP je možné dvěma způsoby. Za prvé, BNP může být podáván intravenózně. Bylo prokázáno, že podávání lidského BNP v dávce $10 \text{ pmol kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ má akutní vazodilatační účinek na plicní oběh (Cargill and Lipworth, 1995) a snižuje PH u pacientů s cor pulmonale (Cargill and Lipworth, 1996). Intravenózní podání BNP během expozice chronické hypoxii vede ke snížení plicní cévní remodelace (Jin et al., 1990; Klinger et al., 1998), snížení poměru RV/tělesné hmotnosti a snížení muskularizace periferních plicních cév (Klinger et al., 1998). Další studie s rekombinantním lidským BNP nesiritidem prokázaly snížení PVR u postkapilární PH (Khush et al., 2009; Michaels et al., 2005) a zvýšení hladin NO v prekapilární PH (Khush et al., 2009). Druhou možností zvýšení hladin BNP je inhibice neprilysinu (Corti et al., 2001), u níž bylo prokázáno, že inhibuje vývoj hypoxií vyvolané PH u potkanů (Klinger et al., 1993).

LCZ696 je kombinovaný přípravek antagonisty receptoru AT1 valsartanu a sakubitrilu (inhibitoru neprilysinu) a úspěšně je používán při léčbě chronického srdečního selhání levé komory se sníženou ejekční frakcí (McMurray et al., 2014).

Ovlivnění transkripce

Inhibitor translace HIF-2 α (C76)

HIF jsou transkripční faktory, které jsou aktivní v době nedostatku O₂ (Smith et al., 2008). Za normoxie jsou α subjednotky hydroxylovány za pomoci HIF prolyl-hydroxylázy, takto hydroxylované jednotky jsou následně rozpoznány von Hippel-Lindau proteinem, který je označený pro následnou rychlou degradaci v proteasomu (Maxwell et al., 1999). Vzhledem k tomu, že HIF prolyl-hydroxyláza potřebuje O₂ jak kosubstrát, nedochází za podmínek hypoxie k degradaci α subjednotky a ta může následně po vazbě na β subjednotku uplatnit svůj regulační vliv na plicní cirkulaci a na erytropoézu a angiogenezi. (Semenza, 2012; Shimoda and Semenza, 2011).

Studie s HIF-2 α inhibitorem translace C76 u Sugen5416/hypoxického a monokrotalinového experimentálního potkaního modelu prokázala účinnost tohoto preparátu ve zvrácení remodelace plicních arterií, inhibici pravostranného srdečního selhání a prodloužení přežití (Dai et al., 2018).

1.4 Animální modely plicní hypertenze

Zvířecí modely jsou nezbytné k identifikování molekulárních mechanismů onemocnění a pro hledání nových terapeutických cílů. PH je soubor onemocnění, která jsou multifaktoriální a jejichž

morfo-patologické změny jsou velmi komplexní. Žádný zvířecí model věrně nereprodukuje celé klinické spektrum PH nebo dokonce její jednotlivou podskupinu. Na omezenost zvířecích modelů PH dále nepřímo poukazuje skutečnost, že mnoho léků, které byly slibné během preklinického hodnocení, mají nízký úspěch během následného klinického testování

Zvířecí modely PH v důsledku hypoxie nebo plicních onemocnění (skupina 3)

Zvířecí modely týkající se chronické hypoxie

Tento experimentální model nejvěrněji simuluje změny na plicních cévách navozené dlouhodobou expozicí vysoké nadmořské výšce. Při vystavení experimentálního zvířete chronické alveolární hypoxii (obvykle po dobu 3 týdnů), dojde k navození konstriktce rezistentních cév v plicním řečišti. Konstriktce a následná muskularizace cév přispívá ke zvýšení tlaku v plicnici. Bylo navrženo několik mechanismů de novo muskularizace malých plicních arteriol, včetně distální expanze preexistujících hladkých svalových buněk cév a transdiferenciace endotelu v mezenchym (Qiao et al., 2014; Suzuki et al., 2018) Hlavními nedostatky tohoto modelu jsou relativně mírná závažnost PH, která je částečně dána omezeným rozsahem patologické přestavby plicního cévního řečiště, a dále neschopnost replikovat maladaptivní události vedoucí k selhání RV (Stenmark et al., 2009). Navzdory těmto omezením, model chronické hypoxie poskytuje cenné poznatky o vazokonstrikční složce PH a jeho výhodou je, že je relativně levný, snadno proveditelný a vysoce reprodukcibilní. Dosavadní výsledky získané na tomto modelu jsou základem pro v současnosti

dostupné léčebné postupy u PAH. Navíc expozice hlodavců chronické intermitentní hypoxii se rovněž používá k napodobení cyklického průběhu hypoxémie, která je pozorována u pacientů s obstrukční spánkovou apnoe (Campen et al., 2005; Nisbet et al., 2009), stavu komplikovaného mírnou nebo středně těžkou PH, pokud není léčen (Sajkov et al., 2002). Bylo prokázáno, že vystavení chronické intermitentní hypoxii po dobu několika týdnů vyvolává příznaky PH, což se projevilo ztlustěním malých plicních cév, mírným zvýšením RVSP a mírným zvýšením hmotnosti RV (Fagan, 2001; Nisbet et al., 2009). S mírnou až střední PH se často setkáváme u chronické obstrukční plicní nemoci – ireverzibilního plicního onemocnění vedoucímu vlivem chronického zánětu k chronické bronchitidě a rozvoji emfyzému. Vzhledem k tomu, že onemocnění nejčastěji vzniká v důsledku dlouhodobé inhalace dráždivých látek, zejména cigaretového kouře, se expozice cigaretovému kouři stala jedním z nejčastěji užívaných zvířecích modelů. Výsledky získané na zvířatech ukázaly, že chronická expozice cigaretovému kouři, obvykle po dobu 4 až 6 měsíců, je doprovázena ztlustěním ve stěně plíni arterie a zvýšením RVSP (Lee et al., 2005; Seimetz et al., 2011; Wang et al., 2010; Weissmann et al., 2014; Wright and Churg, 1991). Analýza časového průběhu poškození plic na modelech hlodavců opakovaně prokázala, že remodelace plicních cév a PH může předcházet rozvoji emfyzému (Seimetz et al., 2011; Wright and Churg, 1991). Na základě těchto dat je zřejmé, že cigaretový kouř má přímý dopad na plicní vaskulaturu a PH u chronické obstrukční plicní nemoci nemusí být nutně způsobena úbytkem kapilár u emfyzému a chronické alveolární hypoxie.

Idiopatická plicní fibróza

Byly vytvořeny různé zvířecí modely zobrazující parenchymovou plicní fibrózu s různým stupněm remodelace plicních cév a PH, přičemž nejlépe charakterizovaným je model podání bleomycinu u hlodavců (Jenkins et al., 2017). Podávání tohoto chemoterapeutika vede k rozvoji muskularizace plicních cév a doprovodné lehké PH (Almudéver et al., 2013;

Hemnes et al., 2008; Ruffenach et al., 2019). Pro adekvátnější připodobnění PH 3. skupiny byl vyvinut model dvou zásahů potkanů postupným vystavením bleomycinu a monokrotalinu (Ruffenach et al., 2019). Tento model je v praxi vhodný k posouzení vlivu léčiv na PH u již existující plicní fibrózy.

Zvířecí modely PH v důsledku onemocnění levého srdce (skupina 2)

Dostupné modely používané ke studiu PH2 používají jednu ze tří hlavních strategií (Boucherat et al., 2022). Jednou z nich je cílené poranění levé komory, které vede k jejímu selhání. Příkladem je infarkt myokardu navozený podvazem koronární tepny (Jasmin et al., 2004, 2003) nebo experimentální metabolický syndrom (Lai et al., 2016). Tyto modely věrně napodobují konkrétní klinické situace, ale účinky na plicní oběh mohou být zkreseleny jinými účinky primárního experimentálního inzultu. Dalším přístupem je přímé zvýšení tlakového přetížení levé komory zvýšením odporu výtokového traktu levé komory. Toho se dosahuje částečným vnějším zasvorkováním nebo podvázáním vzestupné aorty u myši (Chen et al., 2012; Rockman et al., 1991) a nebo častěji u potkanů (suprakoronární aortální bandáž) (Dai et al., 2004; Hentschel et al., 2007; Hunt et al., 2013; Kerem et al., 2010; Lambert et al., 2021; Ranchoux et al., 2019). Třetí možností je částečné zasvorkování velkých plicních žil, nicméně tento přístup byl popsán pouze u větších zvířat (prasat) (Aguero et al., 2014; Pereda et al., 2014; van Duin et al., 2019).

Společným jmenovatelem těchto modelů je, že vyžadují dlouhou rekonvalescenci vážně nemocných zvířat po operaci na otevřeném hrudníku. Samotná operace je více či méně komplikovaná, časově náročná a vyžaduje dlouhou výukovou křivku. Proto je žádoucí vyvinutí technicky jednoduššího modelu využívajícího malé laboratorní hlodavce.

1.5 Léky navozená plicní hypertenze

V roce 1968 vzrostl mezinárodní zájem o PH z důvodu velkého nárůstu počtu pacientů s PH ve Švýcarsku, Německu a Rakousku (Gurtner, 1979; Gurtner et al., 1968) v kontextu užívání v té době nového preparátu na léčbu obezity, aminorexu fumarátu. Úmrtnost byla vysoká, přičemž téměř polovina osob s aminorexem indukovanou PH zemřela do 10 let od stanovení diagnózy (Greiser, 1973). Aminorex byl stažen z Evropského trhu v roce 1972. V návaznosti na tyto události byla pod záštitou WHO uspořádána první konference zabývající se PH s vytvořením patientských databází a závazkem k rozvoji výzkumu PH. Jako hlavní cíle byly stanoveny pochopení patogeneze onemocnění a hledání jeho terapeutických možností. Léky a toxiny navozená PH má dnes v klasifikaci PH své specifické místo.

Interferony

Interferony jsou cytokiny uvolňované imunomodulačními buňkami v reakci na infekce a malignity. Interferony byly vyvinuty jako léčba různých imunologických onemocnění a maligních procesů (George et al., 2012). V posledních pěti letech se objevily případy, které spojují užívání interferonů s rozvojem PAH a vyvolaly obavy o bezpečnost. týkající se používání těchto látek v klinické praxi (Fruehauf et al., 2001; Jochmann et al., 2005).

Dasatinib

Inhibitory tyrozinkinázy jsou klíčovou léčbou pro chronickou myeloidní leukémií, hematologickou malignitu způsobenou chromozomální translokací (BCR/ABL), která vede ke vzniku patogenního tyrozinkinázového proteinu (Montani et al., 2010). Tento patologický protein může být blokován inhibitory tyrozinkinázy, což následně prodlužuje fázi remise. Navzdory terapeutickému přínosu dasatinibu u pacientů s chronickou myeloidní leukémií, četné studie nyní ukázaly, že dasatinib může vést k rozvoji PAH (Montani et al., 2010;

Weatherald et al., 2017). Potenciálním mechanismem vzniku PH je zde imunitní deregulace s ohledem na nálezy CD3+ lymfocytů a makrofágů ve stěně remodelovaných cév potkanů předlěčených desatinibem a následně exponovaným hypoxií dle standardní praxe (Guignabert et al., 2016).

Mitomycin C

Mitomycin C je bio redukční alkylační činidlo, které se používá jako chemoterapeutikum při léčbě různých malignit (Ragonese et al., 2016). V posledních letech byl mitomycin C identifikován jako možný rizikový faktor pro plicní venookluzivní nemoc (Gagnadoux et al., 2002), vzácné formy PAH s incidencí 0,5 % a s výskytem 0,5 % případů na milion obyvatel ročně a spojenou s velmi špatnou prognózou (Huertas et al., 2011; Montani et al., 2016).

Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu

Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI) jsou léky primárně určené k léčbě deprese, nicméně někteří ze zástupců této skupiny jsou užíváni v léčbě obezity. Fenfluramin zvyšuje hladinu cirkulujícího serotoninu a 5-HT uvolněním z destiček interakcí s 5-HT transportérem (5-HTT) (Frström et al., 1977; Martín and Artigas, 1992). Elevovaný 5-HT následně působí vazokonstrikci malých plicních arterií přes 5HT_{1B} receptory (Morecroft et al., 1999) a zvýšenou proliferaci hladké svaloviny (Pitt et al., 1994). Jedna populační kohortová studie, která zkoumala více než 1,6 milionu kojenců zjistila, že děti narozené matkám, které užívaly SSRI v pozdním těhotenství měly více než dvakrát vyšší pravděpodobnost rozvoje PH novorozenců (Kieler et al., 2012). PAH u dospělých exponovaných SSRI dosud nebyla důkladně zkoumána.

Metamfetamin

Metamfetamin je vysoce návykové neurostimulans se systémovými účinky, které mohou mít za následek orgánovou dysfunkci a smrt (Gotway et al., 2002). Molekulární struktura je podobná aminorex fumarátu a fenfluraminu, stimulantům, které jsou asociovány s léky navozenou PH (Fishman, 1999). Asociace mezi PAH a užíváním metamfetaminu byla prokázána (Chin et al., 2006; Schaiberger et al., 1993).

Odhalování potenciálních nežádoucích účinků zůstává stále jedním ze zásadních endpointů pokusů v laboratořích zaměřených na preklinické testování léčiv.

2. CÍLE A HYPOTÉZY

Primárním cílem práce bylo ověřit předpoklad, že kombinace dvou látek, z nichž každá se osvědčila (minimálně v experimentu) jako částečná léčba PH, bude pro léčbu PH účinnější než použití každé z těchto látek samostatně. Konkrétně jsme se rozhodli ověřit kombinaci DHEA S a simvastatinu vůči chronické hypoxické PH (3.skupina PH). Rozhodli jsem se ověřit i *de facto* opačný scénář – že látka, která může být vůči nějakému jinému onemocnění užitečná, bude na základě svých vlastností potenciálně problematická vůči plicní cirkulaci (jako se to v minulosti ukázalo např. pro fenfluramin a další). Konkrétně jsme se zaměřili na stabilizátor HIF roxadustat, vhodný pro léčbu anémií. A konečně, při vědomí, že vzhledem k počtu pacientů, které postihuje PH, je mnohem častější PH skupiny 2, než skupiny 3, bylo naším posledním cílem připravit a charakterizovat jednoduchý animální model PH skupiny 3 jako předpoklad možného budoucího testování dalších léčebných možností vhodných této formy PH. Celkem jsme tedy ve 3 studiích testovali 3 hlavní hypotézy:

Hypotéza 1: Účinky simvastatinu a dehydroepiandrosteron sulfátu proti hypoxické plicní hypertenzi jsou aditivní.

Hypotéza 2: Stabilizátor HIF roxadustat zvyšuje plicní cévní rezistenci.

Hypotéza 3: Intrvaskulární částečná obstrukce vzestupné aorty vyvolá u potkanů levostranné objemové přetížení a „reaktivní“ plicní hypertenzi (tj. PH s komponentou zvýšené plicní arteriální rezistence).

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Etické aspekty

Pokusy byly prováděny na dospělých samcích potkanů Wistar (AnLab s.r.o., Praha, Česká republika) v souladu s principy ARRIVE pro používání pokusných zvířat a platným právem EU a ČR. Všechny experimenty, prostory kde byly prováděny i experimentátoři měli povolení požadovaná zákonem na ochranu zvířat proti týrání.

Potkani byli chováni při pokojové teplotě s volným přístupem ke standardní stravě (AnLab) a vodě. Při všech chirurgických zákrocích byli anestetizováni 30 mg.kg⁻¹ tělesné hmotnosti (BW), IP. Všechna léčiva a chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika s výjimkou roxadustatu, který byl zakoupen od firmy MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA. Dostatečná hloubka anestezie byla pravidelně kontrolována absencí reakce na lehký dotek rohovky kouskem papírového kapesníku. Po měřeních byli potkani usmrceni intrakardiálním podáním thiopentalu nebo vyjmutím srdce v hluboké anestezii.

3.2 DHEA a statin

Experimentální skupiny a podávání léčiv

Dospělí samci potkanů Wistar (~350 g na začátku experimentu) byli náhodně zařazeni do jedné z pěti skupin. Byla použita jedna normoxická kontrolní skupina (NC, n=16, chovaná po celou dobu experimentu na pokojovém vzduchu) a 4 chronicky hypoxické skupiny potkanů. Hypoxické skupiny byly vystaveny normobarické hypoxii (10 % O₂) po dobu 3 týdnů. Z toho jedné skupině byl po celou dobu hypoxické expozice podáván inhibitor 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reductázy, simvastatin, v pitné vodě v dávce 60 mg/l (skupina HS, n=9). Protože simvastatin není rozpustný ve vodě, byl nejprve rozpuštěn v malém objemu ethanolu

a poté přidán do pitné vody tak, že konečná koncentrace ethanolu byla 0,5 %. Dávka simvastatinu byla vypočtena na základě našeho dřívějšího pozorování (nyní potvrzeného), že dospělý samec potkana při 10 % O₂ vypije asi 30 ml/den a z toho se vypočte účinná dávka po podání (Kuang et al., 2010; Nishimura et al., 2003, 2002; Satoh and Satoh, 2009). Další skupina dostávala, rovněž v pitné vodě, DHEA S v dávce 100 mg/l (Hampl et al., 2003b) po celou dobu hypoxické expozice (skupina HD, n=10). Třetí hypoxická skupina byla léčena kombinací DHEA S (100 mg/l) a simvastatinu (60 mg/l) v pitné vodě s 0,5% ethanolem (skupina HDS, n=9). Poslední skupina pijící čistou vodu v hypoxii sloužila jako hypoxická kontrola (HC, n=9).

Množství ethanolu zkonsumovaného se simvastatinem považujeme za zanedbatelné, protože jako model mírného požívání alkoholu se používají desetkrát vyšší dávky (Jakoubek and Hampl, 2018; Silva et al., 2021). Abychom však ověřili, že rozdíly mezi skupinami nejsou způsobeny přítomností ethanolu v pitné vodě potkanů léčených simvastatinem, dostávaly části zbývajících skupin také 0,5 % ethanolu (8 z 16 potkanů v NC, 4 z 10 v HD a 3 z 9 v HC). Pokud není uvedeno jinak, výsledky byly evidentně stejné s ethanolem i bez něj, a proto byly pro statistickou analýzu sloučeny.

Experimentální protokol a měření

Po 3 týdnech hypoxie (nebo v odpovídajícím věku v NC) byli potkani anestezováni thiopentalem (30 mg/kg tělesné hmotnosti, intraperitoneálně). Tlak v plicnici byl měřen u potkanů s neporušeným hrudníkem spontánně dýchajících vzduch z místnosti pomocí katetrizace plicnice (Hampl et al., 2003b, 2003a; Herget and Palecek, 1972). Nejprve byla cestou vena jugularis zavedena do pravé komory mírně zahnutá zaváděcí kanyla (vnitřní průměr 1,2 mm) termoplasticky vytvarovaná do podoby hokejky (aby se usnadnil její průchod do pravé kmory). Poté byl vnitřkem tohoto zaváděče prostrčen katétr (vnější průměr 1,1mm) předtím termoplasticky vytvarovaný do podoby písmene U (velikost smyčky cca 7 mm). Při

vysouvání ze zavaděče se proto jeho ohnutý hrot v pravé komoře spontánně otáčel směrem k plicnici. Umístění v pravé komoře a plicní tepně bylo řízeno monitorováním tlakové vlny v reálném čase. Když katétr dosáhl plicnice, byl odstaněn zavaděč. Po zaznamenání stabilní hodnoty mPAP po dobu několika desítek sekund až pár minut byla trachea zpřístupněna kožním řezem na krku a použita k intubaci a ventilaci potkana vzduchem (50 dechů/min; vrcholový inspirační tlak 10 cm H₂O; koncový expirační tlak 0 cm H₂O). Poté byl hrudník opatrně otevřen stereotomií (se snahou minimalizovat krvácení) a na vzestupnou aortu byla umístěna ultrazvuková průtoková sonda (Transonic Systems Inc, Ithaca, NY, USA) k měření srdečního výdeje (Hampl et al., 2003a, 1993). U některých potkanů tento postup způsobil nadměrné krvácení, takže počet potkanů, pro které máme k dispozici hodnoty srdečního výdeje, je poněkud nižší než počet potkanů, pro které máme k dispozici ostatní proměnné. Srdeční index byl vypočten jako srdeční výdej/tělesná hmotnost a index PVR jako mPAP/srdeční index. Následně byly punkcí levé komory odebrány vzorky krve k měření hematokritu. Pro posouzení možné role změn NO byla měřena suma plazmatických koncentrací NO a jeho oxidačních produktů (dusitanů a dusičnanů, NO_x) v plazmě pomocí chemiluminiscence (NOA 280i, Sievers, Boulder, CO, USA) po horké kyselé redukci, jak již bylo popsáno (Beitl et al., 2016; Pinder et al., 2008).

Vzorky séra byly také použity ke stanovení koncentrace malondialdehydu pomocí HPLC (vysokoúčinné kapalinové chromatografie, high-performance liquid chromatography) jako měřítka oxidačního stresu (Del Rio et al., 2005). Ke vzorkům a standardům (1,1,3,3-tetraethoxypropan) o různých koncentracích bylo přidáno 0,05 % butylhydroxytoluenu, 0,44 M H₃PO₄ a 42 mM kyseliny tiobarbiturové. Vzorky byly zcentrifugovány a poté zahřívány při 100 °C po dobu 1 hodiny. Poté byly po dobu 5 minut chlazeny na ledu a následně byl komplex malondialdehydu a kyseliny tiobarbiturové extrahován do butanolu. Zkumavky byly odstředěny po dobu 5 minut při 10 000 g, aby se vytvořily dvě oddělené fáze. Alikvoty byly

pipetovány do zkumavek a měřeny pomocí HPLC (Jasco, Japonsko). Analýza byla provedena na koloně Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 4,6x 250 mm, 5 μm. Optimální průtok byl nastaven na 1 ml/min pro mobilní fázi o složení methanol/50 mM KH₂PO₄ (40:60, v/v). Fluorescenční detektor byl nastaven na 515/553 nm (excitace/emise). Vyhodnocení bylo provedeno pomocí softwaru ChromNAV (Jasco, Japonsko).

K měření míry produkce superoxidu v čerstvé krvi byla použita elektronová paramagnetická rezonance (EPR) s použitím 1-hydroxy-3-methoxykarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidin hydrochloridu (CMH, 10 μM) jako spinové sondy detekující superoxid (O₂⁻) (Chalupsky et al., 2015). Vzorky byly připraveny přidáním 5 μM diethyldithiokarbamátu, 25 μM desferroxaminu a 10 μM CMH (Noxygen, Elzach, Německo) a 5 μl čerstvé krve v 50 μl Krebs-Hepesova pufru. Vzorky byly umístěny do vzduchotěsných skleněných kapilár a spektra byla zaznamenána v EPR spektrometru s teplotně řízeným rezonátorem (Escan, Bruker Corp., Billerica, MA, USA). Nastavení EPR pro spinovou značku CMH bylo následující: centrální pole 3455 G, šířka záběru 10 G, frekvence 9,7690 GHz, mikrovlnný výkon 23. 89 mW a modulační amplituda 2,93 G. Spektra byla zaznamenávána po dobu 10 min.

Po získání všech vzorků bylo srdce rozřezáno a zváženo po částech v čerstvém stavu. Jako míra hypertrofie pravé komory byla použita hmotnost pravé komory v poměru k tělesné hmotnosti a k součtu hmotnosti levé komory a septa.

3.3 Aktivátor HIF zvyšuje plicní cévní rezistenci

Jedna skupina potkanů byla léčena roxadustatem po dobu 2 týdnů (skupina Rox2w, n=9). Pět miligramů roxadustatu bylo rozpuštěno v 25 μl DMSO + 200 μl PEG + 25 μl TWEEN 80 + 250 μl vody a aplikováno i.p. (10 mg/kg tělesné hmotnosti) každý druhý den (Burmakin et al., 2021; Wing et al., 2021). Protože jsme očekávali, že dojde ke zvýšení hematokritu, který sám

o sobě zvyšuje PVR, použili jsme další skupinu, která dostala roxadustat pouze jednou a byla zkoumána o 48 h později, aby mohly být ovlivněny případné plicní vaskulární mechanismy řízené HIF, ale účinek na hematokrit se ještě neprojevil (Rox2d, n=9). kontrolní skupina byla léčena stejně jako Rox2w s tím rozdílem, že jí bylo aplikováno rozpouštědlo bez roxadustatu (n=8). Pro ověření možného vlivu samotného rozpouštědla byla zařazena skupina, která nebyla nijak léčena (skupina bez léčby, 0Tx, n=5). Pro porovnání výsledků se situací přirozeně zvýšené hladiny HIF byla poslední skupina vystavena chronické hypoxii (10 % O₂) po dobu dvou týdnů, během kterých jí bylo opakovaně injikováno rozpouštědlo stejně jako skupině 0Tx (skupina CH, n=6).

Nejprve byl anestezovaný potkan umístěn do polohy na zádech a připevněn ke stolu. Poté se zavedla kanyla do průdušnice a po mediální torakolaparotomii byla připojena k ventilátoru. Následně byla jedna ligatura umístěna pod aortu a plicnici a druhá kolem srdečního hrotu. Do pravé komory byl aplikován fyziologický roztok s heparinem k prevenci trombózy. Následně byla provedena incize v plicnici, kam byla umístěna vtoková kanyla a v srdečním hrotu, kam byla umístěna výtoková kanyla. Obě kanyly byly upevněny již zmíněnými ligaturami. Celý blok srdce-plíce byl následně vyjmut z hrudníku, tracheální kanyla byla připojena k ventilátoru. Následně jsou kanyly napojeny do okruhu s pumpou a do systému je vpraven perfuzát (Krebsův roztok se 4% albuminem) (Belohlávková et al., 2001; Hampl et al., 2000; Herget and Chovanec, 2010).

Plicní vazoresistivní vlastnosti byly hodnoceny analýzou vztahu perfuzního tlaku a průtoku (P/Q) v izolovaných plicích perfundovaných ex vivo bezbuněčným Krebsovým roztokem se 4 % albuminu (aby se vyloučil zavádějící vliv změn hematokritu) a ventilovaných vzduchem + 5 % CO₂ při 60 deších/min. s koncovým výdechovým tlakem +2 cmH₂O; bazální průtok (mimo měření P/Q) byl 40ml/min./kg tělesné váhy (Belohlávková et al., 2001; Herget and Chovanec, 2010). Před izolací plic byli potkani anestezováni thiopentalem (30 mg/kg BWi.p.)

a punkcí srdce jim byl odebrán vzorek krve k měření hematokritu. Vztah P/Q byl stanoven měřením tlaku při perfuzi, která byla nejprve na ~ 30 s zastavena a poté navýšena na 36 ml/min/kg tělesné hmotnosti ve 3 rovnoměrných krocích (vždy ~ 30 s). Protože vztah P/Q v tomto rozsahu byl zjevně blízký lineárnímu, byl vyhodnocen pomocí lineární regrese ($R^2 > 0,8925$).

3.4 Nový experimentální model levostranného srdečního selhání u potkanů

Částečná intravaskulární obstrukce aorty

U anestetizovaných spontánně dýchajících potkanů byla zpřístupněna pravá karotida a malým řezem v její stěně byla do vzestupné aorty zavedena polyethylenová hadička (vnější průměr - O.D. 0,96 mm, délka 25 mm) uzavřená na distálním konci a posunuta tak, aby její konec byl těsně nad aortální chlopní. Proximální konec hadičky byl poté připevněn ke karotidě pomocí stehu. Vzdálenost mezi řezem v krční tepně a aortální chlopní byla u potkanů o hmotnosti 180-230 g cca 25 mm. Délka každého chirurgického zákroku u pokusu zřídka přesáhla ~15 min.

Experimentální skupiny a protokoly

Použity byly následující 4 experimentální skupiny:

- Kontrolní skupina bez intervence (skupina C);
- Potkani s částečnou obstrukcí aorty, studováni 3 týdny po zákroku (skupina PAO);
- Potkani s částečnou obstrukcí aorty vystaveni chronické hypoxii (10% O₂) po dobu 3 týdnů počínaje druhým dnem po částečné obstrukci aorty (skupina PAO-H);
- Hypoxické kontroly vystaveny chronické hypoxii po dobu 3 týdnů, bez obstrukce aorty (skupina H);

Bylo provedeno pět samostatných studií (A-E):

Studie A - potvrzující selhání levé komory.

V pilotní studii A jsme potvrdili, že naše metoda skutečně vede k selhání levé komory. Měřili jsme LVEDP u anestetizovaných, mechanicky ventilovaných (přes tracheostomii) potkanů s hrudníkem otevřeným střední sternotomií, a to pomocí vpichu do dutiny levé komory přes její stěnu jehlou připojenou ke snímači tlaku. Ze záznamů tlaku byla rovněž stanovena srdeční frekvence. Ve studii A byly použity pouze skupiny PAO a C.

Studie B – detekce přítomnosti PH

PAP jsme měřili u anestetizovaných, spontánně dýchajících potkanů, jak bylo popsáno výše (Hampl et al., 2006; Herget et al., 2003; Herget and Palecek, 1972). Po získání stabilního záznamu PAP po dobu několika minut byl hrudník otevřen sternotomií a byla ověřena poloha jak katétru v plicní tepně, tak poloha obstruující hadičky v aortě. Srdce bylo vyříznuto a byly změřeny hmotnosti srdečních komor k posouzení změn v reakci na tlakové přetížení. Reverzibilita změn váhy srdečních komor byla ověřena u přídatné skupiny potkanů měřených 3 týdny poté, co jim byla odstraněna obstruující hadička, kterou měli předtím zavedenou po dobu 3 týdnů.

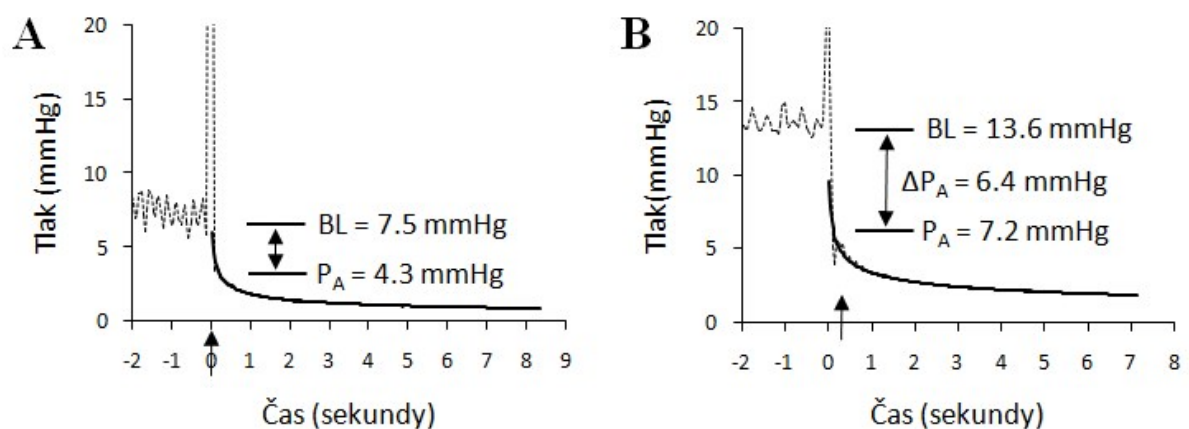
Studie C - podíl plicních tepen na PH

Ve studii C bylo naším cílem rozlišit, zda je PH způsobena pouze pasivním přenosem zvýšeného tlaku z levého srdce, nebo zda se na zvýšeném PAP podílí zvýšená plicní arteriální rezistence. Měření bylo provedeno na izolovaných plicích perfundovaných ex vivo Krebsovým roztokem se 4% albuminem (viz výše) pomocí techniky okluze přítoku pro stanovení arteriální složky PVR (Hampl et al., 2000; Herget and Kuklík, 1995). Při rychlém uzavření přítoku do plicní tepny nejprve velmi rychle poklesne tlak měřený ve velmi krátkém úseku perfuzního okruhu mezi místem okluze a vstupem do plicní tepny. Po tomto téměř

lineárním poklesu následuje mnohem pomalejší fáze odeznívání (Obr. č. 3). Bylo prokázáno, že rozdíl mezi základním perfuzním tlakem a inflexním bodem oddělujícím rychlou a pozvolnou fázi poklesu tlaku po okluzi přívodu (ΔP_A) odráží arteriální složku celkové PVR (Dawson et al., 1988; Hakim et al., 1982; Linehan and Dawson, 1983).

Do perfuzátu byl přidán meklofenamát (17 μM) a L-NAME (50 μM), aby se eliminovala aktivita prostaglandinů, respektive oxidu dusnatého (Belohlávková et al., 2001; Hampl and Herget, 2000; Herget and Chovanec, 2010). Izolované plíce byly ventilovány rychlostí 50 dechů/min s maximálním dechovým tlakem +10 cm H₂O a koncovým výdechovým tlakem +2,0 cm H₂O. Zvlhčený ventilační plyn se skládal z 21 % O₂ + 5 % CO₂ + 74 % N₂. Perfuzní průtok byl 40 ml/min/kg tělesné hmotnosti a výtokový tlak -2cm H₂O.

Po desetiminutové stabilizaci přípravku při normoxické ventilaci byl do přívodní linie injikován angiotenzin II (0,2 μg) a po cca 8 minutách (když se perfuzní tlak stabilizoval) byla navozena ventilační hypoxie (0 % O₂ + 5 % CO₂ + 75 % N₂ po dobu ~ 10 min). Tento postup byl opakován po ~10 min. klidové periody (normoxická ventilace). Poté byla ventilace (21 % O₂) zastavena na konci výdechu (alveolární tlak +2,0 cm H₂O) a přívodní linka byla instantně uzavřena elektromagneticky řízenou svorkou. Perfuzní pumpa byla vypnuta v okamžiku okluze přívodu.



Obr. č. 3 Manévr okluze přítoku v izolovaných plicích

Příklady záznamů tlaku během náhlých arteriálních okluzí v izolovaných plicích. Tečkované čáry znázorňují skutečné záznamy tlaku, plné čáry znázorňují exponenciální regrese pomalejší části poklesu tlaku po arteriální okluzi. BL = průměrný výchozí perfuzní tlak před arteriální okluzí (průtok = 0,04 ml/min/g tělesné hmotnosti), P_A = průsečík mezi rychlým poklesem tlaku po arteriální okluzi a výkonovou regresí pomalého poklesu tlaku, ΔP_A = rozdíl BL - P_A . A: Příklad kontrolní plíce. B: Příklad plíce izolované 3 týdny po částečné aortální obstrukci (skupina PAO).

Studie D - úloha vazokonstrikce

Studie D využívala izolované perfundované plíce, jak bylo popsáno výše. Po stabilizaci a primingu dvěma cykly injekce angiotenzinu II a hypoxické ventilace (jako ve studii C) byl stanoven vztah mezi rychlostí perfuzního průtoku (zvyšovaného postupně od 12 do 52 ml/min/kg tělesné hmotnosti, tj. od 30 do 130 % základního průtoku) a tlakem (měřeným).

Po dalších 5 minutách stabilizace při bazálním průtoku (40 ml/min./kg tělesné hmotnosti) byl do rezervoáru přidán nitroprusid sodný (koncentrace 20 μ M v perfuzátu), aby se odstranil případný tonus hladké svaloviny cév a po 5 minutách byl znovu změřen vztah P/Q.

Protože vztah P/Q byl při vizuální kontrole ve studovaném rozsahu průtoků prakticky lineární, byla k analýze těchto údajů použita lineární regrese (Hampel et al., 2000; Herget et al., 1995). Sklon přímky tlaku a průtoku odráží inkrementální odpor plicního řečiště (Dawson et al., 1989).

Studie E - strukturální změny malých prealveolárních cév

Plíce byly vyjmuty potkanům v hluboké anestezii a naplněny neutrálním roztokem formolu pod tlakem 12 cm H₂O přes tracheu. Poté byly na několik dní umístěny do stejného roztoku. Z plic byly následně připraveny tenké histologické řezy a obarveny hematoxylinem a Weigertovou resorcin-fuchsinovou metodou k průkazu elastických vláken. Vzhledem k tomu, že svalová vrstva je uzavřena mezi dvěma elastickými laminami, zatímco nemuskulární cévy

mají v medii pouze jednu laminu, byla vaskulární muskularizace hodnocena spočítáním všech distálních cév vázaných na alveolární kanálky nebo na alveoly (o.d. $\leq 300 \mu\text{m}$) na jednom sklíčku od každého potkana a stanovením procenta z nich, které mají dvě elastické lamely (% dvojitě laminovaných cév, %DL) (Al-Hiti et al., 2013; Herget et al., 2003). Ve studii E byly použity pouze skupiny PAO a C.

3.5 Statistická analýza

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru Prism 9 nebo 9.5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). V každém z experimentů byly skupiny porovnány pomocí jednosměrného ANOVA a Fischerova LSD testu. V pokusu č. 2 v podstudijích A a E, kde byly použity pouze 2 skupiny, byl použit nepárový t-test. V pokus č.3 byly křivky P/Q před a po podání DIZE hodnoceny v každé skupině zvlášť pomocí dvoucestného ANOVA testu s opakovanými měřeními. Vazokonstrikční odpovědi před a po podání DIZE byly porovnány zvlášť pro každou skupinu pomocí párového t-testu. Ve všech případech byla hladina významnosti předem stanovena na $P < 0,05$. Výsledky jsou prezentovány jako průměry \pm SD.

4. VÝSLEDKY

4.1 DHEA a statin

Ve srovnání s normoxickými kontrolami došlo u všech skupin vystavených hypoxii k poklesu tělesné hmotnosti, tyto skupiny se pak mezi sebou v hmotnosti nelišily (Tab.č. 2) Hmotnost pravé komory a poměr její hmotnosti k hmotnosti levé komory s interventrikulárním septem byly signifikantně vyšší u všech hypoxických skupin oproti normoxickým kontrolám, nicméně hypoxické se mezi sebou nelišily (Tab.č.2).

Skupina (n)	BW (g)	RV (mg)	LV+S (mg)	RV/BW (%)	LV+S/BW(%)	RV/LV+S
NC (16)	446 ± 75	210 ± 21	838 ± 79	0.048 ± 0.007	0.19 ± 0.02	0.251 ± 0.015
HC (9)	327 ± 15*	269 ± 41**	695 ± 51*	0.082 ± 0.011*	0.21 ± 0.01	0.386 ± 0.042*
HD (10)	304 ± 43*	263 ± 56***	638 ± 49*	0.086 ± 0.010*	0.21 ± 0.02	0.409 ± 0.061*
HS (9)	281 ± 23*	239 ± 48	606 ± 50*†	0.085 ± 0.014*	0.22 ± 0.01	0.395 ± 0.073*
HDS (9)	288 ± 33*	241 ± 61	606 ± 63*†	0.083 ± 0.015*	0.21 ± 0.01	0.393 ± 0.071*

Tab.č. 2 Hmotnost těla a srdečních komor

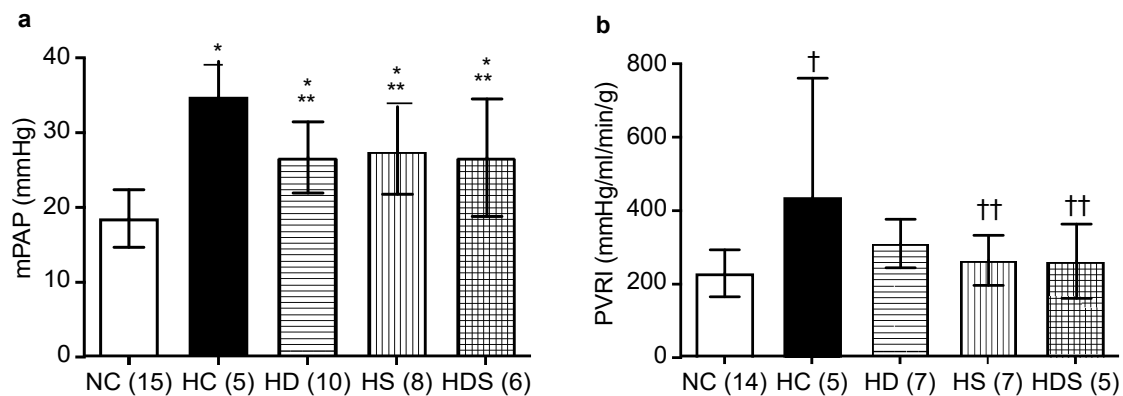
NC, normoxická kontrolní skupina; HC, hypoxická kontrolní skupina (3 týdny v 10 % O₂); HD, skupina léčená DHEA S po celou dobu 3týdenní expozice hypoxii; HS, skupina léčená simvastatinem po celou dobu 3týdenní expozice hypoxii; HDS, skupina léčená kombinací simvastatin + DHEA S po celou dobu 3týdenní expozice hypoxii; BW, tělesná hmotnost; RV, hmotnost pravé komory; LV+S, součet hmotností levé komory a septa. *P<0,0001 vs. NC; **P<0,005 vs. NC; ***P<0,01 vs. NC

Hematokrit se zvýšil ve všech hypoxických skupinách , což naznačuje, že účinky terapie na plicní vaskulární rezistenci a mPAP nebyly způsobeny změnami viskozity krve. Srdeční výdej ani srdeční index se mezi skupinami nelišily (Tab.č. 3).

Skupina	Srdeční výdej (ml/min)	Srdeční index (ml/min/kg BW)	Hematokrit (%)
NC	36.9 ± 9.7 (n=14)	84 ± 24 (n=14)	51.4 ± 3.4 (n=16)
HC	36.8 ± 21.0 (n=6)	113 ± 65 (n=6)	63.7 ± 3.2* (n=9)
HD	27.3 ± 6.5 (n=7)	91 ± 17 (n=7)	59.6 ± 6.0 (n=8)
HS	29.0 ± 6.7 (n=8)	103 ± 17 (n=8)	62.3 ± 3.8* (n=9)
HDS	27.0 ± 8.0 (n=7)	92 ± 22 (n=7)	62.4 ± 4.3* (n=9)

Tab.č. 3 Srdeční výdej, srdeční index a hematokrit, označení skupin viz. metodika, v závorkách jsou počty potkanů. *P<0,0001 vs. NC

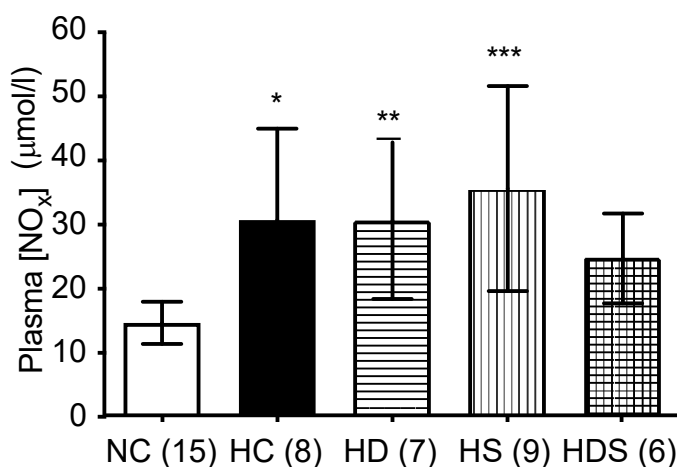
Podle předpokladů se nárůst mPAP způsobený chronickou hypoxií redukoval (přibližně na polovinu) při léčbě samotným DHEA S. Podobně i léčba samotným simvastatinem významně snížila mPAP ve srovnání s hypoxickými kontrolami; účinek snižující mPAP při léčbě statinem byl přibližně stejný jako při léčbě DHEA S (Obr. č. 4a). V rozporu s naší hypotézou nevedla současná léčba oběma léčivy (DHEA S + statin) k žádnému dalšímu snížení mPAP (Obr. č. 4b). PVRI, který byl u hypoxických kontrol významně zvýšen, se žádné z léčených skupin (HD, HS a HDS) významně nelišil od normoxických kontrol a v obou skupinách léčených simvastatinem (HS a HDS) byl významně nižší než u hypoxických kontrol (obrázek 1b).



Obr. č. 4 Střední plicní arteriální tlak (mPAP, a) a index plicní cévní rezistence (PVRI, b), zvýšené chronickou hypoxií, jsou sníženy léčbou DHEA S, simvastatinem a jejich kombinací. Popis skupin viz. metodika. V závorkách jsou počty potkanů.

* $p < 0,002$ vs. NC; † $p = 0,005$ vs. NC; ** $p < 0,013$ vs. HC; †† $p < 0,045$ vs. HC

Plazmatická koncentrace NO_x byla významně zvýšena chronickou hypoxií. Hodnoty byly podobné u hypoxických kontrol a u potkanů léčených v hypoxii samotným DHEA S nebo samotným simvastatinem. U potkanů léčených kombinací DHEA S + simvastatin se hodnoty NO_x významně nelišily ($p = 0,064$) od hodnot u normoxických kontrol, ale také se významně nelišily ($p = 0,313$) od hypoxických kontrol (Obr. č. 5).

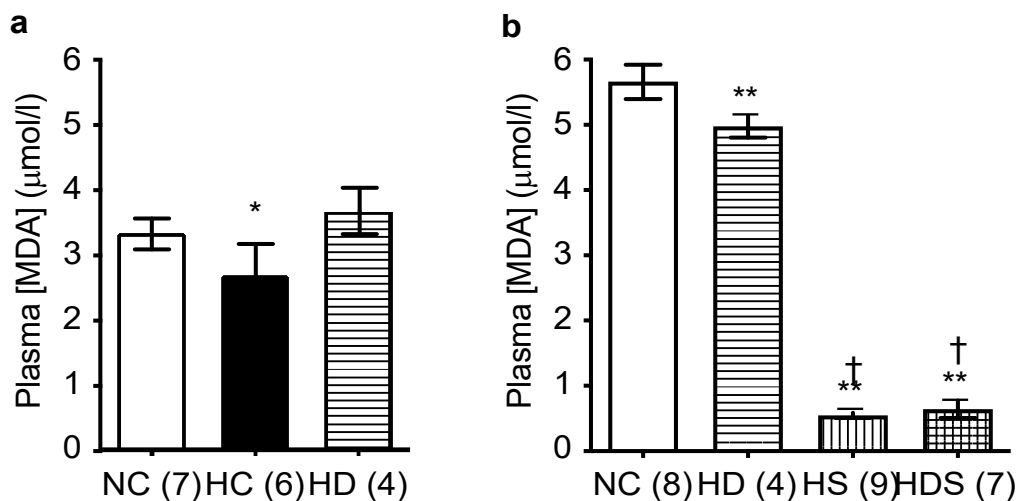


Obr. č. 5 Plazmatická koncentrace oxidu dusnatého a jeho oxidačních produktů (NO_x), zvýšená chronickou hypoxií, není ovlivněna léčbou DHEA S ani simvastatinem. Při kombinaci simvastatinu a

DHEA S se plazmatický NOx již neliší od normoxických kontrol. Popis skupin viz. metodika. V závorkách jsou počty potkanů. *p=0,0017 vs. NC; **p=0,0027 vs. NC; ***p<0,0001 vs. NC

Plazmatická koncentrace malondialdehydu, markeru oxidačního stresu, byla v naší studii jednou z mála proměnných ovlivněných rozpouštědlem, které potkani pili (voda vs. 0,5% ethanol). Hladiny malondialdehydu byly významně vyšší u zvířat pijících tento slabý roztok ethanolu ve srovnání se stejně léčenými konzumujícími vodu. Bylo tomu tak u normoxických kontrol a v menší míře u potkanů léčených DHEA S v hypoxii. Stejný trend existoval i u hypoxických kontrol, kde jsme ovšem měření provedli pouze u dvou potkanů, kteří pili etanol. V tomto případě tedy nejsou údaje průkazné.

Z tohoto důvodu jsme provedli oddělená statistická srovnání malondialdehydu u potkanů pijících ethanolový roztok (s vyloučením příliš malé skupiny, která pila etanol za podmínek hypoxie) a vodu. U potkanů pijících vodu se malondialdehyd v plazmě mírně snížil chronickou hypoxií a obnovila se léčbou DHEA S (Obr. č. 6a). U potkanů konzumujících vodu s 0,5 % etanolu byl plazmatický malondialdehyd významně snížen léčbou DHEA S a ještě výraznější byl efekt v obou skupinách léčených simvastatinem (samostatně nebo v kombinaci s DHEA S) ve srovnání s normoxickými kontrolami. Obě skupiny se simvastatinem (HS a HDS) se mezi sebou nelišily (Obr. č. 6b).

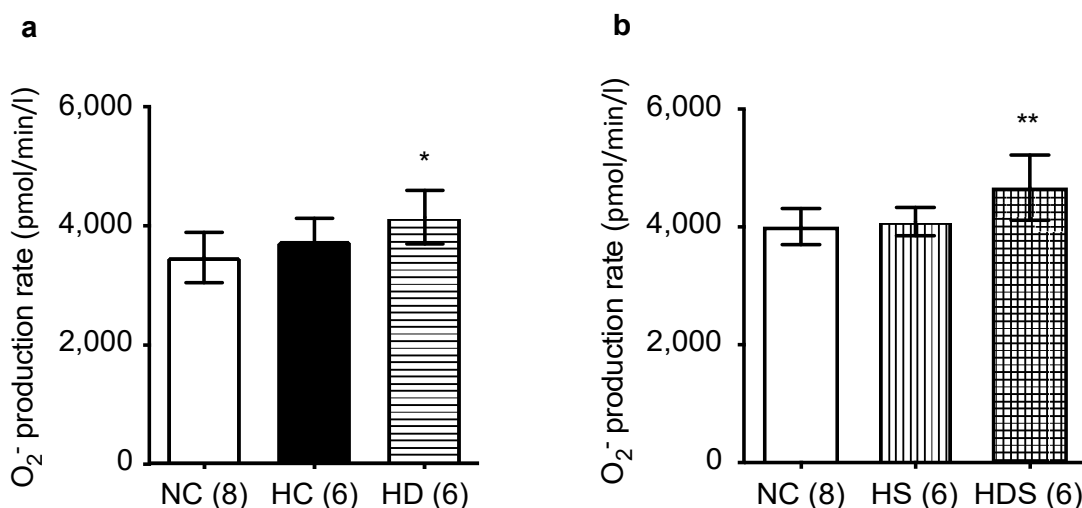


Obr. č. 6 Simvastatin výrazně snižuje koncentraci malondialdehydu (MDA) v plazmě.

a: Potkani nekonzumující žádný alkohol. b: potkani pijící slabý roztok ethanolu (0,5 %). Popis skupin viz. metodika. V závorkách jsou počty potkanů. * $p < 0,01$ vs. NC a HD; ** $p < 0,0001$ vs. NC; † $p < 0,0001$ vs. HD

Zdá se, že rychlost produkce superoxidu byla také ovlivněna rozpouštědlem, které potkani konzumovali, alespoň u normoxických kontrol, kde jsme měli k dispozici dostatečný počet pro přímé srovnání (3471 ± 423 pmol/min/l krve u potkanů pijících vodu a 4006 ± 304 pmol/min/l u potkanů pijících etanolový roztok, $p=0,0113$). Z tohoto důvodu jsme vypočítali rozdíly mezi skupinami zvláště pro zvířata pijící každé rozpouštědlo.

U potkanů pijících vodu jsme zjistili zvýšenou míru produkce superoxidu ve skupině léčené DHEA S ve srovnání s normoxickou kontrolní skupinou (Obr. č. 7a). U potkanů pijících slabý roztok ethanolu byla míra produkce superoxidu vyšší ve skupině HDS ve srovnání s normoxickými kontrolami i potkany léčenými v hypoxii samotným simvastatinem (Obr. č. 7b). Celkově tyto údaje zřejmě naznačují, že ani chronická hypoxie, ani léčba simvastatinem nemění míru produkce superoxidu. Léčba DHEA S, ať už samostatně nebo v kombinaci se statinem, naopak tuto veličinu zvyšuje.



Obr. č. 7: DHEA S, ale nikoli simvastatin nebo chronická hypoxie, zvyšují míru produkce superoxidu (O_2^-). a: Potkani bez alkoholu; b: Potkani konzumující slabý roztok ethanolu (0,5 %); Popis skupin viz metodika. V závorkách jsou počty potkanů. * $p=0,008$ vs. NC; ** $p<0,02$ vs. NC a HS

4.2 Aktivátor HIF zvyšuje plicní cévní rezistenci

Chronická, ale nikoli akutní léčba roxadustatem zvýšila hematokrit ve srovnání s kontrolní i neléčenou skupinou, ale ne tak výrazně jako chronická hypoxie (Tab.č. 3).

Skupina	Hematokrit (%)	Angiotensin II (Δ perfuzního tlaku, mmHg)	Akutní 0% O_2 (Δ perfuzního tlaku, mmHg)
OTx	39.6 \pm 2.3	9.8 \pm 5.1	23.8 \pm 9.8
Kontroly	39.7 \pm 2.5	10.8 \pm 5.6	23.3 \pm 12.5
Rox2d	41.8 \pm 2.3	7.4 \pm 2.3	17.1 \pm 7.4
Rox2w	46.6 \pm 1.8**++++†	12.8 \pm 6.0 [†]	26.5 \pm 11.4
CH	49.8 \pm 1.7**++++§	20.9 \pm 5.7**++++§§	28.6 \pm 8.6

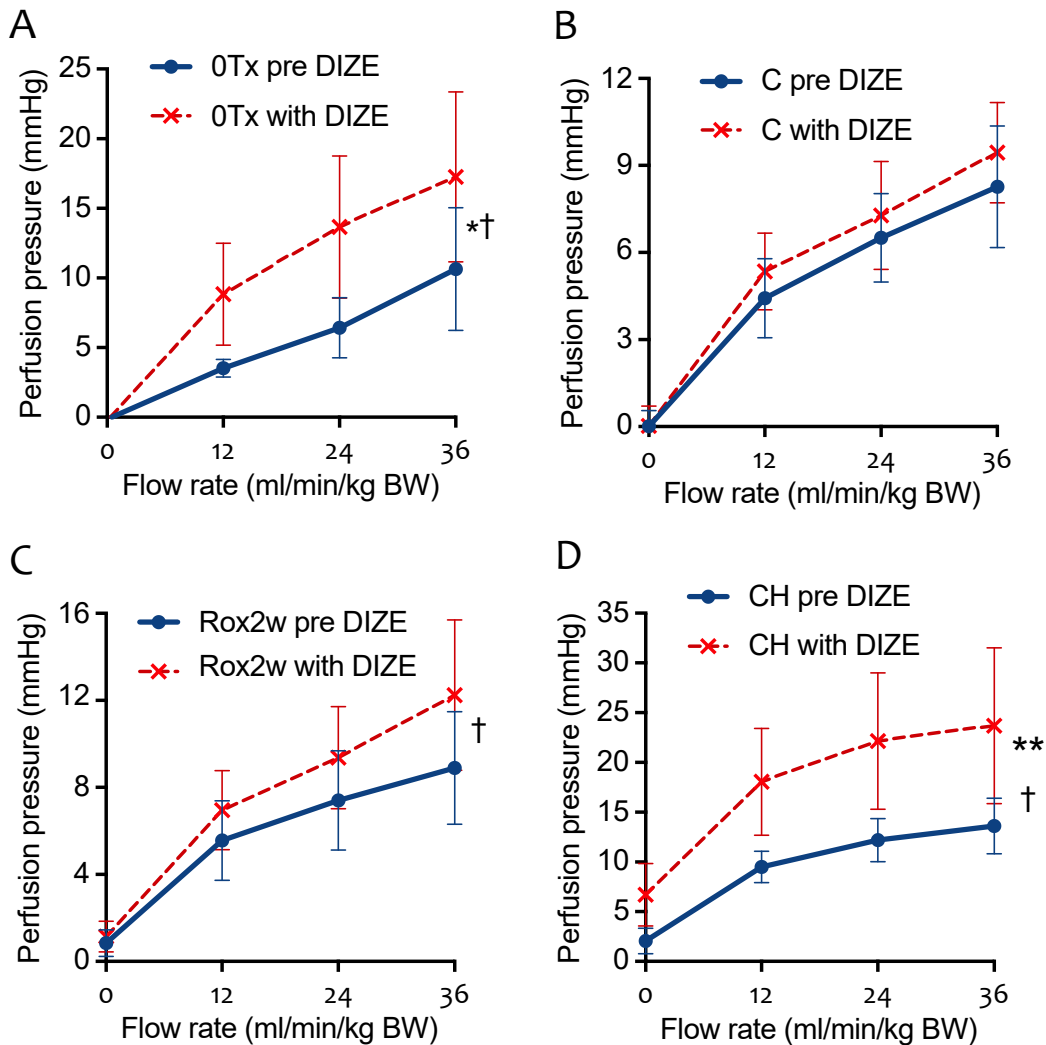
Tab.č. 3 Hematokrit a vazokonstriční reaktivita. Popis skupin viz metodika * $P<0.01$ vs. Control; ** $P\leq 0.0008$ vs. Control; [†] $P<0.01$ vs. OTx; ^{††} $P<0.001$ vs. OTx; ^{†††} $P<0.0001$ vs. OTx; [‡] $P=0.0284$ vs. Rox2d; ^{††††} $P\leq 0.0004$ vs. Rox2d; [§] $P<0.05$ vs. Rox2w; ^{§§} $P=0.0049$ vs. Rox2w

Výchozí perfuzní tlak v izolovaných plicích byl vyšší ve skupině Rox2d ($9,8 \pm 1,6$ mmHg) než v kontrolní skupině ($7,9 \pm 1,8$, $P=0,0364$). Ve skupině CH byl ještě vyšší ($13,0 \pm 2,0$), a to jak ve srovnání s kontrolami a neléčenými ($P < 0,0001$), tak s oběma skupinami s roxadustatem ($P \leq 0,0011$). Ve skupině Rox2w činila $9,2 \pm 1,9$ mmHg.

Sklon regresních křivek P/Q se mezi skupinami nelišil (tj. křivky byly rovnoběžné), zatímco jejich průsečík s tlakovou osou byl roxadustatem zvýšen již po 2 dnech ($4,2 \pm 1,5$ mmHg) a po 2 týdnech se dále neměnil ($3,9 \pm 1,5$), a to ve srovnání jak s kontrolní ($2,6 \pm 1,4$, $P \leq 0,0427$), tak neléčenou ($1,5 \pm 0,8$, $P \leq 0,003$) skupinou (které se navzájem nelišily). Průsečík tlakovou osou byl ještě vyšší ve skupině CH ($7,6 \pm 1,1$, $P < 0,0001$ oproti všem ostatním skupinám). Tento parametr odpovídá kritickému uzavíracímu tlaku plicního cévního řečiště.

V souladu s tím se hodnota, na které se ustálil perfuzní tlak při zastavení perfuze, nelišila mezi kontrolní ($0,1 \pm 0,6$ mmHg) a neléčenou ($-0,2 \pm 0,5$, $P=0,6737$) skupinou, ale byla podobně zvýšena ($P < 0,05$) ve skupinách R2d ($0,8 \pm 0,4$) a R2w ($0,8 \pm 0,6$) a ještě více ve skupině CH ($2,1 \pm 1,3$, $P \leq 0,0028$). Tlak při zastavení průtoku odráží kritický uzavírací tlak (pokud by byl kritický uzavírací tlak nulový, pak by se tlak na straně přítoku měl vyrovnat s tlakem na straně odtoku -2 cm H₂O).

DIZE nezměnila linie P/Q u kontrolních skupin a skupiny R2d, ale posunula je k vyšším tlakům u skupin 0Tx, R2w a CH (Obr. č. 8). Vazokonstrikční odpovědi na akutní hypoxii se nezměnily, zatímco odpovědi na angiotenzin II se po DIZE zvýšily u kontrolních skupin (na $18,2 \pm 6,8$ mmHg, $P=0,0148$ vs. před DIZE), skupin Rox2d ($11,5 \pm 6,2$, $P=0,0387$) a Rox2w ($17,8 \pm 6,1$, $P=0,0004$), ale ne u skupiny CH ($19,6 \pm 6,2$, $P=0,3171$).

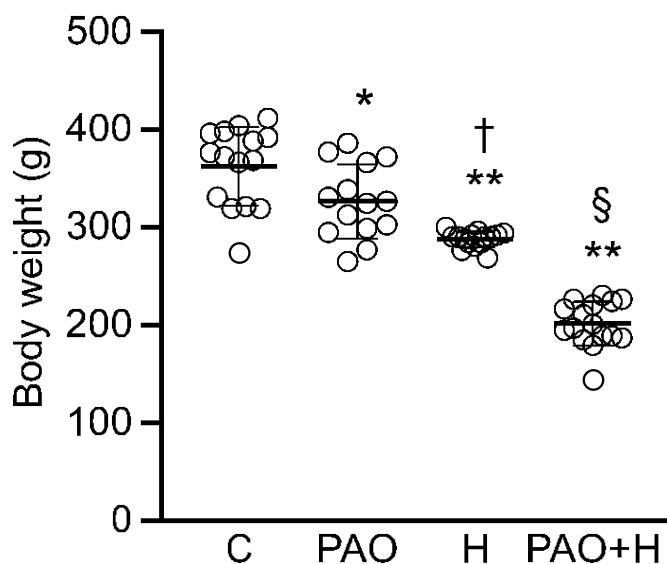


Obr. č. 8 Křivky perfuzního tlaku a průtoku jsou posunuty k vyšším tlakům diminazem aceturátem (DIZE) u neléčené skupiny (0Tx; A), skupiny léčené roxadustatem po dobu 2 týdnů (Rox2w; panel C) a chronicky hypoxické skupiny (CH; D), ale ne u kontrolní skupiny (C, panel B) a skupiny léčené jedinou dávkou roxadustatu (Rox2d, není zobrazeno).

Průtok byl statisticky významným zdrojem variability ve všech skupinách ($P < 0,0001$, dvoucestná ANOVA pro opakovaná měření). * $P = 0,0453$ vliv skupiny; ** $P = 0,0064$ vliv skupiny; † $P \leq 0,0055$ vliv interakce skupina x průtok

4.3 Nový experimentální model levostranného srdečního selhání u potkanů

Náš postup částečné intravaskulární okluze vzestupné aorty přes krční tepnu u potkanů je snadný. Provedení trvá ~10 minut a mortalita je ~10 % u mladých dospělých potkanů (hmotnost <250 g). U starších potkanů (BW>250 g) byla mortalita nepříjemně vysoká (~90 %). Kritickým bodem zákroku byla implantace špičky hadičky těsně nad aortální chlopni, protože implantace přes chlopeň rychle vede k akutnímu srdečnímu selhání a smrti. Zjistili jsme, že u potkanů kmene Wistar o telesné hmotnosti 180-240 g jsou optimální hadičky o průměru 0,96 mm. Tři týdny částečné obstrukce aorty vedly ke ztrátě ~ 10 % tělesné hmotnosti (Obr. č. 9). Jak se očekávalo, chronické vystavení hypoxii rovněž snížilo tělesnou hmotnost (o ~ 20 %, významně více než v případě skupiny s PAO). Tento účinek chronické hypoxie byl dále zvýrazněn současnou částečnou obstrukcí aorty (Obr. č. 9).

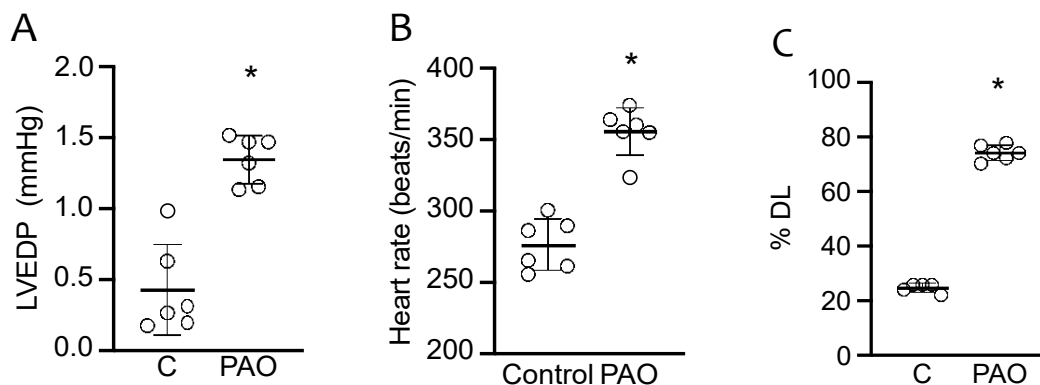


Obr. č. 9 Tělesnou hmotnost (BW) snižuje částečná obstrukce aorty, chronická hypoxie a jejich kombinace. C = kontrolní skupina, PAO = skupina 3 týdny po částečné okluzi aorty, H = potkani po 3týdenní expozici hypoxii, PAO+H = potkani vystavení 3týdenní hypoxii s částečnou okluzí aorty. Kolečka představují jednotlivé hodnoty, vodorovné čáry jsou průměry a SD. *P = 0,0022 oproti

skupině C; **P < 0,0001 oproti skupině C; †P = 0,0011 vs. skupina PAO; §P < 0,0001 vs. skupiny PAO a H

Studie A - potvrzení selhání levé komory

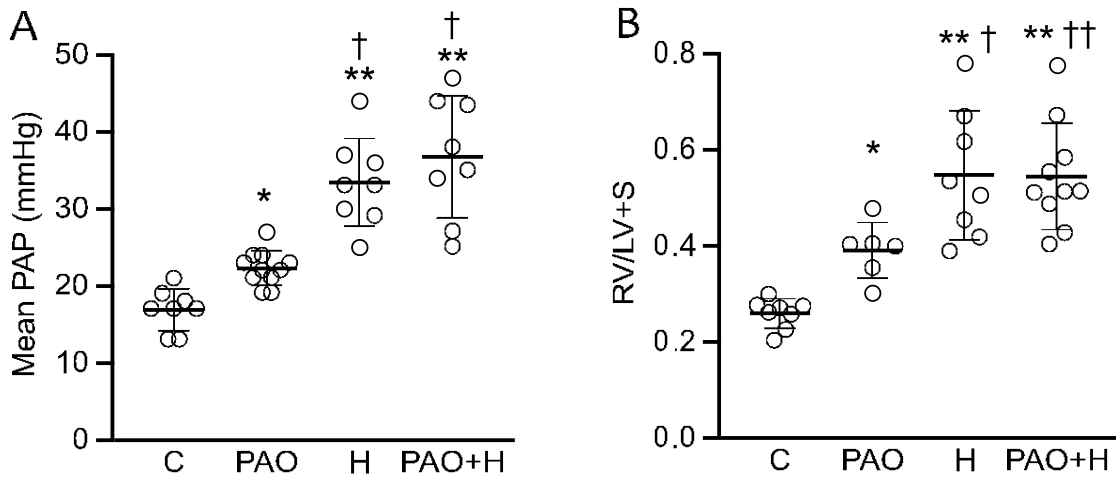
Indukce tlakového přetížení levého srdce naším postupem částečné aortální obstrukce byla potvrzena zvýšeným LVEDP ve skupině s PAO ve srovnání s kontrolami (Obr. č. 10A). Srdeční frekvence byla vyšší ve skupině PAO než u kontrol (Obr.č. 10B).



Obr. č. 10 LVEDP (A), srdeční frekvence (B) a muskularizace periferních plicních cév (C) jsou u potkanů s částečnou obstrukcí aorty zvýšené.

Studie B - zjišťování přítomnosti plicní hypertenze

Střední tlak v plicnici byl po 3 týdnech částečné obstrukce aorty významně vyšší než u kontrolních potkanů (Obr.č. 11A). V souladu s tím se zvýšila hmotnost pravé komory, a to jak ve vztahu k tělesné hmotnosti, tak k hmotnosti levé komory plus septa (Obr. č. 11B a 12A).

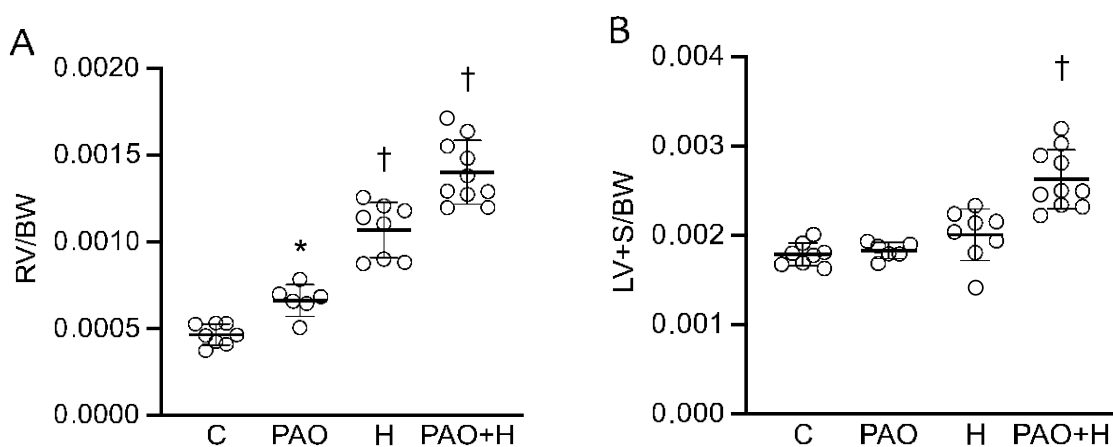


Obr. č. 11 Střední plicní arteriální tlak in vivo (A) a hmotnostní index pravé a levé srdeční komory (B) jsou zvýšeny částečnou aortální obstrukcí, chronickou hypoxií a jejich kombinací.

PAP = plicní arteriální tlak, RV/LV+S = hmotnost pravé komory vzhledem k levé komoře a septu. Označení skupin na vodorovné ose viz legenda k obrázku 2. Kolečka představují jednotlivé hodnoty, vodorovné čáry jsou průměry a SD. *P = 0,0282 (v A) nebo 0,0186 (v B) oproti skupině C; **P < 0,0001 oproti skupině C; †P < 0,0001 (v A) nebo P = 0,0058 (v B) oproti skupině PAO; ††P = 0,0045 vs. skupina PAO; Skupina PAO+H vs H: P = 0,1989 (v A) nebo 0,9692 (v B).

Expozice chronické hypoxií zvýšila mPAP (a hmotnost pravé komory) více než částečná aortální obstrukce (Obr. č. 11 a 12A). Kombinace hypoxické expozice s částečnou aortální obstrukcí (skupina PAO+H) nezpůsobila další statisticky významné zvýšení mPAP nad hodnotu ve skupině H. Poměr hmotnosti pravé komory k tělesné hmotnosti byl vyšší ve skupině PAO+H než ve skupině H (Obr. č. 12A), ale protože hypoxická expozice zřejmě zhoršila selhání levé komory, jak lze soudit podle vyššího poměru hmotnosti levé komory a septa k tělesné hmotnosti ve skupině PAO+H než ve skupině PAO (Obr. č. 12B), poměr hmotnosti pravé komory k levé komoře a septu se mezi skupinami PAO+H a H nelišil (Obr. č. 11B). Chronická hypoxie sama o sobě nezpůsobila statisticky významné zvýšení poměru hmotnosti levé komory a septa k hmotnosti těla.

Hypertrofie srdce vyvolaná částečnou okluzí aorty byla zcela reverzibilní. Na konci třítydenního období zotavení po odstranění obturační kanyly ze vzestupné aorty, kde byla po dobu 3 týdnů, byl poměr hmotnost levé komory a septa k tělesné hmotnosti $1,64 \pm 0,13 \times 10^{-3}$ ve srovnání s $1,71 \pm 0,01 \times 10^{-3}$ u kontrol ($P = 0,3256$; $n = 8$ a 6). Poměr hmotnosti pravé komory k tělesné hmotnosti se rovněž normalizoval ($0,47 \pm 0,08 \times 10^{-3}$ vs $0,48 \pm 0,06 \times 10^{-3}$; $P = 0,6568$), stejně jako poměr pravé komory k levé komoře a septu ($0,29 \pm 0,06$ vs. $0,28 \pm 0,03$; $P = 0,9026$). Tato "reverzní procedura" měla nulovou mortalitu.



Obr. č. 12 Relativní hmotnost pravé (A) a levé (B) komory.

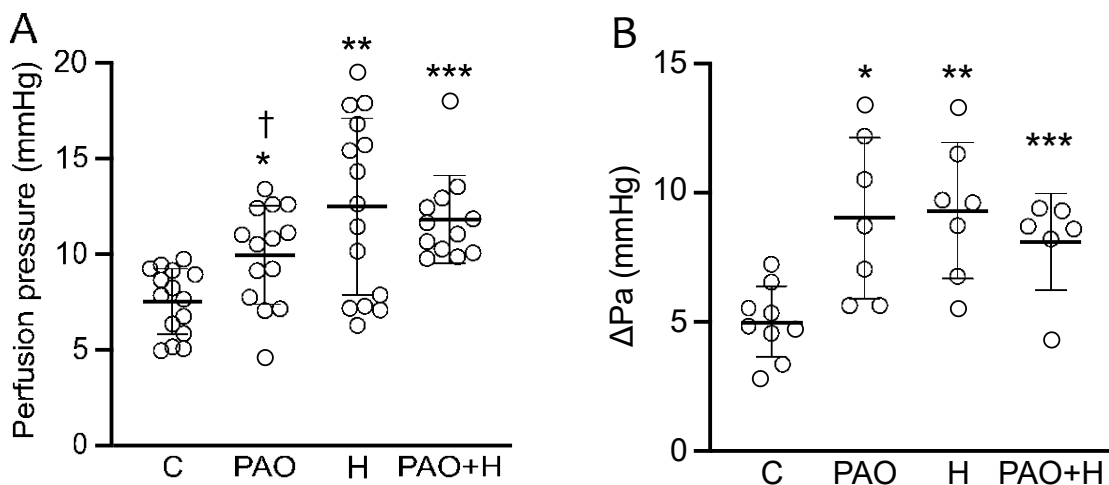
RV/BW = poměr hmotnosti pravé komory k tělesné hmotnosti, LV+S/BW = poměr hmotnosti levé komory a septa k tělesné hmotnosti. Označení skupin na vodorovné ose viz legenda k obrázku 2. Kolečka představují jednotlivé hodnoty, vodorovné čáry jsou průměry a SD. * $P = 0,0158$ oproti skupině C; † $P < 0,0001$ oproti všem ostatním skupinám. Všechny ostatní rozdíly v panelu A: $P \geq 0,0928$

Studie C - podíl plicních tepen na plicní hypertenzi

Výchozí hodnoty perfuzního tlaku v izolovaných plicích byly pro statistické zpracování sloučeny ze studií C a D, protože byly získány za stejných podmínek. Výchozí perfuzní tlak byl po 3 týdnech částečné obstrukce aorty významně vyšší než u kontrolních potkanů (Obr. č. 13). Chronická hypoxická expozice rovněž zvýšila výchozí perfuzní tlak, a to více než u

skupiny s PAO. Kombinace částečné aortální obstrukce s chronickou hypoxií dále nezvýšila výchozí perfuzní tlak v izolovaných plicích oproti hodnotám zjištěným ve skupinách PAO a H (Obr. č. 13A).

Rychlá část poklesu perfuzního tlaku po arteriální okluzi (ΔPa , odrážející prekapilární rezistenci) byla po částečné obstrukci aorty významně větší než u kontrolních plic (Obr. č. 3 a 13B). Podle očekávání vzrostla ΔPa také v plicích potkanů vystavených chronické hypoxii. Mezi skupinami PAO a H nebyl v ΔPa žádný významný rozdíl. Částečná obstrukce aorty a chronická hypoxie neměly žádný statisticky významný kumulativní vliv na ΔPa (Obr. č. 13B).



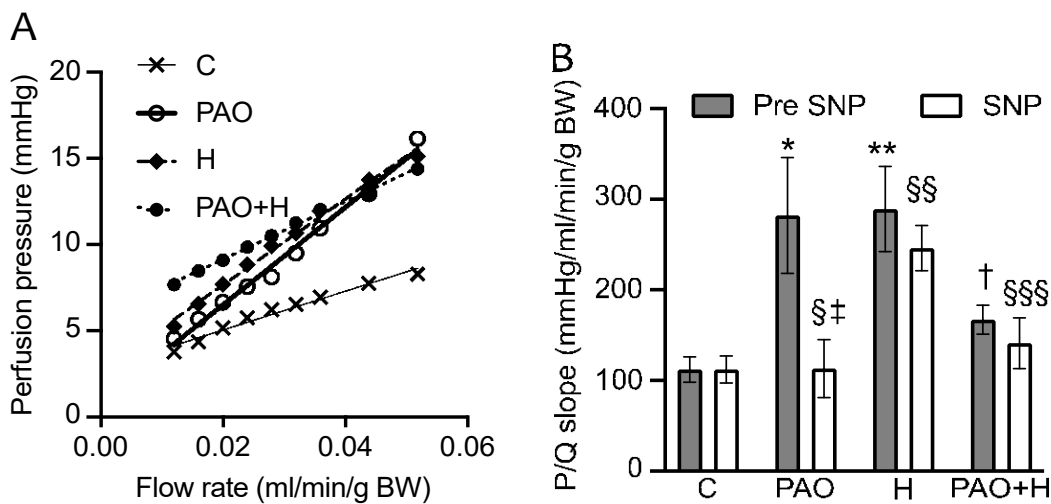
Obr. č. 13 Výchozí perfuzní tlak (A) a pokles arteriálního tlaku při okluzi (ΔPa , B) v izolovaných plicích jsou zvýšeny částečnou obstrukcí aorty, chronickou hypoxií a jejich kombinací.

Výchozí perfuzní tlak byl měřen při průtoku 0,04 ml/min/g tělesné hmotnosti. Vysvětlení ΔPa viz obrázek 1. Označení skupin na vodorovné ose viz legenda k obrázku 2. Kolečka představují jednotlivé hodnoty, vodorovné čáry jsou průměry a SD. *P = 0,036 (v A) nebo 0,0020 (v B) oproti skupině C; ** P < 0,0001 (v A) nebo P = 0,0011 (v B) oproti skupině C; ***P = 0,0007 (v A) nebo 0,0173 (v B) oproti skupině C; †P = 0,0319 oproti skupině H Další rozdíly: P ≥ 0,1306 (ve skupině A) nebo 0,362 (ve skupině B).

Studie D - role vazokonstrikce

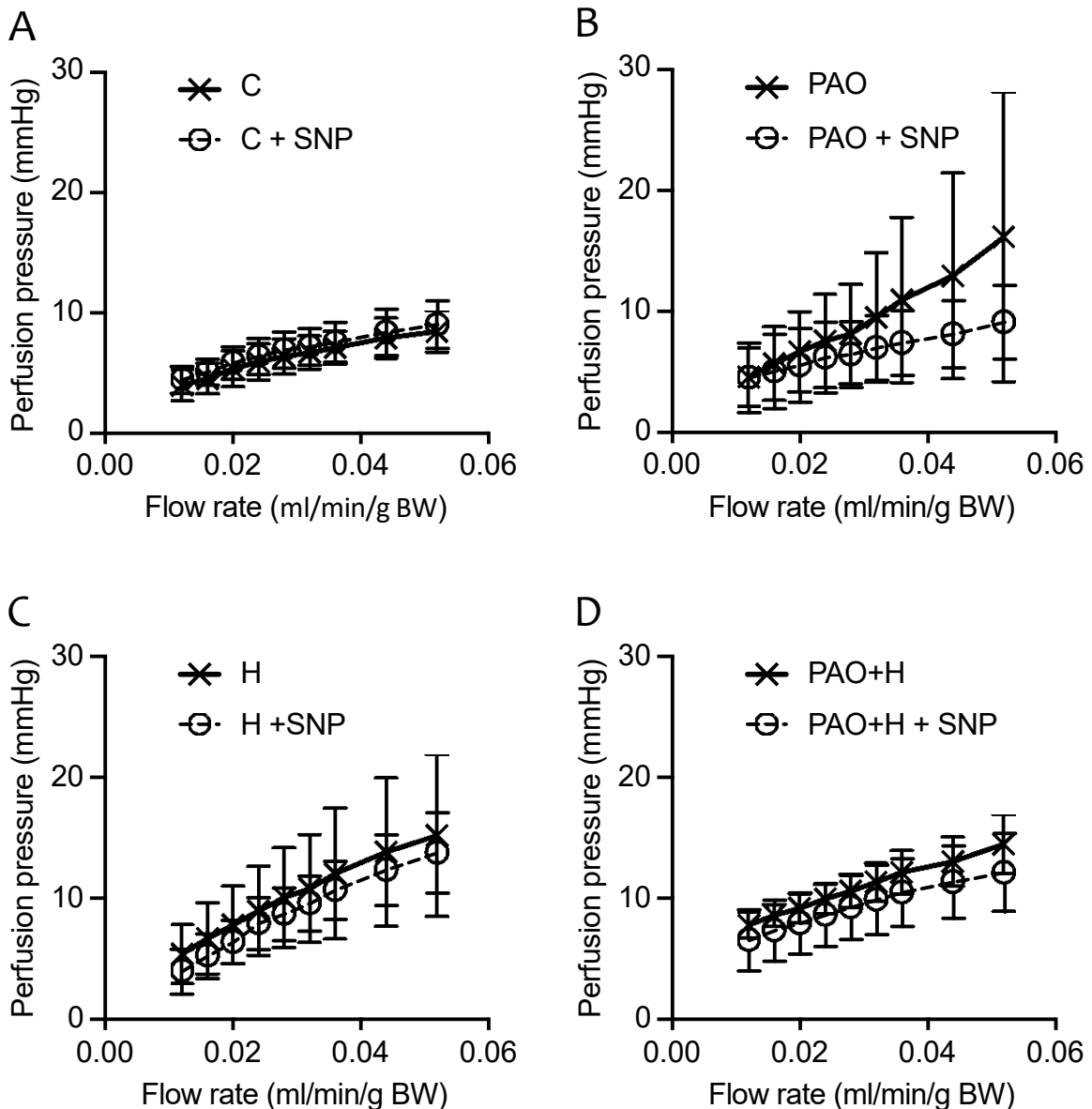
Částečná obstrukce aorty vedla ke zvýšenému sklonu křivky (resp. regresní přímky) závislosti P/Q v izolovaných plicích (Obr. č. 14). Chronická hypoxie zvýšila její sklon podobně jako částečná aortální obstrukce. Průsečík regresní přímky tlakovou osou se mezi skupinami nelišila, s výjimkou PAO+H, kde byl vyšší než u kontrol ($5,8 \pm 3,8$ vs. $2,8 \pm 3,6$ mmHg, $P = 0,0074$; $n = 7$ /skupinu).

Nitroprusid sodný neměl v kontrolní skupině žádný znatelný vliv na křivku (resp. Regresní přímku) P/Q (Obr. č. 14B a 15A). Ve skupině s PAO nitroprusid sodný snížil sklon regresní přímky P/Q na hodnotu blízkou hodnotě u kontrol (Obr. č. 14Ba 15B). Ve skupinách H a PAO+H se sklony regresních přímek P/Q před a po nitroprusidu sodném významně nelišily (Obr. č. 14B a 15C a D); celé přímky však byly paralelně posunuty směrem k nižším tlakům ($P = 0,0491$, resp. $0,0004$; $n = 7$ /skupinu).



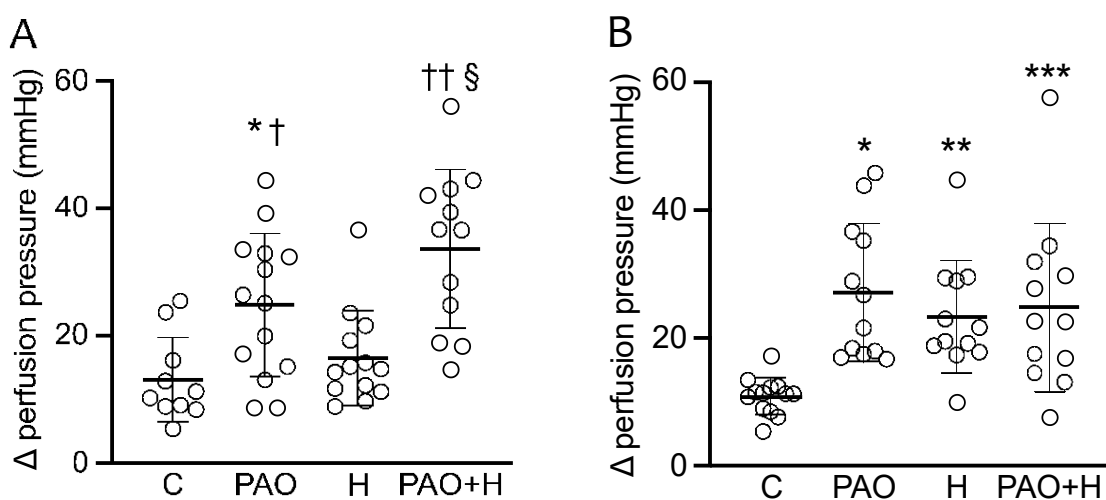
Obr. č. 14 Vztah mezi průtokem a perfuzním tlakem v izolovaných plicích. A: Body představují průměrné hodnoty skupin ($n = 7$ /skupina), směrodatné odchylky jsou zde pro přehlednost vynechány a jsou uvedeny na obrázku 8. Čáry jsou lineární regrese dat pro každou skupinu. B: Sklony lineárních regresí údajů o perfuzním tlaku a průtoku (P/Q) v izolovaných plicích před a po podání nitroprusidu sodného (SNP) (průměry a SD, $n = 7$ /skupinu). BW = tělesná hmotnost. Označení skupin na vodorovné ose viz legenda k obrázku 2. * $P = 0,0024$ oproti skupině C před podáním SNP; ** $P =$

0,0142 vs. skupina C před SNP; †P = 0,0462 vs. skupina PAO před SNP; §P = 0,0003 vs. skupina H s SNP; §§P < 0,0001 vs. skupina C se SNP; §§§P = 0,0028 vs. skupina H se SNP; ‡P = 0,0285 vs. stejná skupina před SNP; Všechny ostatní rozdíly před SNP: P ≥ 0,1535; Všechny ostatní rozdíly s SNP: P ≥ 0,3920; Všechny ostatní rozdíly mezi hodnotami před a po SNP: P ≥ 0,4398



Obr. č. 15 Vliv nitroprusidu sodného (SNP) na vztah mezi průtokem a perfuzním tlakem v izolovaných plicích. A: kontrolní potkani (skupina C); B: potkani 3 týdny po částečném uzávěru aorty (skupina PAO); C: potkani po 3 týdnech hypoxické expozice (skupina H); D: potkani vystavení 3 týdnů hypoxii s částečným uzávěrem aorty (skupina PAO+H). Průměry a SD (n = 7/skupinu).

Velikost vazokonstrikčních odpovědí na angiotenzin II byla u plic ze skupin PAO a PAO+H ve srovnání s kontrolami zvýšená (Obr. č. 16A). Samotná chronická hypoxie tuto reaktivitu nezměnila. V porovnání s kontrolami byly vazokonstrikční odpovědi na akutní hypoxické výzvy zvýšeny podobně u skupin PAO, H a PAO+H (obr. 16B). Všechny údaje o vazokonstrikční reaktivitě byly sloučeny ze studií C a D, protože byly získány podle stejných protokolů od stejných experimentálních skupin.



Obr. č. 16 Akutní vazokonstrikční reaktivita v izolovaných plicích je potencována částečnou obstrukcí aorty. A: Změna perfuzního tlaku vyvolaná injekcí angiotenzinu II (0,2 µg) do přívodní linie je zvýšena částečnou obstrukcí aorty se současnou chronickou hypoxií nebo bez ní. B: Změna perfuzního tlaku vyvolaná akutní hypoxickou ventilací (0 % O₂) je zvýšena částečnou obstrukcí aorty, chronickou hypoxií a jejich kombinací. Označení skupin na vodorovné ose viz legenda k obrázku 2. Kolečka představují jednotlivé hodnoty, vodorovné čáry jsou průměry a SD. *P = 0,0069 (v A) nebo P = 0,0001 (v B) oproti skupině C; **P = 0,0028 oproti skupině C; ***P = 0,0010 oproti skupině C; †P = 0,0342 oproti skupině H; ††P = 0,0296 vs. skupina PAO; §P < 0,0001 vs. skupiny C a H; Skupiny C vs. H v A: P = 0,4341; všechny ostatní rozdíly v B: P ≥ 0,3256

Studie E - strukturální změny malých prealveolárních cév

Parciální obstrukce aorty vedla 3 týdny po zákroku k výrazně zvýšené muskularizaci prealveolárních plicních cév (Obr. č. 10C)

5. Diskuze

5.1 DHEA a statin

Hlavním zjištěním této studie je, že léčba potkanů kombinací DHEA S a simvastatinu je přibližně stejně účinná při snižování PH v hypoxickém modelu potkanů jako každá z těchto léčebných metod samostatně.

Statiny jsou široce používány pro svůj účinek na snižování cholesterolu. Kompetitivně inhibují 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl koenzym A reduktázu, enzym řídící rychlost produkce cholesterolu (Davies et al., 2016). Kromě tohoto hlavního účinku mají statiny řadu dalších, tzv. pleiotropních účinků, které zahrnují antioxidační, antiproliferativní, antitrombotické a antiinflatorní vlastnosti. Po první zprávě, že léčba statiny může snížit experimentálně navozenou PH (Nishimura et al., 2002), byla v řadě studií popsána schopnost různých statinů částečně zabránit rozvoji PH na několika modelech potkanů, včetně chronické hypoxie (Girgis et al., 2003; Murata et al., 2005), monokrotalinu (Guerard et al., 2006; Laudi et al., 2007; Pei et al., 2011; Rakotoniaina et al., 2006; Satoh and Satoh, 2009; Sun and Ku, 2008), blokády receptoru pro vakuolární endoteliální růstový faktor v kombinaci s hypoxií (Taraseviciene-Stewart et al., 2006), intransgenních potkanů s nadměrnou expresí reninu (DeMarco et al., 2009) a u potkanů s PH v důsledku plicní fibrózy vyvolané neomycinem (Schroll et al., 2013). Podobný účinek byl zaznamenán u potkanů (Lee et al., 2005) a morčat (Wright et al., 2011) s PH vyvolanou kouřením. Atorvastatin zabránil rozvoji PH vyvolané virem lidské imunodeficiency u makaků (Rabacal et al., 2019). Naše výsledky jsou s těmito studiemi plně v souladu.

Kromě prevence PH na zvířecích modelech bylo opakovaně prokázáno, že statiny snižují PH po jejím vzniku, a to jak u monokrotalinových (Jasińska-Stroschein et al., 2014; Nishimura et al., 2003; Pei et al., 2011; Satoh and Satoh, 2009), tak u hypoxických (Girgis et al., 2007)

potkaních modelů, ačkoli existují i zprávy o minimální účinnosti statinů proti zavedené monokrotalinové PH (McMurtry et al., 2007; Sun and Ku, 2008).

U lidských pacientů jsou studie méně průkazné. Tři nezávislé metaanalýzy předchozích klinických studií nezjistily žádný příznivý účinek léčby statiny na PH ze všech příčin (Anand et al., 2016; Rysz-Górzynska et al., 2016; Wang et al., 2016). To by mohlo souviset s paradoxem, že statiny snižují lipoproteincholesterol o nízké hustotě (Stroes, 2005), ale cholesterol v lipoproteinech o nízké hustotě je u pacientů s PAH již nízký a úspěšná léčba plicní hypertenze tyto nízké hladiny zvyšuje (Kopeć et al., 2017). Nicméně samostatná metaanalýza zaměřená pouze na pacienty CHOPN zjistila snížení PH u pacientů léčených statiny (Lu et al., 2019). Náš potkaní model PH vyvolané chronickou hypoxií dobře odpovídá situaci pacientů s CHOPN, u nichž je hlavní příčinou vzniku PH jejich chronicky hypoxemický stav.

Pokud jde o mechanismy, kterými mohou statiny zmírnit PH, většina dosavadních studií se zaměřovala především na obnovení exprese a/nebo aktivity NO syntázy snížené PH (Guerard et al., 2006; Murata et al., 2005; Pei et al., 2011; Rakotoniaina et al., 2006). Bylo také zaznamenáno snížení plazmatické koncentrace asymetrického dimethylargininu, endogenního inhibitoru NO syntézy (Pei et al., 2011). V naší současné studii nebyla plazmatická koncentrace NOx při chronické hypoxii léčbou simvastatinem změněna (obr. 2). To pravděpodobně souvisí s tím, že - na rozdíl od výše uvedených studií - náš model PH nebyl spojen se snížením NOx. Ve skutečnosti byl plazmatický NOx vyšší u hypoxických potkanů ve srovnání s normoxickými kontrolami, jak je často pozorováno u chronického hypoxického modelu PH (Hampl and Herget, 2000). V našem modelu PH tedy nedošlo ke snížení produkce NO, které by bylo možné zvrátit léčbou statinem. Již dříve bylo prokázáno, že zvýšená produkce NO izoformou II NO syntázy (iNOS) skutečně přispívá k iniciaci PH během prvních dnů expozice hypoxií (Hampl et al., 2006). V této souvislosti je zajímavá tendence k

menšímu nárůstu NO_x v plazmě při hypoxii, když byli potkani léčeni kombinací simvastatinu a DHEA S. Ačkoli však průměrné zvýšení koncentrace NO_x v plazmě u skupiny HDS oproti hodnotě u normoxických kontrol bylo přibližně poloviční oproti hypoxickým kontrolám, rozdíly nedosáhly předem definované hranice statistické významnosti. Je možné, že studie neměla v tomto parametru dostatečnou statistickou sílu.

Statiny působí jako antioxidanty, a to několika mechanismy (Beltowski, 2005; Davignon et al., 2004), ačkoliv v některých experimentálních modelech byl zaznamenán i prooxidační účinek statinů (Beltowski, 2005). Zvýšený oxidační stres je významným patogenetickým faktorem chronické hypoxické PH (Herget et al., 2000; Lachmanová et al., 2005; Lai et al., 1998). Antioxidační aktivita statinů tak může částečně vysvětlovat jejich terapeutické účinky u PH. Zavedený marker oxidačního stresu, plazmatický malondialdehyd, byl v naší studii výrazně snížen léčbou simvastatinem, a to jak samostatně, tak v kombinaci s DHEA S (obr. 3), jak se uvádí v literatuře (Zinellu et al., 2019). Produkce superoxidu (měřená ERP) se však samotnou léčbou simvastatinem nezměnila (obr. 4), což naznačuje, že v oxidačním stresu u chronicky hypoxických potkanů hrají hlavní roli jiné radikály než superoxid. Haendeler a spol. například ukázali, že statiny mohou působit jako antioxidanty tím, že usnadňují redukci jiných proteinů pomocí cysteinové thiol-disulfidové výměny (Haendeler et al., 2004).

DHEA je steroidní hormon syntetizovaný především v kůře nadledvin. V krvi se vyskytuje převážně ve formě svého 3 β sulfátového esteru, DHEA S, na který se převádí sulfotransferázami zejména v játrech a kůře nadledvin. Většina účinků DHEA je tedy zprostředkována DHEA S (Celec and Stárka, 2003). DHEA/DHEA S má antioxidační aktivitu spojenou s inhibicí syntézy NADPH (Schwartz and Pashko, 2004), stimuluje uvolňování NO (Liu and Dillon, 2002; Simoncini et al., 2003) a KCa kanálů (Bonnet et al., 2003; Farrukh et al., 1998; Peng et al., 1999), které zprostředkovávají vazodilataci v plicním oběhu (Hampl et al., 1995; Yuan, 1995). DHEA také inhibuje napětově řízené Ca²⁺ kanály typu L, čímž

napodobuje jednu důležitou větev zavedené terapie PH. Vzhledem k těmto vlastnostem a vzhledem k tomu, že jeho exogenní podávání je u lidí dobře tolerováno, je DHEA (nebo DHEA S) atraktivní jako potenciální léčba PH.

Léčba DHEA/DHEA S může částečně předcházet experimentální PH a také částečně zvrátit PH již rozvinutou (Bonnet et al., 2003; Dumas de la Roque et al., 2013; Hampl et al., 2003b; Homma et al., 2008; Oka et al., 2007; Zhang et al., 2019). Zlepšení mPAP a plicní cévní rezistence bylo prokázáno dokonce i u malé skupiny pacientů s PH související s CHOPN (Dumas de La Roque et al., 2012). Příznivý účinek suplementace DHEA koresponduje s konzistentně uváděnými sníženými plazmatickými hladinami DHEA S u pacientů s PH (Baird et al., 2021; Ventetuolo et al., 2016). Na základě těchto zjištění v současné době probíhá randomizovaná dvojitě zaslepená placebem kontrolovaná zkřížená studie perorálního DHEA u pacientů s PAH (EDIPHY) (Walsh et al., 2021). Naše výsledky plně potvrzují příznivý účinek suplementace DHEA/DHEA S na PH.

Naše výsledky týkající se možné role antioxidační aktivity DHEA S při snižování PH jsou poněkud rozporuplné. Na jedné straně naše zjištění významně sníženého plazmatického MDA po léčbě DHEA S (obr. 3) podporuje možnost, že DHEA S působí na PH alespoň částečně snížením oxidačního stresu. Na druhé straně byla míra produkce superoxidu po působení DHEA S mírně, ale významně zvýšena (obr. 4). Toto zjištění koresponduje s předchozími zprávami o prooxidačním účinku DHEA a DHEA S ve vyšších dávkách (Hayashi et al., 1994; Mastrocola et al., 2003). Je možné, že DHEA S působil odlišně na superoxid a některé další kyslíkové radikály (jak jsme pozorovali i v případě simvastatinu). Ve skutečnosti jsou přinejmenším některé účinky DHEA zprostředkovány jeho stimulací uvolňování peroxidu vodíku (Iruthayanathan et al., 2011). To by odpovídalo dřívějšímu zjištění výrazně zvýšené produkce peroxidu vodíku alveolárními makrofágy u potkanů s hypoxickou PH (Wilhelm et al., 2003). Alveolární makrofágy a jejich produkce reaktivních forem kyslíku se podílejí na

mechanismu hypoxické PH (Žaloudíková et al., 2016). Kromě toho může DHEA (Rom and Harkin, 1991) blokovat produkci superoxidu alveolárními makrofágy, která je rovněž součástí mechanismu hypoxické PH (Žaloudíková et al., 2016).

Poněkud překvapivě se pozitivní účinky simvastatinu, DHEA S a jejich kombinace na mPAP a PVRI neprojeví snížením hypertrofie pravé komory. Zatímco tradičně bylo zvětšení pravé komory považováno za jednoduchý mechanistický důsledek afterloadu zvýšeného PH, dnes je zřejmé, že vztah mezi velikostí pravé komory a mPAP je komplexnější. Například několik dlouhodobých studií u lidí nezjistilo žádný pozitivní účinek léčby epoprostenolem na hmotnost pravé komory navzdory zlepšení PH (Vonk Noordegraaf and Galiè, 2011). Disociace mezi pozitivním účinkem léčby na mPAP a žádným účinkem na hypertrofii pravé komory byla zaznamenána také na zvířecích modelech (Ball et al., 2014).

Proč nejsou účinky simvastatinu a DHEA S na PH aditivní? Jednou z možností je, že většina příznivých účinků na PH je prostřednictvím antioxidační aktivity. Účinek simvastatinu na plazmatickou MDA byl skutečně hluboký a DHEA S se k němu mohl přidat jen málo, zejména proto, že jeho vlastní účinek na MDA byl poměrně skromný. Tato možnost se však zdá nepravděpodobná, protože účinek simvastatinu na PH byl velmi podobný účinku DHEA S, avšak velikost jejich vlivu na plazmatickou MDA byla zcela rozdílná.

Jedním z rozdílů v mechanismu účinku statinů a DHEA je jejich vliv na různé K^+ kanály, které řídí membránový potenciál buněk hladkého svalstva plicních arterií, a tím i jejich napětí. DHEA aktivuje K_{Ca} kanály (Farrukh et al., 1998), konkrétně na charybdotoxin citlivý $BK_{Ca}(K_{Ca1.1})$ (Bonnet et al., 2003; Peng et al., 1999). Možná aktivace K_V kanálů DHEA byla některými autory potvrzena (Bonnet et al., 2003) a jinými vyloučena (s možnou výjimkou $KV1.3$) (Peng et al., 1999). Na druhou stranu je známo, že statiny stimulují K^+ kanály citlivé na ATP (které hrají malou roli v regulaci hladké svaloviny plicních arterií) (Sehra et al., 2017). Bylo zjištěno, že statiny aktivují K_V kanály obecně (Chen et al., 2016) a inhibují $K_V1.3$

kanály v rakovinných T buňkách (Teisseyre et al., 2021). V hladké svalovině cév je zvýšení regulace Kv1.3 důležité pro proliferaci a migraci (Cheong et al., 2011; Ciudad et al., 2015). Vliv statinů na aktivitu kanálů BK_{Ca} nebyl zaznamenán, ačkoli mohou aktivovat kanály K_{Ca} s malou vodivostí (McNeish et al., 2012). Zdá se tedy, že DHEA disponuje mechanismem plicní vazodilatace (aktivace kanálů BK_{Ca}), který statiny postrádají. To by mělo vést k aditivnímu účinku na PH. Nedostatek aditivity může znamenat, že účast otevření BK_{Ca} kanálu v mechanismu účinku DHEA na PH není zásadní. Statiny by ovšem mohly aktivovat kanály BK_{Ca} nepřímo, prostřednictvím své známé podpory aktivity NO. NO způsobuje plicní vazodilataci aktivací kanálů BK_{Ca} (Hampl et al., 1995).

Další možné vysvětlení nedostatečné aditivity DHEA S a statinů v jejich účinku proti PH by mohlo souviset s tím, že cholesterol je prekurzorem syntézy DHEA. Je tedy možné, že léčba simvastatinem snížila endogenní produkci DHEA (a DHEA S) a přidání exogenního DHEA S k léčbě statiny pouze obnovilo normální hladinu DHEA S, nikoliv že by ji zvýšilo nad normál. Metaanalýza studií u lidí totiž ukázala, že statiny snižují hladiny DHEA u žen se syndromem polycystických vaječnicků, i když tento účinek byl zaznamenán pouze po léčbě atorvastatinem, ale nikoli simvastatinem (Yang et al., 2019). Pokud by však DHEA S a statin ovlivňovaly PH různými mechanismy, stále by se dalo očekávat, že účinek samotného simvastatinu (pravděpodobně s nižšími hladinami DHEA S) bude menší než jeho účinek s přidáním DHEA S. V případě, že by statin a DHEA S ovlivňovaly PH různými mechanismy, bylo by možné očekávat, že účinek samotného simvastatinu bude menší než jeho účinek s přidáním DHEA S. A konečně, DHEA se může podobat statinům svou schopností inhibovat 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl koenzym A reductázu (Pascale et al., 1995). To by znamenalo, že snížení PH statiny nepatří mezi jejich pleiotropní účinky nesouvisející s inhibicí 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl koenzym A reductázy. To ostatně Girgis a spol. vyvodili ze svých údajů, které ukazují, že útlumu PH simvastatinem lze zabránit suplementací produktu aktivity

3-hydroxy-3-methyl-glutaryl koenzym A reduktázy, mevalonátu (Girgis et al., 2007). Mechanismy, kterými může snížená aktivita 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl koenzym A reduktázy vést k menší PH, nejsou známy a zaslouží si další zkoumání.

5.2 Aktivátor HIF zvyšuje plicní cévní rezistenci

Tato studie ukazuje, že inhibice prolylhydroxyláz (a tedy aktivace HIF) roxadustatem zvyšuje kritický uzavírací tlak v plicních cévách, a tím posouvá tlaky v rozsahu průtoků k vyšším hodnotám. Tento účinek je nezávislý na vlivu roxadustatu na hematokrit, ale je menší než u zavedeného modelu PH při chronické hypoxii. V souladu s dřívějším zjištěním, že k zásadním změnám při rozvoji chronické hypoxické PH dochází během prvních dnů expozice hypoxii (Hampel et al., 2006), je účinek roxadustatu na plicní oběh rychlejší (již po 2 dnech) než na hematokrit. Vzhledem k tomu, že jsme účinek roxadustatu zjistili v plicích perfundovaných bezbuněčným roztokem, je pravděpodobné, že *in vivo*, kde je příznivý účinek roxadustatu na hematokrit také přítomen, bude jeho vliv na plicní cévní rezistenci ještě větší.

Akutní plicní vazokonstrikční reaktivita (na angiotenzin II a 0 % O₂) nebyla roxadustatem ovlivněna. To je poněkud překvapivé, protože se uvádí, že roxadustat snižuje expresi cévních receptorů AT₁ (Yu et al., 2021). Navíc exprese a aktivita K_v, které jsou důležité v mechanismu akutní hypoxické vazokonstrikce (Archer et al., 2001), jsou ovlivněny HIF (Pullamsetti et al., 2020). Naše údaje naznačují, že tento vliv není zvláště závažný.

U kardiovaskulárních onemocnění, včetně experimentální PH, byl použit antitrypanosomální lék DIZE a stimulátor ACE2 (Qaradakhi et al., 2020). Naše zjištění posunu P/Q linií k vyšším tlakům a potenciace reaktivity angiotenzinu II u většiny našich experimentálních skupin je tedy překvapivé. Je pravděpodobné, že zde hrály roli jiné DIZE aktivity než aktivace ACE2. Jednou z možností by mohla být interference s iontovými kanály citlivými na kyseliny (da Silva Oliveira and de Freitas, 2015), u nichž se nedávno ukázalo, že jsou důležité pro regulaci

hladkého svalstva plicních cév (Jernigan et al., 2021). Nezbyvá než připustit, že tomuto paradoxnímu účinku DIZE nerozumíme, nicméně považujeme za užitečné o něm informovat.

5.3 Nový experimentální model levostranného srdečního selhání u potkanů

Zavedli jsme nový snadý, minimálně invazivní a reverzibilní model PH vyvolané tlakovým přetížením levého srdce u potkanů. Nevyžaduje složité mikrochirurgické techniky ani otevřenou operaci hrudníku. Provádí se v krátkodobé anestezii se spontánním dýcháním a vyžaduje minimální zotavení. U mladých zvířat je mortalita přijatelná a činí ~ 10 %. Křivka učení experimentátorů je krátká (<10 neúspěšných pokusů). Po úspěšné implantaci hadičky do vzestupné aorty jsme se nesetkali s žádným selháním metody. Tlakové přetížení levého srdce není natolik závažné, aby způsobilo smrt v testovaném časovém rámci.

Změny hmotnosti srdečních komor vyvolané tímto postupem jsou plně reverzibilní. Podobná dynamika byla již dříve zaznamenána u levé komory a celého srdce po odstranění zevní bandáže ze vzestupné aorty (Cho et al., 2014).

Kromě toho, že naše metoda způsobuje tlakové přetížení levého srdce (zvýšený LVEDP), vyvolává také PH, o čemž svědčí zvýšený PAP, zvětšená pravá komora in vivo a zvýšená cévní rezistence v izolovaných plicích (zvýšený perfuzní tlak při konstantním průtoku, zvýšený sklon přímek P/Q). Zvýšená cévní rezistence v izolovaných plicích (kde je eliminován faktor zvýšeného odtokového tlaku) ukazuje, že tato PH není jen pasivním přenosem tlakového přetížení levého srdce proti proudu, ale že zahrnuje spíše změny samotných plicních cév ("reaktivní" forma nebo stadium PH2). Naše výsledky s okluzemi plicního přítoku rovněž ukazují významnou účast zvýšené plicní prekapilární rezistence. Zvýšení PVR bylo téměř eliminováno vazodilatačním prostředkem, nitroprusidem sodným, což ukazuje na zásadní roli vazokonstrikce v PH v tomto modelu. Nicméně jsme u tohoto modelu detekovali také výraznou muskularizaci periferních plicních cév (vyšší %DL), což

pravděpodobně také přispívá ke zvýšenému PAP. To nepřímo podporuje i zesílená vazokonstriční reaktivita a na angiotenzin II a akutní hypoxické podněty.

Ve srovnání se zavedeným modelem PH skupiny 3, chronickou hypoxií, zvyšovala částečná aortální obstrukce hodnoty PH, buď ve stejné míře (sklon tlaku a průtoku, %DL) nebo méně (průměrný PAP, RV/LV+S). To odpovídá klinickým zkušenostem, že PH u pacientů s jednostranným srdečním selháním nebývá příliš těžká, zejména v klidu (Butler et al., 1999; Lam et al., 2009; Maron et al., 2016).

Stupeň remodelace plicních cév (%DL) po částečné obstrukci aorty nebyl v této studii přímo srovnáván se stupněm remodelace po chronické hypoxii. Zdá se však, že byl vyšší (74 %, oproti 25 % u kontrol) než námi dříve uváděné hodnoty u hypoxických potkanů (~35-60 %) (Chovanec et al., 2009; Hampl et al., 2003b; Herget et al., 2003; Lachmanová et al., 2005)

Rozsáhlá remodelace plicních cév u PH2 byla již dříve popsána u potkanů, myši a lidí (Chen et al., 2012; Delgado et al., 2005; Fayyaz et al., 2018; Hunt et al., 2013).

Je poněkud překvapivé, že kombinace částečné aortální obstrukce s hypoxickou expozicí dále nezhoršila většinu příznaků PH (PAP in vivo a RV/LV+S, perfuzní tlak v izolovaných plicích) ve srovnání s potkany vystavenými samotné hypoxii. To může naznačovat, že účinek částečné aortální obstrukce na plicní cévy není zprostředkován tím, že by zvířata byla hypoxemická. Ať už je tedy tlakové přetížení levého srdce vyvoláno jakýmkoli mechanismem, "soutěží" o účinek na plicní cévy s hypoxií (která je silnější, jak je uvedeno výše). Současně v porovnání se samotnou hypoxií a samotnou částečnou aortální obstrukcí byla tělesná hmotnost výrazně snížena jejich kombinací, což naznačuje aditivní účinky na tělesnou hmotnost. Skutečnost, že hmotnost obou komor v poměru k tělesné hmotnosti byla ve skupině PAO+H rovněž zvýšena ve srovnání se skupinami PAO i H, lze vysvětlit nepoměrně větším úbytkem hmotnosti ostatních tkání ve studovaném časovém rámci.

Jistým nedostatkem tohoto modelu je náhlý nástup přetížení levého srdce, který neodráží běžnou klinickou situaci PH2, kdy se tlakové přetížení levého srdce vyvíjí postupně a umožňuje srdci adaptovat se na zvyšující se tlak. Domníváme se, že to je důvod, proč poněkud paradoxně zavedení hadičky stejné velikosti mnohem lépe snášela menší než větší zvířata. Jejich nízký věk jim pravděpodobně umožnil účinněji kompenzovat náhlé zvýšení afterloadu. To je hlavní nevýhoda našeho postupu ve srovnání s nejčastěji používaným modelem PH2 u potkanů, suprakoronární aortální bandáží. Při tomto postupu je vzestupná aorta částečně uzavřena stehem nebo svorkou u malých (mladých) potkanů (80-100 g BW). S jejich růstem se pak poměrná část průřezu aorty, která je omezena, relativně zvětšuje a tlakové přetížení se postupně zvyšuje. Úplný vývoj modelu obvykle trvá více než 2 měsíce (Dai et al., 2004; Hentschel et al., 2007; Hunt et al., 2013; Kerem et al., 2010; Lambert et al., 2021; Ranchoux et al., 2019; Wang et al., 2016; Yin et al., 2011, 2009; Zhang et al., 2019). Výhodou našeho modelu je naopak to, že využívá plně dospělé potkany (200-250 g), a simuluje tak častější klinickou situaci onemocnění levého srdce, ke kterému dochází spíše v dospělosti než v adolescenci.

6. ZÁVĚR

Tato práce se zabývá hledáním nových možností kombinační léčby PH, zkoumáním potenciálního nežádoucího účinku (rozvoje PH) u léků s potenciálem použití z jiné indikace a navození experimentální PH.

Potvrdili jsme příznivý účinek léčby statiny a DHEA S na mPAP a PVRI u PH. Zjistili jsme, že kombinovaná léčba oběma léky dohromady nemá aditivní účinek na PH. Jedním z možných vysvětlení je, že každý z léků snižuje PH především prostřednictvím inhibičního účinku na 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl koenzym A reduktázu. Statiny a DHEA S lze u PH kombinovat, pokud je to z nějakých důvodů potřebné či vhodné.

Potvrdili jsme hypotézu, že riziko PH vyvolané stabilizátory HIF je reálné a stojí za monitorování, zejména proto, že PH je běžnou komplikací chronického onemocnění ledvin i bez této léčby. Naštěstí se u roxadustatu nevyskytuje zvýšená reaktivita plicních vazokonstriktorů, která by byla dalším rizikovým faktorem. Zdá se, že HIF nehrají významnou roli v hypoxické plicní vazokonstrukci.

Zavedli jsme nový, snadno proveditelný a použitelný model PH u potkanů vyvolaný tlakovým přetížením levého srdce způsobeným částečnou intravaskulární obstrukcí vzestupné aorty. Tento model vykazuje jak zvýšenou muskularizaci periferních plicních cév, tak zvýšený cévní tonus s významným postižením prekapilární části plicního cévního řečiště. Díky své jednoduchosti a vlastnostem může být užitečný pro další studium patofyziologie PH2 a potenciální terapie.

7. REFERENCE

- Abe, K., Shimokawa, H., Morikawa, K., Uwatoku, T., Oi, K., Matsumoto, Y., Hattori, T., Nakashima, Y., Kaibuchi, K., Sueishi, K., Takeshit, A., 2004. Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. *Circ. Res.* 94, 385–393. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000111804.34509.94>
- Abe, K., Tawara, S., Oi, K., Hizume, T., Uwatoku, T., Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., Shimokawa, H., 2006. Long-term inhibition of Rho-kinase ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 48, 280–285. <https://doi.org/10.1097/01.fjc.0000248244.64430.4a>
- Agarwal, V., Phung, O.J., Tongbram, V., Bhardwaj, A., Coleman, C.I., 2010. Statin use and the prevention of venous thromboembolism: a meta-analysis. *Int. J. Clin. Pract.* 64, 1375–1383. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2010.02439.x>
- Aguero, J., Ishikawa, K., Hadri, L., Santos-Gallego, C., Fish, K., Hammoudi, N., Chaanine, A., Torquato, S., Naim, C., Ibanez, B., Pereda, D., García-Alvarez, A., Fuster, V., Sengupta, P.P., Leopold, J.A., Hajjar, R.J., 2014. Characterization of right ventricular remodeling and failure in a chronic pulmonary hypertension model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 307, H1204-1215. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00246.2014>
- Aiello, R.J., Bourassa, P.-A., Zhang, Q., Dubins, J., Goldberg, D.R., De Lombaert, S., Humbert, M., Guignabert, C., Cavašin, M.A., McKinsey, T.A., Paralkar, V., 2017. Tryptophan hydroxylase 1 Inhibition Impacts Pulmonary Vascular Remodeling in Two Rat Models of Pulmonary Hypertension. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 360, 267–279. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.237933>
- Alastalo, T.-P., Li, M., Perez, V. de J., Pham, D., Sawada, H., Wang, J.K., Koskenvuo, M., Wang, L., Freeman, B.A., Chang, H.Y., Rabinovitch, M., 2011. Disruption of PPAR γ / β -catenin-mediated regulation of apelin impairs BMP-induced mouse and human pulmonary arterial EC survival. *J. Clin. Invest.* 121, 3735–3746. <https://doi.org/10.1172/JCI43382>
- Aldred, M.A., Vijayakrishnan, J., James, V., Soubrier, F., Gomez-Sanchez, M.A., Martensson, G., Galie, N., Manes, A., Corris, P., Simonneau, G., Humbert, M., Morrell, N.W., Trembath, R.C., 2006. BMPR2 gene rearrangements account for a significant proportion of mutations in familial and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Hum. Mutat.* 27, 212–213. <https://doi.org/10.1002/humu.9398>
- Al-Hiti, H., Chovanec, M., Melenovský, V., Vajnerová, O., Baňasová, A., Kautzner, J., Herget, J., 2013. L-arginine in combination with sildenafil potentiates the attenuation of hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Physiol. Res.* 62, 589–595. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932463>
- Almeida, F.A., Suzuki, M., Scarborough, R.M., Lewicki, J.A., Maack, T., 1989. Clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor in rats. *Am. J. Physiol.* 256, R469-475. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1989.256.2.R469>
- Almudéver, P., Milara, J., De Diego, A., Serrano-Mollar, A., Xaubet, A., Perez-Vizcaino, F., Cogolludo, A., Cortijo, J., 2013. Role of tetrahydrobiopterin in pulmonary vascular remodelling associated with pulmonary fibrosis. *Thorax* 68, 938–948. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2013-203408>
- Anand, I.S., Kuskowski, M.A., Rector, T.S., Florea, V.G., Glazer, R.D., Hester, A., Chiang, Y.T., Aknay, N., Maggioni, A.P., Opasich, C., Latini, R., Cohn, J.N., 2005. Anemia and change in hemoglobin over time related to mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: results from Val-HeFT. *Circulation* 112, 1121–1127. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.512988>

- Anand, V., Garg, S., Duval, S., Thenappan, T., 2016. A Systematic Review and Meta-Analysis of Trials Using Statins in Pulmonary Arterial Hypertension. *Pulm. Circ.* 6, 295–301. <https://doi.org/10.1086/687304>
- Archer, S.L., Huang, J.M., Hampl, V., Nelson, D.P., Shultz, P.J., Weir, E.K., 1994. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7583–7587. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7583>
- Archer, S.L., London, B., Hampl, V., Wu, X., Nsair, A., Puttagunta, L., Hashimoto, K., Waite, R.E., Michelakis, E.D., 2001. Impairment of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice lacking the voltage-gated potassium channel Kv1.5. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 15, 1801–1803. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0649fje>
- Archer, S.L., Weir, E.K., Wilkins, M.R., 2010. Basic Science of Pulmonary Arterial Hypertension for Clinicians: New Concepts and Experimental Therapies. *Circulation* 121, 2045–2066. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.847707>
- Arlt, W., Callies, F., van Vlijmen, J.C., Koehler, I., Reincke, M., Bidlingmaier, M., Huebler, D., Oettel, M., Ernst, M., Schulte, H.M., Allolio, B., 1999. Dehydroepiandrosterone replacement in women with adrenal insufficiency. *N. Engl. J. Med.* 341, 1013–1020. <https://doi.org/10.1056/NEJM199909303411401>
- Badesch, D.B., Champion, H.C., Gomez Sanchez, M.A., Hoepfer, M.M., Loyd, J.E., Manes, A., McGoon, M., Naeije, R., Olschewski, H., Oudiz, R.J., Torbicki, A., 2009. Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54, S55–S66. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.04.011>
- Baird, G.L., Archer-Chicko, C., Barr, R.G., Bluemke, D.A., Foderaro, A.E., Fritz, J.S., Hill, N.S., Kawut, S.M., Klinger, J.R., Lima, J.A.C., Mullin, C.J., Ouyang, P., Palevsky, H.I., Palmisicano, A.J., Pinder, D., Preston, I.R., Roberts, K.E., Smith, K.A., Walsh, T., Whittenhall, M., Ventetuolo, C.E., 2018. Lower DHEA-S levels predict disease and worse outcomes in post-menopausal women with idiopathic, connective tissue disease- and congenital heart disease-associated pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* 51, 1800467. <https://doi.org/10.1183/13993003.00467-2018>
- Baird, G.L., Walsh, T., Aliotta, J., Allahua, M., Andrew, R., Bourjeily, G., Brodsky, A.S., Denver, N., Dooner, M., Harrington, E.O., Klinger, J.R., MacLean, M.R., Mullin, C.J., Pereira, M., Poppas, A., Whittenhall, M., Ventetuolo, C.E., 2021. Insights from the Menstrual Cycle in Pulmonary Arterial Hypertension. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 18, 218–228. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.202006-671OC>
- Ball, M.K., Waypa, G.B., Mungai, P.T., Nielsen, J.M., Czech, L., Dudley, V.J., Beussink, L., Dettman, R.W., Berkelhamer, S.K., Steinhorn, R.H., Shah, S.J., Schumacker, P.T., 2014. Regulation of hypoxia-induced pulmonary hypertension by vascular smooth muscle hypoxia-inducible factor-1 α . *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 314–324. <https://doi.org/10.1164/rccm.201302-0302OC>
- Bedi, O., Dhawan, V., Sharma, P.L., Kumar, P., 2016. Pleiotropic effects of statins: new therapeutic targets in drug design. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 389, 695–712. <https://doi.org/10.1007/s00210-016-1252-4>
- Beitl, E., Banasova, A., Vlcek, M., Mikova, D., Hampl, V., 2016. Nitric oxide as an indicator for severity of injury in polytrauma. *Bratisl. Lek. Listy* 117, 217–220. https://doi.org/10.4149/bl_2016_041
- Belohlávková, S., Simák, J., Kokesová, A., Hnilicková, O., Hampl, V., 2001. Fenfluramine-induced pulmonary vasoconstriction: role of serotonin receptors and potassium channels. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 91, 755–761. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.2.755>
- Beltowski, J., 2005. Statins and modulation of oxidative stress. *Toxicol. Mech. Methods* 15, 61–92. <https://doi.org/10.1080/15376520590918766>
- Blanco, I., Santos, S., Gea, J., Güell, R., Torres, F., Gimeno-Santos, E., Rodriguez, D.A., Vilaró, J., Gómez, B., Roca, J., Barberà, J.A., 2013. Sildenafil to improve respiratory rehabilitation

- outcomes in COPD: a controlled trial. *Eur. Respir. J.* 42, 982–992.
<https://doi.org/10.1183/09031936.00176312>
- Bonderman, D., Ghio, S., Felix, S.B., Ghofrani, H.-A., Michelakis, E., Mitrovic, V., Oudiz, R.J., Boateng, F., Scalise, A.-V., Roessig, L., Semigran, M.J., Left Ventricular Systolic Dysfunction Associated With Pulmonary Hypertension Riociguat Trial (LEPHT) Study Group, 2013. Riociguat for patients with pulmonary hypertension caused by systolic left ventricular dysfunction: a phase IIb double-blind, randomized, placebo-controlled, dose-ranging hemodynamic study. *Circulation* 128, 502–511. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001458>
- Bonnet, S., Dumas-de-La-Roque, E., Bégueret, H., Marthan, R., Fayon, M., Dos Santos, P., Savineau, J.-P., Baulieu, E.-E., 2003. Dehydroepiandrosterone (DHEA) prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 9488–9493.
- Boucherat, O., Agrawal, V., Lawrie, A., Bonnet, S., 2022. The Latest in Animal Models of Pulmonary Hypertension and Right Ventricular Failure. *Circ. Res.* 130, 1466–1486.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.319971>
- Buhaescu, I., Izzedine, H., 2007. Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications. *Clin. Biochem.* 40, 575–584.
- Burmakin, M., Fasching, A., Kobayashi, H., Urrutia, A.A., Damdimopoulos, A., Palm, F., Haase, V.H., 2021. Pharmacological HIF-PHD inhibition reduces renovascular resistance and increases glomerular filtration by stimulating nitric oxide generation. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 233, e13668. <https://doi.org/10.1111/apha.13668>
- Butler, J., Chomsky, D.B., Wilson, J.R., 1999. Pulmonary hypertension and exercise intolerance in patients with heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 34, 1802–1806.
[https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(99\)00408-8](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(99)00408-8)
- Campen, M.J., Shimoda, L.A., O'Donnell, C.P., 2005. Acute and chronic cardiovascular effects of intermittent hypoxia in C57BL/6J mice. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 99, 2028–2035.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00411.2005>
- Carey, R.M., Wang, Z.-Q., Siragy, H.M., 2000. Role of the Angiotensin Type 2 Receptor in the Regulation of Blood Pressure and Renal Function. *Hypertension* 35, 155–163.
<https://doi.org/10.1161/01.HYP.35.1.155>
- Cargill, R.I., Lipworth, B.J., 1996. Atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in cor pulmonale. Hemodynamic and endocrine effects. *Chest* 110, 1220–1225.
<https://doi.org/10.1378/chest.110.5.1220>
- Cargill, R.I., Lipworth, B.J., 1995. Acute effects of ANP and BNP on hypoxic pulmonary vasoconstriction in humans. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 40, 585–590.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1995.tb05803.x>
- Celec, P., Stárka, L., 2003. Dehydroepiandrosterone - is the fountain of youth drying out? *Physiol. Res.* 52, 397–407.
- Chalupsky, K., Kračun, D., Kanchev, I., Bertram, K., Görlach, A., 2015. Folic Acid Promotes Recycling of Tetrahydrobiopterin and Protects Against Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension by Recoupling Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Antioxid. Redox Signal.* 23, 1076–1091.
<https://doi.org/10.1089/ars.2015.6329>
- Chan, S.Y., Loscalzo, J., 2008. Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44, 14–30. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.09.006>
- Chauhan-Patel, R., Spruce, A.E., 1997. Characterization of single inward rectifier potassium channels from embryonic *Xenopus laevis* myocytes. *J. Membr. Biol.* 158, 265–274.
<https://doi.org/10.1007/s002329900263>
- Chelladurai, P., Seeger, W., Pullamsetti, S.S., 2012. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 40, 766–782.
<https://doi.org/10.1183/09031936.00209911>
- Chen, W., Pendyala, S., Natarajan, V., Garcia, J.G., Jacobson, J.R., 2008. Endothelial cell barrier protection by simvastatin: GTPase regulation and NADPH oxidase inhibition. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 295, L575–L583.

- Chen, X., Zhai, Z., Huang, K., Xie, W., Wan, J., Wang, C., 2018. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: A systemic review and meta-analysis. *Clin. Respir. J.* 12, 2065–2074. <https://doi.org/10.1111/crj.12774>
- Chen, Y., Guo, H., Xu, D., Xu, X., Wang, H., Hu, X., Lu, Z., Kwak, D., Xu, Y., Gunther, R., Huo, Y., Weir, E.K., 2012. Left ventricular failure produces profound lung remodeling and pulmonary hypertension in mice: heart failure causes severe lung disease. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 59, 1170–1178. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.186072>
- Chen, Y., Zhang, H., Liu, H., Cao, A., 2016. Mechanisms of simvastatin-induced vasodilatation of rat superior mesenteric arteries. *Biomed. Rep.* 5, 491–496. <https://doi.org/10.3892/br.2016.756>
- Cheong, A., Li, J., Sukumar, P., Kumar, B., Zeng, F., Riches, K., Munsch, C., Wood, I.C., Porter, K.E., Beech, D.J., 2011. Potent suppression of vascular smooth muscle cell migration and human neointimal hyperplasia by KV1.3 channel blockers. *Cardiovasc. Res.* 89, 282–289. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq305>
- Chevalier, M., Gilbert, G., Lory, P., Marthan, R., Quignard, J.F., Savineau, J.P., 2012. Dehydroepiandrosterone (DHEA) inhibits voltage-gated T-type calcium channels. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1530–1539. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.02.025>
- Chiurchiù, V., Izzi, V., D'Aquilio, F., Carotenuto, F., Di Nardo, P., Baldini, P.M., 2008. Brain Natriuretic Peptide (BNP) regulates the production of inflammatory mediators in human THP-1 macrophages. *Regul. Pept.* 148, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2008.02.009>
- Cho, J.S., Cho, E.J., Lee, J., Choi, H.-D., Park, K.C., Lee, K.-H., Yang, K.-J., Park, M.-W., Park, G.-M., Her, S.-H., Kim, C.J., 2014. Myocardial mechanics in a rat model with banding and debanding of the ascending aorta. *J. Cardiovasc. Ultrasound* 22, 189–195. <https://doi.org/10.4250/jcu.2014.22.4.189>
- Christman, B.W., McPherson, C.D., Newman, J.H., King, G.A., Bernard, G.R., Groves, B.M., Loyd, J.E., 1992. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 327, 70–75. <https://doi.org/10.1056/NEJM199207093270202>
- Cidad, P., Miguel-Velado, E., Ruiz-McDavitt, C., Alonso, E., Jiménez-Pérez, L., Asuaje, A., Carmona, Y., García-Arribas, D., López, J., Marroquín, Y., Fernández, M., Roqué, M., Pérez-García, M.T., López-López, J.R., 2015. Kv1.3 channels modulate human vascular smooth muscle cells proliferation independently of mTOR signaling pathway. *Pflugers Arch.* 467, 1711–1722. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1607-y>
- Corti, R., Burnett, J.C., Rouleau, J.L., Ruschitzka, F., Lüscher, T.F., 2001. Vasopeptidase inhibitors: a new therapeutic concept in cardiovascular disease? *Circulation* 104, 1856–1862. <https://doi.org/10.1161/hc4001.097191>
- Croom, K.F., Keating, G.M., 2004. Valsartan: a review of its use in patients with heart failure and/or left ventricular systolic dysfunction after myocardial infarction. *Am. J. Cardiovasc. Drugs Drugs Devices Interv.* 4, 395–404. <https://doi.org/10.2165/00129784-200404060-00008>
- da Silva Oliveira, G.L., de Freitas, R.M., 2015. Diminazene aceturate--An antiparasitic drug of antiquity: Advances in pharmacology & therapeutics. *Pharmacol. Res.* 102, 138–157. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.10.005>
- Dai, Z., Zhu, M.M., Peng, Y., Machireddy, N., Evans, C.E., Machado, R., Zhang, X., Zhao, Y.-Y., 2018. Therapeutic Targeting of Vascular Remodeling and Right Heart Failure in Pulmonary Arterial Hypertension with a HIF-2 α Inhibitor. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 198, 1423–1434. <https://doi.org/10.1164/rccm.201710-2079OC>
- Dai, Z.-K., Tan, M.-S., Chai, C.-Y., Yeh, J.-L., Chou, S.-H., Chiu, C.-C., Jeng, A.Y., Chen, I.-J., Wu, J.-R., 2004. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 in pulmonary hypertension secondary to heart failure in aorta-banded rats. *Pediatr. Pulmonol.* 37, 249–256. <https://doi.org/10.1002/ppul.10413>
- Dalal, J.J., Griffiths, B.E., Henderson, A.H., 1981. Primary pulmonary hypertension: effects of nifedipine. *Br. Heart J.* 46, 230–231. <https://doi.org/10.1136/hrt.46.2.230>

- Danser, A.H., van Kesteren, C.A., Bax, W.A., Tavenier, M., Derkx, F.H., Saxena, P.R., Schalekamp, M.A., 1997. Prorenin, renin, angiotensinogen, and angiotensin-converting enzyme in normal and failing human hearts. Evidence for renin binding. *Circulation* 96, 220–226.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.96.1.220>
- Davies, J.T., Delfino, S.F., Feinberg, C.E., Johnson, M.F., Nappi, V.L., Olinger, J.T., Schwab, A.P., Swanson, H.I., 2016. Current and Emerging Uses of Statins in Clinical Therapeutics: A Review. *Lipid Insights* 9, LPI.S37450. <https://doi.org/10.4137/LPI.S37450>
- Davignon, J., Jacob, R.F., Mason, R.P., 2004. The antioxidant effects of statins. *Coron. Artery Dis.* 15, 251–258. <https://doi.org/10.1097/01.mca.0000131573.31966.34>
- Dawson, C.A., Bronikowski, T.A., Linehan, J.H., Haworth, S.T., Rickaby, D.A., 1989. On the estimation of pulmonary capillary pressure from arterial occlusion. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140, 1228–1236. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/140.5.1228>
- Dawson, C.A., Bronikowski, T.A., Linehan, J.H., Rickaby, D.A., 1988. Distributions of vascular pressure and resistance in the lung. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 64, 274–284.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1988.64.1.274>
- de Man, F.S., Tu, L., Handoko, M.L., Rain, S., Ruiters, G., François, C., Schaliq, I., Dorfmueller, P., Simonneau, G., Fadel, E., Perros, F., Boonstra, A., Postmus, P.E., van der Velden, J., Vonk-Noordegraaf, A., Humbert, M., Eddahibi, S., Guignabert, C., 2012. Dysregulated renin-angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186, 780–789. <https://doi.org/10.1164/rccm.201203-0411OC>
- Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini, N., 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* 15, 316–328. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>
- Delgado, J.F., Conde, E., Sánchez, V., López-Ríos, F., Gómez-Sánchez, M.A., Escribano, P., Sotelo, T., Gómez de la Cámara, A., Cortina, J., de la Calzada, C.S., 2005. Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension due to chronic heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 7, 1011–1016.
<https://doi.org/10.1016/j.ejheart.2004.10.021>
- DeMarco, V.G., Habibi, J., Whaley-Connell, A.T., Schneider, R.I., Sowers, J.R., Andresen, B.T., Gutweiler, A.A., Ma, L., Johnson, M.S., Ferrario, C.M., Dellsperger, K.C., 2009. Rosuvastatin ameliorates the development of pulmonary arterial hypertension in the transgenic (mRen2)27 rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H1128–1139.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00048.2009>
- Dempsey, Y., Morecroft, I., Welsh, D.J., MacRitchie, N.A., Herold, N., Loughlin, L., Nilsen, M., Peacock, A.J., Harmar, A., Bader, M., MacLean, M.R., 2008. Converging evidence in support of the serotonin hypothesis of dexfenfluramine-induced pulmonary hypertension with novel transgenic mice. *Circulation* 117, 2928–2937.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.767558>
- Dessouroux, A., Akwa, Y., Baulieu, E.E., 2008. DHEA decreases HIF-1 α accumulation under hypoxia in human pulmonary artery cells: potential role in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 109, 81–89.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2007.12.001>
- Douschan, P., Kovacs, G., Avian, A., Foris, V., Gruber, F., Olschewski, A., Olschewski, H., 2018. Mild Elevation of Pulmonary Arterial Pressure as a Predictor of Mortality. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 197, 509–516. <https://doi.org/10.1164/rccm.201706-1215OC>
- Dumas de la Roque, E., Quignard, J.-F., Ducret, T., Dahan, D., Courtois, A., Begueret, H., Marthan, R., Savineau, J.-P., 2013. Beneficial effect of dehydroepiandrosterone on pulmonary hypertension in a rodent model of pulmonary hypertension in infants. *Pediatr. Res.* 74, 163–169. <https://doi.org/10.1038/pr.2013.73>
- Dumas de La Roque, E., Savineau, J.-P., Metivier, A.-C., Billes, M.-A., Kraemer, J.-P., Doutreleau, S., Jougon, J., Marthan, R., Moore, N., Fayon, M., Baulieu, E.-É., Dromer, C., 2012. Dehydroepiandrosterone (DHEA) improves pulmonary hypertension in chronic obstructive

- pulmonary disease (COPD): a pilot study. *Ann. Endocrinol.* 73, 20–25.
<https://doi.org/10.1016/j.ando.2011.12.005>
- Espiner, E.A., Richards, A.M., Yandle, T.G., Nicholls, M.G., 1995. Natriuretic hormones. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 24, 481–509.
- Fagan, K.A., 2001. Selected Contribution: Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 90, 2502–2507.
<https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.6.2502>
- Falcão-Pires, I., Gonçalves, N., Henriques-Coelho, T., Moreira-Gonçalves, D., Roncon-Albuquerque, R., Leite-Moreira, A.F., 2009. Apelin decreases myocardial injury and improves right ventricular function in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 296, H2007-2014. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00089.2009>
- Fang, J.C., DeMarco, T., Givertz, M.M., Borlaug, B.A., Lewis, G.D., Rame, J.E., Gomberg-Maitland, M., Murali, S., Frantz, R.P., McGlothlin, D., 2012. World Health Organization Pulmonary Hypertension group 2: pulmonary hypertension due to left heart disease in the adult—a summary statement from the Pulmonary Hypertension Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J. Heart Lung Transplant.* 31, 913–933.
- Farber, H.W., Miller, D.P., Poms, A.D., Badesch, D.B., Frost, A.E., Muros-Le Rouzic, E., Romero, A.J., Benton, W.W., Elliott, C.G., McGoon, M.D., Benza, R.L., 2015. Five-Year outcomes of patients enrolled in the REVEAL Registry. *Chest* 148, 1043–1054. <https://doi.org/10.1378/chest.15-0300>
- Farrukh, I.S., Peng, W., Orlinska, U., Hoidal, J.R., 1998. Effect of dehydroepiandrosterone on hypoxic pulmonary vasoconstriction: a Ca(2+)-activated K(+)-channel opener. *Am. J. Physiol.* 274, L186-195. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1998.274.2.L186>
- Fayyaz, A.U., Edwards, W.D., Maleszewski, J.J., Konik, E.A., DuBrock, H.M., Borlaug, B.A., Frantz, R.P., Jenkins, S.M., Redfield, M.M., 2018. Global Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Hypertension Associated With Heart Failure and Preserved or Reduced Ejection Fraction. *Circulation* 137, 1796–1810. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031608>
- Fishman, A.P., 1999. Aminorex to Fen/Phen. *Circulation* 99, 156–161.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.1.156>
- Friström, S., Airaksinen, M.M., Halmekoski, J., 1977. Release of Platelet 5-Hydroxytryptamine by Some Anorexic and Other Sympathomimetics and their Acetyl Derivatives. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)* 41, 218–224. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1977.tb02142.x>
- Fukumoto, Y., Matoba, T., Ito, A., Tanaka, H., Kishi, T., Hayashidani, S., Abe, K., Takeshita, A., Shimokawa, H., 2005. Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. *Heart Br. Card. Soc.* 91, 391–392.
<https://doi.org/10.1136/hrt.2003.029470>
- Gagnadoux, F., Capron, F., Lebeau, B., 2002. Pulmonary veno-occlusive disease after neoadjuvant mitomycin chemotherapy and surgery for lung carcinoma. *Lung Cancer* 36, 213–215.
[https://doi.org/10.1016/S0169-5002\(01\)00479-2](https://doi.org/10.1016/S0169-5002(01)00479-2)
- Gale, D.P., Harten, S.K., Reid, C.D.L., Tuddenham, E.G.D., Maxwell, P.H., 2008. Autosomal dominant erythrocytosis and pulmonary arterial hypertension associated with an activating HIF2 α mutation. *Blood* 112, 919–921. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-153718>
- Galie, N., 2004. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc. Res.* 61, 227–237. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.11.026>
- George, P.M., Badiger, R., Alazawi, W., Foster, G.R., Mitchell, J.A., 2012. Pharmacology and therapeutic potential of interferons. *Pharmacol. Ther.* 135, 44–53.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.03.006>
- Ghofrani, H.-A., Simonneau, G., D'Armini, A.M., Fedullo, P., Howard, L.S., Jaïs, X., Jenkins, D.P., Jing, Z.-C., Madani, M.M., Martin, N., Mayer, E., Papadakis, K., Richard, D., Kim, N.H., MERIT study investigators, 2017. Macitentan for the treatment of inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension (MERIT-1): results from the multicentre, phase 2, randomised,

- double-blind, placebo-controlled study. *Lancet Respir. Med.* 5, 785–794.
[https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30305-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30305-3)
- Ghofrani, H.A., Wiedemann, R., Rose, F., Schermuly, R.T., Olschewski, H., Weissmann, N., Gunther, A., Walmrath, D., Seeger, W., Grimminger, F., 2002. Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 360, 895–900.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11024-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11024-5)
- Giaid, A., Yanagisawa, M., Langleben, D., Michel, R.P., Levy, R., Shennib, H., Kimura, S., Masaki, T., Duguid, W.P., Stewart, D.J., 1993. Expression of Endothelin-1 in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension. *N. Engl. J. Med.* 328, 1732–1739.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199306173282402>
- Girgis, R.E., Li, D., Zhan, X., Garcia, J.G., Tuder, R.M., Hassoun, P.M., Johns, R.A., 2003. Attenuation of chronic hypoxic pulmonary hypertension by simvastatin. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 285, H938–H945.
- Girgis, R.E., Mozammel, S., Champion, H.C., Li, D., Peng, X., Shimoda, L., Tuder, R.M., Johns, R.A., Hassoun, P.M., 2007. Regression of chronic hypoxic pulmonary hypertension by simvastatin. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 292, L1105–1110.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00411.2006>
- Gotway, M.B., Marder, S.R., Hanks, D.K., Leung, J.W.T., Dawn, S.K., Gean, A.D., Reddy, G.P., Araoz, P.A., Webb, W.R., 2002. Thoracic Complications of Illicit Drug Use: An Organ System Approach. *RadioGraphics* 22, S119–S135.
https://doi.org/10.1148/radiographics.22.suppl_1.g02oc01s119
- Greiser, E., 1973. [Epidemiologic studies on the relation between use of appetite depressants and primary vascular pulmonary hypertension]. *Internist* 14, 437–442.
- Group, S.S.S.S., 1994. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *The Lancet* 344, 1383–1389.
- Guerard, P., Rakotoniaina, Z., Goirand, F., Rochette, L., Dumas, M., Lirussi, F., Bardou, M., 2006. The HMG-CoA reductase inhibitor, pravastatin, prevents the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the rat through reduction of endothelial cell apoptosis and overexpression of eNOS. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 373, 401–414.
<https://doi.org/10.1007/s00210-006-0082-1>
- Guignabert, C., Phan, C., Seferian, A., Huertas, A., Tu, L., Thuillet, R., Sattler, C., Hiress, M.L., Tamura, Y., Jutant, E.-M., Chaumais, M.-C., Bouchet, S., Manéglier, B., Molimard, M., Rousselot, P., Sitbon, O., Simonneau, G., Montani, D., Humbert, M., 2016. Dasatinib induces lung vascular toxicity and predisposes to pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.* 126, 3207–3218.
<https://doi.org/10.1172/JCI86249>
- Gurtner, H.P., 1979. Pulmonary hypertension, “plexogenic pulmonary arteriopathy” and the appetite depressant drug aminorex: post or propter? *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* 15, 897–923.
- Gurtner, H.P., Gertsch, M., Salzmann, C., Scherrer, M., Stucki, P., Wyss, F., 1968. [Are the primary vascular forms of chronic pulmonary heart disease becoming more common?]. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 98, 1579–1589 contd.
- Haendeler, J., Hoffmann, J., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., 2004. Antioxidant effects of statins via S-nitrosylation and activation of thioredoxin in endothelial cells: a novel vasculoprotective function of statins. *Circulation* 110, 856–861.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000138743.09012.93>
- Hakim, T.S., Michel, R.P., Chang, H.K., 1982. Partitioning of pulmonary vascular resistance in dogs by arterial and venous occlusion. *J. Appl. Physiol.* 52, 710–715.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1982.52.3.710>
- Hampfl, V., Archer, S.L., Nelson, D.P., Weir, E.K., 1993. Chronic EDRF inhibition and hypoxia: effects on pulmonary circulation and systemic blood pressure. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 75, 1748–1757. <https://doi.org/10.1152/jappl.1993.75.4.1748>
- Hampfl, V., Bíbová, J., Banasová, A., Uhlík, J., Miková, D., Hnilicková, O., Lachmanová, V., Herget, J., 2006. Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic

- pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 290, L11-20.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00023.2005>
- Hampl, V., Bíbová, 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, 567–575.
- Hampl, V., Bibova, J., Ostadalova, I., Povysilova, V., Herget, J., 2003a. Gender differences in the long-term effects of perinatal hypoxia on pulmonary circulation in rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 285, L386-392. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00389.2002>
- Hampl, V., Bíbová, J., Povýsilová, V., Herget, J., 2003b. Dehydroepiandrosterone sulphate reduces chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Eur. Respir. J.* 21, 862–865.
<https://doi.org/10.1183/09031936.03.00084503>
- Hampl, V., Herget, J., 2000. Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol. Rev.* 80, 1337–1372. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1337>
- Hampl, V., Huang, J.M., Weir, E.K., Archer, S.L., 1995. Activation of the cGMP-dependent protein kinase mimics the stimulatory effect of nitric oxide and cGMP on calcium-gated potassium channels. *Physiol. Res.* 44, 39–44.
- Hassoun, P.M., Mouthon, L., Barberà, J.A., Eddahibi, S., Flores, S.C., Grimminger, F., Jones, P.L., Maitland, M.L., Michelakis, E.D., Morrell, N.W., Newman, J.H., Rabinovitch, M., Schermuly, R., Stenmark, K.R., Voelkel, N.F., Yuan, J.X.-J., Humbert, M., 2009. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54, S10–S19.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.04.006>
- Hayashi, F., Tamura, H., Yamada, J., Kasai, H., Suga, T., 1994. Characteristics of the hepatocarcinogenesis caused by dehydroepiandrosterone, a peroxisome proliferator, in male F-344 rats. *Carcinogenesis* 15, 2215–2219. <https://doi.org/10.1093/carcin/15.10.2215>
- Hayashi, T., Esaki, T., Muto, E., Kano, H., Asai, Y., Thakur, N.K., Sumi, D., Jayachandran, M., Iguchi, A., 2000. Dehydroepiandrosterone retards atherosclerosis formation through its conversion to estrogen: the possible role of nitric oxide. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 782–792.
<https://doi.org/10.1161/01.atv.20.3.782>
- Hemnes, A.R., Zaiman, A., Champion, H.C., 2008. PDE5A inhibition attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension through inhibition of ROS generation and RhoA/Rho kinase activation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 294, L24-33.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00245.2007>
- Hennigs, J.K., Cao, A., Li, C.G., Shi, M., Mienert, J., Miyagawa, K., Körbelin, J., Marciano, D.P., Chen, P.-I., Roughley, M., Elliott, M.V., Harper, R.L., Bill, M.A., Chappell, J., Moonen, J.-R., Diebold, I., Wang, L., Snyder, M.P., Rabinovitch, M., 2021. PPAR γ -p53-Mediated Vasculoregenerative Program to Reverse Pulmonary Hypertension. *Circ. Res.* 128, 401–418.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316339>
- Hentschel, T., Yin, N., Riad, A., Habbazettl, H., Weimann, J., Koster, A., Tschöpe, C., Kuppe, H., Kuebler, W.M., 2007. Inhalation of the phosphodiesterase-3 inhibitor milrinone attenuates pulmonary hypertension in a rat model of congestive heart failure. *Anesthesiology* 106, 124–131. <https://doi.org/10.1097/00000542-200701000-00021>
- Herget, J., Chovanec, M., 2010. Isolated perfused murine lung. *Drug Discov. Today Dis. Models* 7, 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2011.03.008>
- Herget, J., Hampl, V., Povýsilová, V., Slavík, Z., 1995. Long-term effects of prenatal indomethacin administration on the pulmonary circulation in rats. *Eur. Respir. J.* 8, 209–215.
<https://doi.org/10.1183/09031936.95.08020209>
- Herget, J., Kuklík, V., 1995. Perinatal lung injury extends in adults the site of hypoxic pulmonary vasoconstriction upstream. *Physiol. Res.* 44, 25–30.
- Herget, J., Novotna, J., Bibova, J., Povysilova, V., Vankova, M., Hampl, V., 2003. Metalloproteinase inhibition by Batimastat attenuates pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 285, L199-208.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00167.2002>

- Herget, J., Palecek, F., 1972. Pulmonary arterial blood pressure in closed chest rats. Changes after catecholamines, histamine and serotonin. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 198, 107–117.
- Herget, J., Wilhelm, J., Novotná, J., Eckhardt, A., Vytásek, R., Mrázková, L., Ostádal, M., 2000. A possible role of the oxidant tissue injury in the development of hypoxic pulmonary hypertension. *Physiol. Res.* 49, 493–501.
- Hervé, P., Launay, J.M., Scrobohaci, M.L., Brenot, F., Simonneau, G., Petitpretz, P., Poubeau, P., Cerrina, J., Duroux, P., Drouet, L., 1995. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am. J. Med.* 99, 249–254. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(99\)80156-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(99)80156-9)
- Hill, N.S., Klinger, J.R., Warburton, R.R., Pietras, L., Wrenn, D.S., 1994. Brain natriuretic peptide: possible role in the modulation of hypoxic pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol.* 266, L308-315. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1994.266.3.L308>
- Homma, N., Nagaoka, T., Karoor, V., Imamura, M., Taraseviciene-Stewart, L., Walker, L.A., Fagan, K.A., McMurtry, I.F., Oka, M., 2008. Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in protection against monocrotaline-induced pulmonary hypertension in pneumonectomized rats by dehydroepiandrosterone. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 295, L71-78. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90251.2008>
- Horton, J.D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109, 1125–1131.
- Huertas, A., Girerd, B., Dorfmueller, P., O’Callaghan, D., Humbert, M., Montani, D., 2011. Pulmonary veno-occlusive disease: advances in clinical management and treatments. *Expert Rev. Respir. Med.* 5, 217–231. <https://doi.org/10.1586/ers.11.15>
- Humbert, M., Kovacs, G., Hoeper, M.M., Badagliacca, R., Berger, R.M.F., Brida, M., Carlsen, J., Coats, A.J.S., Escribano-Subias, P., Ferrari, P., Ferreira, D.S., Ghofrani, H.A., Giannakoulas, G., Kiely, D.G., Mayer, E., Meszaros, G., Nagavci, B., Olsson, K.M., Pepke-Zaba, J., Quint, J.K., Rådegran, G., Simonneau, G., Sitbon, O., Tonia, T., Toshner, M., Vachiery, J.-L., Noordegraaf, A.V., Delcroix, M., Rosenkranz, S., Group, the E.S.D., 2022. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* <https://doi.org/10.1183/13993003.00879-2022>
- Humbert, M., Sitbon, O., Simonneau, G., 2004. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* 351, 1425–1436. <https://doi.org/10.1056/NEJMra040291>
- Hunt, J.M., Bethea, B., Liu, X., Gandjeva, A., Mammen, P.P.A., Stacher, E., Gandjeva, M.R., Parish, E., Perez, M., Smith, L., Graham, B.B., Kuebler, W.M., Tuder, R.M., 2013. Pulmonary veins in the normal lung and pulmonary hypertension due to left heart disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 305, L725-736. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00186.2013>
- Iruthayanathan, M., O’Leary, B., Paul, G., Dillon, J.S., 2011. Hydrogen peroxide signaling mediates DHEA-induced vascular endothelial cell proliferation. *Steroids* 76, 1483–1490. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.08.002>
- Ishikura, K., Yamada, N., Ito, M., Ota, S., Nakamura, M., Isaka, N., Nakano, T., 2006. Beneficial acute effects of rho-kinase inhibitor in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 70, 174–178. <https://doi.org/10.1253/circj.70.174>
- Iwasaki, Y., Asai, M., Yoshida, M., Nigawara, T., Kambayashi, M., Nakashima, N., 2004. Dehydroepiandrosterone-sulfate inhibits nuclear factor-kappaB-dependent transcription in hepatocytes, possibly through antioxidant effect. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 3449–3454. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031441>
- Jaffe, A.B., Hall, A., 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 247–269. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721>
- Jakoubek, V., Hampl, V., 2018. Alcohol and fetoplacental vasoconstrictor reactivity. *Physiol. Res.* 67, 509–513. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933609>
- Jasińska-Stroschein, M., Owczarek, J., Wesołowska, A., Orszulak-Michalak, D., 2014. Rosuvastatin, sildenafil and their combination in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rat. *Acta Pharm. Zagreb Croat.* 64, 345–353. <https://doi.org/10.2478/acph-2014-0029>

- Jasmin, J.-F., Calderone, A., Leung, T.-K., Villeneuve, L., Dupuis, J., 2003. Lung structural remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: complete reversal with irbesartan. *Cardiovasc. Res.* 58, 621–631. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(03\)00290-6](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(03)00290-6)
- Jasmin, J.-F., Mercier, I., Hnasko, R., Cheung, M.W.-C., Tanowitz, H.B., Dupuis, J., Lisanti, M.P., 2004. Lung remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: pathogenic role of reduced caveolin expression. *Cardiovasc. Res.* 63, 747–755. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.05.018>
- Jenkins, R.G., Moore, B.B., Chambers, R.C., Eickelberg, O., Königshoff, M., Kolb, M., Laurent, G.J., Nanthakumar, C.B., Olman, M.A., Pardo, A., Selman, M., Sheppard, D., Sime, P.J., Tager, A.M., Tatler, A.L., Thannickal, V.J., White, E.S., ATS Assembly on Respiratory Cell and Molecular Biology, 2017. An Official American Thoracic Society Workshop Report: Use of Animal Models for the Preclinical Assessment of Potential Therapies for Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 56, 667–679. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0096ST>
- Jernigan, N.L., Naik, J.S., Resta, T.C., 2021. Acid-sensing ion channel 1 contributes to pulmonary arterial smooth muscle cell depolarization following hypoxic pulmonary hypertension. *J. Physiol.* 599, 4749–4762. <https://doi.org/10.1113/JP282231>
- Jin, H., Yang, R.H., Chen, Y.F., Jackson, R.M., Oparil, S., 1990. Atrial natriuretic peptide attenuates the development of pulmonary hypertension in rats adapted to chronic hypoxia. *J. Clin. Invest.* 85, 115–120. <https://doi.org/10.1172/JCI114400>
- Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC), European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), Vahanian, A., Alfieri, O., Andreotti, F., Antunes, M.J., Barón-Esquivias, G., Baumgartner, H., Borger, M.A., Carrel, T.P., De Bonis, M., Evangelista, A., Falk, V., Jung, B., Lancellotti, P., Pierard, L., Price, S., Schäfers, H.-J., Schuler, G., Stepinska, J., Swedberg, K., Takkenberg, J., Von Oppell, U.O., Windecker, S., Zamorano, J.L., Zembala, M., 2012. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012). *Eur. Heart J.* 33, 2451–2496. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs109>
- Jones, S.A., O'Donnell, V.B., Wood, J.D., Broughton, J.P., Hughes, E.J., Jones, O.T., 1996. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 271, H1626–H1634.
- Joshi, S., Sedivy, V., Hodyc, D., Herget, J., Gurney, A.M., 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. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.147785>
- Kerem, A., Yin, J., Kaestle, S.M., Hoffmann, J., Schoene, A.M., Singh, B., Kuppe, H., Borst, M.M., Kuebler, W.M., 2010. Lung endothelial dysfunction in congestive heart failure: role of impaired Ca²⁺ signaling and cytoskeletal reorganization. *Circ. Res.* 106, 1103–1116. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.210542>
- Khemasuwan, D., Divietro, M.L., Tangdhanakanond, K., Pomerantz, S.C., Eiger, G., 2010. Statins decrease the occurrence of venous thromboembolism in patients with cancer. *Am. J. Med.* 123, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2009.05.025>
- Khush, K.K., Tasissa, G., Butler, J., McGlothlin, D., De Marco, T., Investigators, E., 2009. Effect of pulmonary hypertension on clinical outcomes in advanced heart failure: analysis of the Evaluation Study of Congestive Heart Failure and Pulmonary Artery Catheterization Effectiveness (ESCAPE) database. *Am. Heart J.* 157, 1026–1034.
- Kieler, H., Artama, M., Engeland, A., Ericsson, Ö., Furu, K., Gissler, M., Nielsen, R.B., Nørgaard, M., Stephansson, O., Valdimarsdottir, U., Zoega, H., Haglund, B., 2012. Selective serotonin reuptake inhibitors during pregnancy and risk of persistent pulmonary hypertension in the newborn: population based cohort study from the five Nordic countries. *BMJ* 344, d8012. <https://doi.org/10.1136/bmj.d8012>
- Kim, J., 2014. Apelin-APJ signaling: a potential therapeutic target for pulmonary arterial hypertension. *Mol. Cells* 37, 196–201. <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.2308>
- Klinger, J.R., Petit, R.D., Warburton, R.R., Wrenn, D.S., Arnal, F., Hill, N.S., 1993. Neutral endopeptidase inhibition attenuates development of hypoxic pulmonary hypertension in

- rats. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 75, 1615–1623.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1993.75.4.1615>
- Klinger, J.R., Warburton, R.R., Pietras, L., Hill, N.S., 1998. Brain natriuretic peptide inhibits hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J. Appl. Physiol.* 84, 1646–1652.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1998.84.5.1646>
- Kopeć, G., Waligóra, M., Tyrka, A., Jonas, K., Pencina, M.J., Zdrojewski, T., Moertl, D., Stokwiszewski, J., Zagożdżon, P., Podolec, P., 2017. Low-density lipoprotein cholesterol and survival in pulmonary arterial hypertension. *Sci. Rep.* 7, 41650. <https://doi.org/10.1038/srep41650>
- Kovacs, G., Avian, A., Tscherner, M., Foris, V., Bachmaier, G., Olschewski, A., Olschewski, H., 2014. Characterization of Patients With Borderline Pulmonary Arterial Pressure. *Chest* 146, 1486–1493. <https://doi.org/10.1378/chest.14-0194>
- Kovacs, G., Berghold, A., Scheidl, S., Olschewski, H., 2009. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur. Respir. J.* 34, 888–894.
<https://doi.org/10.1183/09031936.00145608>
- Krick, S., Platoshyn, O., McDaniel, S.S., Rubin, L.J., Yuan, J.X.-J., 2001. Augmented K⁺ currents and mitochondrial membrane depolarization in pulmonary artery myocyte apoptosis. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 281, L887–L894.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.281.4.L887>
- Kuang, T., Wang, J., Pang, B., Huang, X., Burg, E.D., Yuan, J.X.-J., Wang, C., 2010. Combination of sildenafil and simvastatin ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 23, 456–464. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2010.02.003>
- Kuba, K., Imai, Y., Penninger, J.M., 2006. Angiotensin-converting enzyme 2 in lung diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 271–276. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.03.001>
- Kuntz, M., Leiva-Juarez, M.M., Luthra, S., 2016. Systematic review of randomized controlled trials of endothelin receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension. *Lung* 194, 723–732.
- Kureishi, Y., Luo, Z., Shiojima, I., Bialik, A., Fulton, D., Lefer, D.J., Sessa, W.C., Walsh, K., 2000. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat. Med.* 6, 1004–1010.
- Labrie, F., Luu-The, V., Labrie, C., Simard, J., 2001. DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front. Neuroendocrinol.* 22, 185–212.
<https://doi.org/10.1006/frne.2001.0216>
- Laburthe, M., Couvineau, A., Marie, J.C., 2002. VPAC receptors for VIP and PACAP. *Receptors Channels* 8, 137–153.
- Lachmanová, V., Hnilicková, O., Povýsilová, V., Hampl, V., Herget, J., 2005. N-acetylcysteine inhibits hypoxic pulmonary hypertension most effectively in the initial phase of chronic hypoxia. *Life Sci.* 77, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.11.027>
- Lai, Y.-C., Tabima, D.M., Dube, J.J., Hughan, K.S., Vanderpool, R.R., Goncharov, D.A., St Croix, C.M., Garcia-Ocaña, A., Goncharova, E.A., Tofovic, S.P., Mora, A.L., Gladwin, M.T., 2016. SIRT3-AMP-Activated Protein Kinase Activation by Nitrite and Metformin Improves Hyperglycemia and Normalizes Pulmonary Hypertension Associated With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation* 133, 717–731.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018935>
- Lai, Y.L., Wu, H.D., Chen, C.F., 1998. Antioxidants attenuate chronic hypoxic pulmonary hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 32, 714–720. <https://doi.org/10.1097/00005344-199811000-00006>
- Lam, C.S.P., Roger, V.L., Rodeheffer, R.J., Borlaug, B.A., Enders, F.T., Redfield, M.M., 2009. Pulmonary hypertension in heart failure with preserved ejection fraction: a community-based study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 53, 1119–1126. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.11.051>
- Lambert, M., Mendes-Ferreira, P., Ghigna, M.-R., LeRibeuz, H., Adão, R., Boet, A., Capuano, V., Rucker-Martin, C., Brás-Silva, C., Quarck, R., Domergue, V., Vachiéry, J.-L., Humbert, M., Perros, F., Montani, D., Antigny, F., 2021. Kcnk3 dysfunction exaggerates the development of pulmonary hypertension induced by left ventricular pressure overload. *Cardiovasc. Res.* 117, 2474–2488. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab016>

- Landmesser, U., Bahlmann, F., Mueller, M., Spiekermann, S., Kirchhoff, N., Schulz, S., Manes, C., Fischer, D., de Groot, K., Fliser, D., 2005. Simvastatin versus ezetimibe: pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans. *Circulation* 111, 2356–2363.
- Laudi, S., Trump, S., Schmitz, V., West, J., McMurtry, I.F., Mutlak, H., Christians, U., Weimann, J., Kaisers, U., Steudel, W., 2007. Serotonin transporter protein in pulmonary hypertensive rats treated with atorvastatin. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 293, L630–638. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00110.2006>
- Laufs, U., La Fata, V., Liao, J.K., 1997. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 272, 31725–31729.
- Lee, J.-H., Lee, D.-S., Kim, E.-K., Choe, K.-H., Oh, Y.-M., Shim, T.-S., Kim, S.-E., Lee, Y.-S., Lee, S.-D., 2005. Simvastatin inhibits cigarette smoking-induced emphysema and pulmonary hypertension in rat lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 987–993. <https://doi.org/10.1164/rccm.200501-0410C>
- Li, F., Xia, W., Li, A., Zhao, C., Sun, R., 2007. Long-term inhibition of Rho kinase with fasudil attenuates high flow induced pulmonary artery remodeling in rats. *Pharmacol. Res.* 55, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2006.10.009>
- Li, J.-M., Shah, A.M., 2001. Differential NADPH-versus NADH-dependent superoxide production by phagocyte-type endothelial cell NADPH oxidase. *Cardiovasc. Res.* 52, 477–486.
- Liao, J.K., Laufs, U., 2005. Pleiotropic effects of statins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 89.
- Linehan, J.H., Dawson, C.A., 1983. A three-compartment model of the pulmonary vasculature: effects of vasoconstriction. *J. Appl. Physiol.* 55, 923–928. <https://doi.org/10.1152/jappl.1983.55.3.923>
- Liu, D., Dillon, J.S., 2002. Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3). *J. Biol. Chem.* 277, 21379–21388. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200491200>
- Liu, P.-Y., Liu, Y.-W., Lin, L.-J., Chen, J.-H., Liao, J.K., 2009. Evidence for statin pleiotropy in humans: differential effects of statins and ezetimibe on rho-associated coiled-coil containing protein kinase activity, endothelial function, and inflammation. *Circulation* 119, 131–138.
- Liu, Y., Tian, H.Y., Yan, X.L., Fan, F.L., Wang, W.P., Han, J.L., Zhang, J.-B., Ma, Q., Meng, Y., Wei, F., 2013. Serotonin inhibits apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cell by pERK1/2 and PDK through 5-HT1B receptors and 5-HT transporters. *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* 22, 451–457. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2013.03.003>
- Long, L., Ormiston, M.L., Yang, X., Southwood, M., Gräf, S., Machado, R.D., Mueller, M., Kinzel, B., Yung, L.M., Wilkinson, J.M., Moore, S.D., Drake, K.M., Aldred, M.A., Yu, P.B., Upton, P.D., Morrell, N.W., 2015. Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension. *Nat. Med.* 21, 777–785. <https://doi.org/10.1038/nm.3877>
- Lu, Y., Chang, R., Yao, J., Xu, X., Teng, Y., Cheng, N., 2019. Effectiveness of long-term using statins in COPD – a network meta-analysis. *Respir. Res.* 20, 17. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-0984-3>
- Manabe, S., Okura, T., Watanabe, S., Fukuoka, T., Higaki, J., 2005. Effects of angiotensin II receptor blockade with valsartan on pro-inflammatory cytokines in patients with essential hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 46, 735–739. <https://doi.org/10.1097/01.fjc.0000185783.00391.60>
- Maron, B.A., Hess, E., Maddox, T.M., Opatowsky, A.R., Tedford, R.J., Lahm, T., Joynt, K.E., Kass, D.J., Stephens, T., Stanislawski, M.A., Swenson, E.R., Goldstein, R.H., Leopold, J.A., Zamanian, R.T., Elwing, J.M., Plomondon, M.E., Grunwald, G.K., Barón, A.E., Rumsfeld, J.S., Choudhary, G., 2016. Association of Borderline Pulmonary Hypertension With Mortality and Hospitalization in a Large Patient Cohort: Insights From the Veterans Affairs Clinical Assessment, Reporting, and Tracking Program. *Circulation* 133, 1240–1248. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020207>

- Martín, F., Artigas, F., 1992. Simultaneous Effects of p-Chloroamphetamine, d-Fenfluramine, and Reserpine on Free and Stored 5-Hydroxytryptamine in Brain and Blood. *J. Neurochem.* 59, 1138–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb08356.x>
- Mastrocola, R., Aragno, M., Betteto, S., Brignardello, E., Catalano, M.G., Danni, O., Boccuzzi, G., 2003. Pro-oxidant effect of dehydroepiandrosterone in rats is mediated by PPAR activation. *Life Sci.* 73, 289–299. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00287-x](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00287-x)
- Matthes, S., Bader, M., 2018. Peripheral Serotonin Synthesis as a New Drug Target. *Trends Pharmacol. Sci.* 39, 560–572. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.03.004>
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.-W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., Ratcliffe, P.J., 1999. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271–275. <https://doi.org/10.1038/20459>
- McMurray, J.J.V., Packer, M., Desai, A.S., Gong, J., Lefkowitz, M.P., Rizkala, A.R., Rouleau, J.L., Shi, V.C., Solomon, S.D., Swedberg, K., Zile, M.R., PARADIGM-HF Investigators and Committees, 2014. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N. Engl. J. Med.* 371, 993–1004. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409077>
- McMurtry, I.F., 1976. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by calcium antagonists in isolated rat lungs. [WWW Document]. <https://doi.org/10.1161/01.RES.38.2.99>
- McMurtry, M.S., Bonnet, Sebastien, Michelakis, E.D., Bonnet, Sandra, Haromy, A., Archer, S.L., 2007. Statin therapy, alone or with rapamycin, does not reverse monocrotaline pulmonary arterial hypertension: the rapamycin-atorvastatin-simvastatin study. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 293, L933-940. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00310.2006>
- McNeish, A.J., Jimenez-Altayo, F., Cottrell, G.S., Garland, C.J., 2012. Statins and selective inhibition of Rho kinase protect small conductance calcium-activated potassium channel function (K(Ca)_{2.3}) in cerebral arteries. *PLoS One* 7, e46735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046735>
- Michaels, A.D., Chatterjee, K., De Marco, T., 2005. Effects of intravenous nesiritide on pulmonary vascular hemodynamics in pulmonary hypertension. *J. Card. Fail.* 11, 425–431. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2005.01.009>
- Michelakis, E., Rebecka, I., Bateson, J., Olley, P., Puttagunta, L., Archer, S., 2000. Voltage-gated potassium channels in human ductus arteriosus. *Lancet Lond. Engl.* 356, 134–137. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02452-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02452-1)
- Montani, D., Lau, E.M., Dorfmüller, P., Girerd, B., Jaïs, X., Savale, L., Perros, F., Nossent, E., Garcia, G., Parent, F., Fadel, E., Soubrier, F., Sitbon, O., Simonneau, G., Humbert, M., 2016. Pulmonary veno-occlusive disease. *Eur. Respir. J.* 47, 1518–1534. <https://doi.org/10.1183/13993003.00026-2016>
- Montani, D., Savale, L., Natali, D., Jais, X., Herve, P., Garcia, G., Humbert, M., Simonneau, G., Sitbon, O., 2010. Long-term response to calcium-channel blockers in non-idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur. Heart J.* 31, 1898–1907. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq170>
- Montecucco, F., Burger, F., Pelli, G., Poku, N.K., Berlier, C., Steffens, S., Mach, F., 2009. Statins inhibit C-reactive protein-induced chemokine secretion, ICAM-1 upregulation and chemotaxis in adherent human monocytes. *Rheumatology* 48, 233–242.
- Morecroft, I., Dempsie, Y., Bader, M., Walther, D.J., Kotnik, K., Loughlin, L., Nilsen, M., MacLean, M.R., 2007. Effect of tryptophan hydroxylase 1 deficiency on the development of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 49, 232–236. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000252210.58849.78>
- Morecroft, I., Heeley, R.P., Prentice, H.M., Kirk, A., MacLean, M.R., 1999. 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT_{1B} receptor. *Br. J. Pharmacol.* 128, 730–734. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702841>
- Morecroft, I., Loughlin, L., Nilsen, M., Colston, J., Dempsie, Y., Sheward, J., Harmar, A., MacLean, M.R., 2005. Functional interactions between 5-hydroxytryptamine receptors and the

- serotonin transporter in pulmonary arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313, 539–548.
<https://doi.org/10.1124/jpet.104.081182>
- Morrell, N.W., Atochina, E.N., Morris, K.G., Danilov, S.M., Stenmark, K.R., 1995. Angiotensin converting enzyme expression is increased in small pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.* 96, 1823–1833.
<https://doi.org/10.1172/JCI118228>
- Morrell, N.W., Higham, M.A., Phillips, P.G., Shakur, B.H., Robinson, P.J., Beddoes, R.J., 2005. Pilot study of losartan for pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Res.* 6, 88. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-88>
- Murata, T., Kinoshita, K., Hori, M., Kuwahara, M., Tsubone, H., Karaki, H., Ozaki, H., 2005. Statin Protects Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2335–2342.
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000186184.33537.48>
- Nagaya, N., Nishikimi, T., Okano, Y., Uematsu, M., Satoh, T., Kyotani, S., Kuribayashi, S., Hamada, S., Kakishita, M., Nakanishi, N., Takamiya, M., Kunieda, T., Matsuo, H., Kangawa, K., 1998. Plasma brain natriuretic peptide levels increase in proportion to the extent of right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 31, 202–208.
[https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(97\)00452-x](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(97)00452-x)
- Nathan, S.D., Behr, J., Collard, H.R., Cottin, V., Hoepfer, M.M., Martinez, F.J., Corte, T.J., Keogh, A.M., Leuchte, H., Mogulkoc, N., Ulrich, S., Wuyts, W.A., Yao, Z., Boateng, F., Wells, A.U., 2019. Riociguat for idiopathic interstitial pneumonia-associated pulmonary hypertension (RISE-IIP): a randomised, placebo-controlled phase 2b study. *Lancet Respir. Med.* 7, 780–790.
[https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30250-4](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30250-4)
- Nisbet, R.E., Graves, A.S., Kleinhenz, D.J., Rupnow, H.L., Reed, A.L., Fan, T.-H.M., Mitchell, P.O., Sutliff, R.L., Hart, C.M., 2009. The role of NADPH oxidase in chronic intermittent hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40, 601–609.
<https://doi.org/10.1165/2008-0145OC>
- Nishimura, T., Faul, J.L., Berry, G.J., Vaszar, L.T., Qiu, D., Pearl, R.G., Kao, P.N., 2002. Simvastatin attenuates smooth muscle neointimal proliferation and pulmonary hypertension in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 1403–1408.
- Nishimura, T., Vaszar, L.T., Faul, J.L., Zhao, G., Berry, G.J., Shi, L., Qiu, D., Benson, G., Pearl, R.G., Kao, P.N., 2003. Simvastatin Rescues Rats From Fatal Pulmonary Hypertension by Inducing Apoptosis of Neointimal Smooth Muscle Cells. *Circulation* 108, 1640–1645.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000087592.47401.37>
- Ochi, R., Chettimada, S., Kizub, I., Gupte, S.A., 2018. Dehydroepiandrosterone inhibits I_{Ca,L} and its window current in voltage-dependent and -independent mechanisms in arterial smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 315, H1602–H1613.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00291.2018>
- Oka, M., Fagan, K.A., Jones, P.L., McMurry, I.F., 2008. Therapeutic potential of RhoA/Rho kinase inhibitors in pulmonary hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 155, 444–454.
<https://doi.org/10.1038/bjp.2008.239>
- Oka, M., Karoor, V., Homma, N., Nagaoka, T., Sakao, E., Golembeski, S., Limbird, J., Imamura, M., Gebb, S., Fagan, K., 2007. Dehydroepiandrosterone upregulates soluble guanylate cyclase and inhibits hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc. Res.* 74, 377–387.
<https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.01.021>
- Okada, M., Harada, T., Kikuzuki, R., Yamawaki, H., Hara, Y., 2009. Effects of telmisartan on right ventricular remodeling induced by monocrotaline in rats. *J. Pharmacol. Sci.* 111, 193–200.
<https://doi.org/10.1254/jphs.09112fp>
- Olschewski, A., Hong, Z., Nelson, D.P., Weir, E.K., 2002. Graded response of K⁺ current, membrane potential, and [Ca²⁺]_i to hypoxia in pulmonary arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 283, L1143–L1150. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00104.2002>

- Olschewski, H., Ghofrani, H.A., Walrath, D., Schermuly, R., Temmesfeld-Wollbrück, B., Grimminger, F., Seeger, W., 1999. Inhaled prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension secondary to lung fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 600–607. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.2.9810008>
- Orte, C., Polak, J.M., Haworth, S.G., Yacoub, M.H., Morrell, N.W., 2000. Expression of pulmonary vascular angiotensin-converting enzyme in primary and secondary plexiform pulmonary hypertension. *J. Pathol.* 192, 379–384. [https://doi.org/10.1002/1096-9896\(2000\)9999:9999<::AID-PATH715>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH715>3.0.CO;2-Q)
- Oudiz, R.J., 2007. Pulmonary Hypertension Associated with Left-Sided Heart Disease. *Clin. Chest Med., Pulmonary Arterial Hypertension* 28, 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2006.12.001>
- Park, H.S., Chun, J.N., Jung, H.Y., Choi, C., Bae, Y.S., 2006. Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 72, 447–455.
- Pascale, R.M., Simile, M.M., De Miglio, M.R., Nufri, A., Seddaiu, M.A., Muroli, M.R., Danni, O., Rao, K.N., Feo, F., 1995. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity and gene expression by dehydroepiandrosterone in preneoplastic liver nodules. *Carcinogenesis* 16, 1537–1542. <https://doi.org/10.1093/carcin/16.7.1537>
- Peacock, A.J., Murphy, N.F., McMurray, J.J.V., Caballero, L., Stewart, S., 2007. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* 30, 104–109.
- Pei, Y., Ma, P., Wang, X., Zhang, W., Zhang, X., Zheng, P., Yan, L., Xu, Q., Dai, G., 2011. Rosuvastatin attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension via regulation of Akt/eNOS signaling and asymmetric dimethylarginine metabolism. *Eur. J. Pharmacol.* 666, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.05.035>
- Pendyala, S., Usatyuk, P.V., Gorshkova, I.A., Garcia, J.G., Natarajan, V., 2009. Regulation of NADPH oxidase in vascular endothelium: the role of phospholipases, protein kinases, and cytoskeletal proteins. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 841–860.
- Peng, W., Hoidal, J.R., Farrukh, I.S., 1999. Role of a novel KCa opener in regulating K⁺ channels of hypoxic human pulmonary vascular cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20, 737–745. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.20.4.3390>
- Peng, W., Hoidal, J.R., Karwande, S.V., Farrukh, I.S., 1997. Effect of chronic hypoxia on K⁺ channels: regulation in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 272, C1271–1278. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.272.4.C1271>
- Pengo, V., Lensing, A.W.A., Prins, M.H., Marchiori, A., Davidson, B.L., Tiozzo, F., Albanese, P., Biasiolo, A., Pegoraro, C., Iliceto, S., Prandoni, P., 2004. Incidence of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension after Pulmonary Embolism. *N. Engl. J. Med.* 350, 2257–2264. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032274>
- Pepke-Zaba, J., Delcroix, M., Lang, I., Mayer, E., Jansa, P., Ambroz, D., Treacy, C., D’Armini, A.M., Morsolini, M., Snijder, R., Bresser, P., Torbicki, A., Kristensen, B., Lewczuk, J., Simkova, I., Barberà, J.A., de Perrot, M., Hoepfer, M.M., Gaine, S., Speich, R., Gomez-Sanchez, M.A., Kovacs, G., Hamid, A.M., Jaïs, X., Simonneau, G., 2011. Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension (CTEPH): Results From an International Prospective Registry. *Circulation* 124, 1973–1981. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.015008>
- Pereda, D., García-Alvarez, A., Sánchez-Quintana, D., Nuño, M., Fernández-Friera, L., Fernández-Jiménez, R., García-Ruiz, J.M., Sandoval, E., Agüero, J., Castellá, M., Hajjar, R.J., Fuster, V., Ibáñez, B., 2014. Swine model of chronic postcapillary pulmonary hypertension with right ventricular remodeling: long-term characterization by cardiac catheterization, magnetic resonance, and pathology. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 7, 494–506. <https://doi.org/10.1007/s12265-014-9564-6>
- Pinder, A.G., Rogers, S.C., Khalatbari, A., Ingram, T.E., James, P.E., 2008. The measurement of nitric oxide and its metabolites in biological samples by ozone-based chemiluminescence. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 476, 11–28. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-129-1_2

- Pitt, B.R., Weng, W., Steve, A.R., Blakely, R.D., Reynolds, I., Davies, P., 1994. Serotonin increases DNA synthesis in rat proximal and distal pulmonary vascular smooth muscle cells in culture. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 266, L178–L186.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.1994.266.2.L178>
- Platoshyn, O., Golovina, V.A., Bailey, C.L., Limsuwan, A., Krick, S., Juhaszova, M., Seiden, J.E., Rubin, L.J., Yuan, J.X., 2000. Sustained membrane depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, C1540-1549.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.5.C1540>
- Pullamsetti, S.S., Mamazhakypov, A., Weissmann, N., Seeger, W., Savai, R., 2020. Hypoxia-inducible factor signaling in pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.* 130, 5638–5651.
<https://doi.org/10.1172/JCI137558>
- Qaradakh, T., Gadaneq, L.K., McSweeney, K.R., Tacey, A., Apostolopoulos, V., Levinger, I., Rimarova, K., Egom, E.E., Rodrigo, L., Kruzliak, P., Kubatka, P., Zulli, A., 2020. The potential actions of angiotensin-converting enzyme II (ACE2) activator diminazene aceturate (DIZE) in various diseases. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 47, 751–758. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13251>
- Quist-Paulsen, P., 2010. Statins and inflammation: an update. *Curr. Opin. Cardiol.* 25, 399–405.
- Rabacal, W., Schweitzer, F., Rayens, E., Tarantelli, R., Whang, P., Jimenez, V.C., Outwater, J.A., Norris, K.A., 2019. Statin treatment prevents the development of pulmonary arterial hypertension in a nonhuman primate model of HIV-associated PAH. *Sci. Rep.* 9, 19832.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-55301-9>
- Rabinovitch, M., 2012. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Invest.* 122, 4306–4313. <https://doi.org/10.1172/JCI60658>
- Rabinovitch, M., Guignabert, C., Humbert, M., Nicolls, M.R., 2014. Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Circ. Res.* 115, 165–175.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301141>
- Raghu, G., Behr, J., Brown, K.K., Egan, J.J., Kawut, S.M., Flaherty, K.R., Martinez, F.J., Nathan, S.D., Wells, A.U., Collard, H.R., Costabel, U., Richeldi, L., de Andrade, J., Khalil, N., Morrison, L.D., Lederer, D.J., Shao, L., Li, X., Pedersen, P.S., Montgomery, A.B., Chien, J.W., O’Riordan, T.G., ARTEMIS-IPF Investigators*, 2013. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with ambrisentan: a parallel, randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 158, 641–649.
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-158-9-201305070-00003>
- Ragonese, M., Racioppi, M., Bassi, P.F., Di Gianfrancesco, L., Lenci, N., Filianoti, A., Recupero, S.M., 2016. Mitomycin C: New Strategies to Improve Efficacy of a Well-Known Therapy. *Urol. J.* 83, 24–28. <https://doi.org/10.5301/uro.5000193>
- Rakotoniaina, Z., Guerard, P., Lirussi, F., Goirand, F., Rochette, L., Dumas, M., Bardou, M., 2006. The protective effect of HMG-CoA reductase inhibitors against monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the rat might not be a class effect: comparison of pravastatin and atorvastatin. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 374, 195–206.
<https://doi.org/10.1007/s00210-006-0112-z>
- Ranchoux, B., Nadeau, V., Bourgeois, A., Provencher, S., Tremblay, É., Omura, J., Coté, N., Abu-Alhayja’a, R., Dumais, V., Nachbar, R.T., Tastet, L., Dahou, A., Breuils-Bonnet, S., Marette, A., Pibarot, P., Dupuis, J., Paulin, R., Boucherat, O., Archer, S.L., Bonnet, S., Potus, F., 2019. Metabolic Syndrome Exacerbates Pulmonary Hypertension due to Left Heart Disease. *Circ. Res.* 125, 449–466. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.314555>
- Reeve, H.L., Michelakis, E., Nelson, D.P., Weir, E.K., Archer, S.L., 2001. Alterations in a redox oxygen sensing mechanism in chronic hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 90, 2249–2256.
<https://doi.org/10.1152/jap.2001.90.6.2249>
- Reynolds, A.M., Xia, W., Holmes, M.D., Hodge, S.J., Danilov, S., Curiel, D.T., Morrell, N.W., Reynolds, P.N., 2007. Bone morphogenetic protein type 2 receptor gene therapy attenuates hypoxic pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 292, L1182-1192.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00020.2006>

- Rich, S., Kaufmann, E., Levy, P.S., 1992. The Effect of High Doses of Calcium-Channel Blockers on Survival in Primary Pulmonary Hypertension. *N. Engl. J. Med.* 327, 76–81. <https://doi.org/10.1056/NEJM199207093270203>
- Ridker, P.M., Danielson, E., Rifai, N., Glynn, R.J., Val-MARC Investigators, 2006. Valsartan, blood pressure reduction, and C-reactive protein: primary report of the Val-MARC trial. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 48, 73–79. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000226046.58883.32>
- Riento, K., Ridley, A.J., 2003. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 446–456. <https://doi.org/10.1038/nrm1128>
- Robertson, T.P., Aaronson, P.I., Ward, J.P.T., 2003. Ca²⁺ sensitization during sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction is endothelium dependent. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 284, L1121-1126. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00422.2002>
- Robertson, T.P., Dipp, M., Ward, J.P., Aaronson, P.I., Evans, A.M., 2000. Inhibition of sustained hypoxic vasoconstriction by Y-27632 in isolated intrapulmonary arteries and perfused lung of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 131, 5–9. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703537>
- Rockman, H.A., Ross, R.S., Harris, A.N., Knowlton, K.U., Steinhilber, M.E., Field, L.J., Ross, J., Chien, K.R., 1991. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 8277–8281. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.18.8277>
- Rom, W.N., Harkin, T., 1991. Dehydroepiandrosterone inhibits the spontaneous release of superoxide radical by alveolar macrophages in vitro in asbestosis. *Environ. Res.* 55, 145–156. [https://doi.org/10.1016/s0013-9351\(05\)80171-9](https://doi.org/10.1016/s0013-9351(05)80171-9)
- Rondelet, B., Kerbaul, F., Van Beneden, R., Hubloue, I., Huez, S., Fesler, P., Remmelink, M., Brimiouille, S., Salmon, I., Naeije, R., 2005. Prevention of pulmonary vascular remodeling and of decreased BMPR-2 expression by losartan therapy in shunt-induced pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, H2319-2324. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00518.2005>
- Rothman, R.B., Cadet, J.L., Dersch, C.M., McCoy, M.T., Lehrmann, E., Becker, K.G., Bader, M., Alenina, N., Baumann, M.H., 2011. Altered gene expression in pulmonary tissue of tryptophan hydroxylase-1 knockout mice: implications for pulmonary arterial hypertension. *PloS One* 6, e17735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017735>
- Rubin, L.J., Nicod, P., Hillis, L.D., Firth, B.G., 1983. Treatment of primary pulmonary hypertension with nifedipine. A hemodynamic and scintigraphic evaluation. *Ann. Intern. Med.* 99, 433–438. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-99-4-433>
- Ruffenach, G., Umar, S., Vaillancourt, M., Hong, J., Cao, N., Sarji, S., Moazeni, S., Cunningham, C.M., Ardehali, A., Reddy, S.T., Saggari, R., Fishbein, G., Eghbali, M., 2019. Histological hallmarks and role of Slug/PIP axis in pulmonary hypertension secondary to pulmonary fibrosis. *EMBO Mol. Med.* 11, e10061. <https://doi.org/10.15252/emmm.201810061>
- Rysz-Górzynska, M., n.d. Efficacy of Statin Therapy in Pulmonary Arterial Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci. Rep.* 10.
- Rysz-Górzynska, M., Gluba-Brzózka, A., Sahebkar, A., Serban, M.-C., Mikhailidis, D.P., Ursoniu, S., Toth, P.P., Bittner, V., Watts, G.F., Lip, G.Y.H., Rysz, J., Catapano, A.L., Banach, M., 2016. Efficacy of Statin Therapy in Pulmonary Arterial Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci. Rep.* 6, 30060. <https://doi.org/10.1038/srep30060>
- Said, S.I., Hamidi, S.A., Dickman, K.G., Szema, A.M., Lyubsky, S., Lin, R.Z., Jiang, Y.-P., Chen, J.J., Waschek, J.A., Kort, S., 2007. Moderate pulmonary arterial hypertension in male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene. *Circulation* 115, 1260–1268. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.681718>
- Satoh, M., Satoh, A., 2009. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-COA reductase inhibitors and phosphodiesterase type V inhibitors attenuate right ventricular pressure and remodeling in a rat model of pulmonary hypertension. *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Soc. Can. Sci. Pharm.* 11, 118s–130s. <https://doi.org/10.18433/j34k5z>

- Saygili, Erol, Rana, O.R., Saygili, Esra, Reuter, H., Frank, K., Schwinger, R.H.G., Müller-Ehmsen, J., Zobel, C., 2007. Losartan prevents stretch-induced electrical remodeling in cultured atrial neonatal myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, H2898-2905. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00546.2006>
- Schirger, J.A., Grantham, J.A., Kullo, I.J., Jougasaki, M., Wennberg, P.W., Chen, H.H., Lisy, O., Miller, V., Simari, R.D., Burnett, J.C., 2000. Vascular actions of brain natriuretic peptide: modulation by atherosclerosis and neutral endopeptidase inhibition. *J. Am. Coll. Cardiol.* 35, 796–801. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(99\)00593-8](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(99)00593-8)
- Schramm, A., Matusik, P., Osmenda, G., Guzik, T.J., 2012. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascul. Pharmacol.* 56, 216–231. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2012.02.012>
- Schroll, S., Lange, T.J., Arzt, M., Sebah, D., Nowrotek, A., Lehmann, H., Wensel, R., Pfeifer, M., Blumberg, F.C., 2013. Effects of simvastatin on pulmonary fibrosis, pulmonary hypertension and exercise capacity in bleomycin-treated rats. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 208, 191–201. <https://doi.org/10.1111/apha.12085>
- Schwartz, A.G., Pashko, L.L., 2004. Dehydroepiandrosterone, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and longevity. *Ageing Res. Rev.* 3, 171–187. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2003.05.001>
- Sehra, D., Sehra, S., Sehra, S.T., 2017. Cardiovascular pleiotropic effects of statins and new onset diabetes: is there a common link: do we need to evaluate the role of KATP channels? *Expert Opin. Drug Saf.* 16, 823–831. <https://doi.org/10.1080/14740338.2017.1338269>
- Seimetz, M., Parajuli, N., Pichl, A., Veit, F., Kwapiszewska, G., Weisel, F.C., Milger, K., Egemnazarov, B., Turowska, A., Fuchs, B., Nikam, S., Roth, M., Sydykov, A., Medebach, T., Klepetko, W., Jaksch, P., Dumitrascu, R., Garn, H., Voswinckel, R., Kostin, S., Seeger, W., Schermuly, R.T., Grimminger, F., Ghofrani, H.A., Weissmann, N., 2011. Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. *Cell* 147, 293–305. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.035>
- Semenza, G.L., 2012. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell* 148, 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>
- Shimoda, L.A., Semenza, G.L., 2011. HIF and the Lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 152–156. <https://doi.org/10.1164/rccm.201009-1393PP>
- Sigurdsson, A., Swedberg, K., 1996. The role of neurohormonal activation in chronic heart failure and postmyocardial infarction. *Am. Heart J.* 132, 229–234.
- Silva, A.F., Sousa-Nunes, F., Faria-Costa, G., Rodrigues, I., Guimarães, J.T., Leite-Moreira, A., Henriques-Coelho, T., Negrão, R., Moreira-Gonçalves, D., 2021. Effects of chronic moderate alcohol consumption on right ventricle and pulmonary remodelling. *Exp. Physiol.* 106, 1359–1372. <https://doi.org/10.1113/EP088788>
- Simoncini, T., Mannella, P., Fornari, L., Varone, G., Caruso, A., Genazzani, A.R., 2003. Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms. *Endocrinology* 144, 3449–3455. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0044>
- Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D.S., Denton, C.P., Gatzoulis, M.A., Krowka, M., Williams, P.G., Souza, R., 2019. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 53, 1801913. <https://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>
- Sitbon, O., Humbert, M., Jaïs, X., Loos, V., Hamid, A.M., Provencher, S., Garcia, G., Parent, F., Hervé, P., Simonneau, G., 2005. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 111, 3105–3111. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.488486>
- Sitbon, O., Morrell, N., 2012. Pathways in pulmonary arterial hypertension: the future is here. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* 21, 321–327. <https://doi.org/10.1183/09059180.00004812>

- Smirnov, S.V., Robertson, T.P., Ward, J.P., Aaronson, P.I., 1994. 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. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.266.1.H365>
- Smith, T.G., Robbins, P.A., Ratcliffe, P.J., 2008. The human side of hypoxia-inducible factor. *Br. J. Haematol.* 141, 325–334. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07029.x>
- Soleilhac, J.M., Lucas, E., Beaumont, A., Turcaud, S., Michel, J.B., Ficheux, D., Fournié-Zaluski, M.C., Roques, B.P., 1992. A 94-kDa protein, identified as neutral endopeptidase-24.11, can inactivate atrial natriuretic peptide in the vascular endothelium. *Mol. Pharmacol.* 41, 609–614.
- Stenmark, K.R., Meyrick, B., Galie, N., Mooi, W.J., McMurtry, I.F., 2009. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 297, L1013-1032. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00217.2009>
- Stolz, D., Rasch, H., Linka, A., Di Valentino, M., Meyer, A., Brutsche, M., Tamm, M., 2008. A randomised, controlled trial of bosentan in severe COPD. *Eur. Respir. J.* 32, 619–628. <https://doi.org/10.1183/09031936.00011308>
- Stroes, E., 2005. Statins and LDL-cholesterol lowering: an overview. *Curr. Med. Res. Opin.* 21 Suppl 6, S9-16. <https://doi.org/10.1185/030079905X59102>
- Suga, S., Nakao, K., Itoh, H., Komatsu, Y., Ogawa, Y., Hama, N., Imura, H., 1992. Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of “vascular natriuretic peptide system.” *J. Clin. Invest.* 90, 1145–1149. <https://doi.org/10.1172/JCI115933>
- Sun, X., Ku, D.D., 2008. Rosuvastatin provides pleiotropic protection against pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy, and coronary endothelial dysfunction in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H801-809. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01112.2007>
- Takahashi, M., Nakamura, T., Toba, T., Kajiwara, N., Kato, H., Shimizu, Y., 2004. Transplantation of endothelial progenitor cells into the lung to alleviate pulmonary hypertension in dogs. *Tissue Eng.* 10, 771–779. <https://doi.org/10.1089/1076327041348563>
- Tantini, B., Manes, A., Fiumana, E., Pignatti, C., Guarnieri, C., Zannoli, R., MD, A.B., Galiè, N., 2005. Antiproliferative effect of sildenafil on human pulmonary artery smooth muscle cells. *Basic Res. Cardiol.* 100, 131–138. <https://doi.org/10.1007/s00395-004-0504-5>
- Taraseviciene-Stewart, L., Scerbavicius, R., Choe, K.-H., Cool, C., Wood, K., Tuder, R.M., Burns, N., Kasper, M., Voelkel, N.F., 2006. Simvastatin causes endothelial cell apoptosis and attenuates severe pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 291, L668-676. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00491.2005>
- Teisseyre, A., Uryga, A., Michalak, K., 2021. Statins as inhibitors of voltage-gated potassium channels Kv1.3 in cancer cells. *J. Mol. Struct.* 1230, 129905. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.129905>
- Thompson, A.A.R., Lawrie, A., 2017. Targeting Vascular Remodeling to Treat Pulmonary Arterial Hypertension. *Trends Mol. Med.* 23, 31–45. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.11.005>
- Tian, W., Jiang, X., Sung, Y.K., Qian, J., Yuan, K., Nicolls, M.R., 2014. Leukotrienes in pulmonary arterial hypertension. *Immunol. Res.* 58, 387–393. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8492-5>
- Timmermans, P.B., 1999. Angiotensin II receptor antagonists: an emerging new class of cardiovascular therapeutics. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* 22, 147–153. <https://doi.org/10.1291/hypres.22.147>
- Tóth, M., Vuorinen, K.H., Vuolteenaho, O., Hassinen, I.E., Uusimaa, P.A., Leppäluoto, J., Ruskoaho, H., 1994. Hypoxia stimulates release of ANP and BNP from perfused rat ventricular myocardium. *Am. J. Physiol.* 266, H1572-1580. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.266.4.H1572>
- Tuder, R.M., Cool, C.D., Geraci, M.W., Wang, J., Abman, S.H., Wright, L., Badesch, D., Voelkel, N.F., 1999. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe

- pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 1925–1932. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.159.6.9804054>
- Vachiéry, J.-L., Tedford, R.J., Rosenkranz, S., Palazzini, M., Lang, I., Guazzi, M., Coghlan, G., Chazova, I., De Marco, T., 2019. Pulmonary hypertension due to left heart disease. *Eur. Respir. J.* 53, 1801897. <https://doi.org/10.1183/13993003.01897-2018>
- van Duin, R.W.B., Stam, K., Cai, Z., Uitterdijk, A., Garcia-Alvarez, A., Ibanez, B., Danser, A.H.J., Reiss, I.K.M., Duncker, D.J., Merkus, D., 2019. Transition from post-capillary pulmonary hypertension to combined pre- and post-capillary pulmonary hypertension in swine: a key role for endothelin. *J. Physiol.* 597, 1157–1173. <https://doi.org/10.1113/JP275987>
- Ventetuolo, C.E., Baird, G.L., Barr, R.G., Bluemke, D.A., Fritz, J.S., Hill, N.S., Klinger, J.R., Lima, J.A.C., Ouyang, P., Palevsky, H.I., Palmisciano, A.J., Krishnan, I., Pinder, D., Preston, I.R., Roberts, K.E., Kawut, S.M., 2016. Higher Estradiol and Lower Dehydroepiandrosterone-Sulfate Levels Are Associated with Pulmonary Arterial Hypertension in Men. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193, 1168–1175. <https://doi.org/10.1164/rccm.201509-1785OC>
- Vonk Noordegraaf, A., Galiè, N., 2011. The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* 20, 243–253. <https://doi.org/10.1183/09059180.00006511>
- Walsh, T.P., Baird, G.L., Atalay, M.K., Agarwal, S., Arcuri, D., Klinger, J.R., Mullin, C.J., Morreo, H., Normandin, B., Shiva, S., Whittenhall, M., Ventetuolo, C.E., 2021. Experimental design of the Effects of Dehydroepiandrosterone in Pulmonary Hypertension (EDIPHY) trial. *Pulm. Circ.* 11, 2045894021989554. <https://doi.org/10.1177/2045894021989554>
- Wang, C.-Y., Liu, P.-Y., Liao, J.K., 2008. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol. Med.* 14, 37–44.
- Wang, L., Qu, M., Chen, Y., Zhou, Y., Wan, Z., 2016. Statins Have No Additional Benefit for Pulmonary Hypertension: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLOS ONE* 11.
- Wang, T., Han, S.-X., Zhang, S.-F., Ning, Y.-Y., Chen, L., Chen, Y.-J., He, G.-M., Xu, D., An, J., Yang, T., Zhang, X.-H., Wen, F.-Q., 2010. Role of chymase in cigarette smoke-induced pulmonary artery remodeling and pulmonary hypertension in hamsters. *Respir. Res.* 11, 36. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-36>
- Weatherald, J., Chaumais, M.-C., Savale, L., Jaïs, X., Seferian, A., Canuet, M., Bouvaist, H., Magro, P., Bergeron, A., Guignabert, C., Sitbon, O., Simonneau, G., Humbert, M., Montani, D., 2017. Long-term outcomes of dasatinib-induced pulmonary arterial hypertension: a population-based study. *Eur. Respir. J.* 50. <https://doi.org/10.1183/13993003.00217-2017>
- Weissmann, N., Dietrich, A., Fuchs, B., Kalwa, H., Ay, M., Dumitrascu, R., Olschewski, A., Storch, U., Mederos y Schnitzler, M., Ghofrani, H.A., Schermuly, R.T., Pinkenburg, O., Seeger, W., Grimminger, F., Gudermann, T., 2006. Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 19093–19098. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606728103>
- Weissmann, N., Lobo, B., Pichl, A., Parajuli, N., Seimetz, M., Puig-Pey, R., Ferrer, E., Peinado, V.I., Domínguez-Fandos, D., Fysikopoulos, A., Stasch, J.-P., Ghofrani, H.A., Coll-Bonfill, N., Frey, R., Schermuly, R.T., García-Lucio, J., Blanco, I., Bednorz, M., Tura-Ceide, O., Tadele, E., Brandes, R.P., Grimminger, J., Klepetko, W., Jaksch, P., Rodriguez-Roisin, R., Seeger, W., Grimminger, F., Barberà, J.A., 2014. Stimulation of soluble guanylate cyclase prevents cigarette smoke-induced pulmonary hypertension and emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 1359–1373. <https://doi.org/10.1164/rccm.201311-2037OC>
- Wijeratne, D.T., Lajkosz, K., Brogly, S.B., Loughheed, M.D., Jiang, L., Housin, A., Barber, D., Johnson, A., Doliszny, K.M., Archer, S.L., 2018. Increasing Incidence and Prevalence of World Health Organization Groups 1 to 4 Pulmonary Hypertension: A Population-Based Cohort Study in Ontario, Canada. *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes* 11, e003973. <https://doi.org/10.1161/CIRCOUTCOMES.117.003973>

- Wilhelm, J., Vanková, M., Maxová, H., Sisková, A., 2003. Hydrogen peroxide production by alveolar macrophages is increased and its concentration is elevated in the breath of rats exposed to hypoxia: relationship to lung lipid peroxidation. *Physiol. Res.* 52, 327–332.
- Wing, P.A.C., Keeley, T.P., Zhuang, X., Lee, J.Y., Prange-Barczynska, M., Tsukuda, S., Morgan, S.B., Harding, A.C., Argles, I.L.A., Kurlekar, S., Noerenberg, M., Thompson, C.P., Huang, K.-Y.A., Balfe, P., Watashi, K., Castello, A., Hinks, T.S.C., James, W., Ratcliffe, P.J., Davis, I., Hodson, E.J., Bishop, T., McKeating, J.A., 2021. Hypoxic and pharmacological activation of HIF inhibits SARS-CoV-2 infection of lung epithelial cells. *Cell Rep.* 35, 109020. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109020>
- Wort, S.J., Ito, M., Chou, P.-C., Mc Master, S.K., Badiger, R., Jazrawi, E., de Souza, P., Evans, T.W., Mitchell, J.A., Pinhu, L., Ito, K., Adcock, I.M., 2009. Synergistic induction of endothelin-1 by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma is due to enhanced NF-kappaB binding and histone acetylation at specific kappaB sites. *J. Biol. Chem.* 284, 24297–24305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.032524>
- Wright, J.L., Churg, A., 1991. Effect of long-term cigarette smoke exposure on pulmonary vascular structure and function in the guinea pig. *Exp. Lung Res.* 17, 997–1009. <https://doi.org/10.3109/01902149109064331>
- Wright, J.L., Zhou, S., Preobrazhenska, O., Marshall, C., Sin, D.D., Laher, I., Golbidi, S., Churg, A.M., 2011. Statin reverses smoke-induced pulmonary hypertension and prevents emphysema but not airway remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 50–58. <https://doi.org/10.1164/rccm.201003-0399OC>
- Xie, L., Lin, P., Xie, H., Xu, C., 2010. Effects of atorvastatin and losartan on monocrotaline-induced pulmonary artery remodeling in rats. *Clin. Exp. Hypertens. N. Y.* N 1993 32, 547–554. <https://doi.org/10.3109/10641963.2010.503295>
- Yang, Jian, Jiang, H., Yang, Jun, Ding, J.-W., Chen, L.-H., Li, S., Zhang, X.-D., 2009. Valsartan preconditioning protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through TLR4/NF-kappaB signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.* 330, 39–46. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0098-1>
- Yang, S., Gu, Y.-Y., Jing, F., Yu, C.-X., Guan, Q.-B., 2019. The Effect of Statins on Levels of Dehydroepiandrosterone (DHEA) in Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 25, 590–597. <https://doi.org/10.12659/MSM.914128>
- Yin, J., Kukucka, M., Hoffmann, J., Sterner-Kock, A., Burhenne, J., Haefeli, W.E., Kuppe, H., Kuebler, W.M., 2011. Sildenafil preserves lung endothelial function and prevents pulmonary vascular remodeling in a rat model of diastolic heart failure. *Circ. Heart Fail.* 4, 198–206. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.957050>
- Yin, N., Kaestle, S., Yin, J., Hentschel, T., Pries, A.R., Kuppe, H., Kuebler, W.M., 2009. Inhaled nitric oxide versus aerosolized iloprost for the treatment of pulmonary hypertension with left heart disease. *Crit. Care Med.* 37, 980–986. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181962ce6>
- Yoder, M.C., 2012. Human endothelial progenitor cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006692. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006692>
- Yu, J., Wang, S., Shi, W., Zhou, W., Niu, Y., Huang, S., Zhang, Y., Zhang, A., Jia, Z., 2021. Roxadustat prevents Ang II hypertension by targeting angiotensin receptors and eNOS. *JCI Insight* 6, e133690. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.133690>
- Yuan, X.J., 1995. Voltage-gated K⁺ currents regulate resting membrane potential and [Ca²⁺]_i in pulmonary arterial myocytes. *Circ. Res.* 77, 370–378. <https://doi.org/10.1161/01.res.77.2.370>
- Yuan, X.J., Tod, M.L., Rubin, L.J., Blaustein, M.P., 1995. Hypoxic and metabolic regulation of voltage-gated K⁺ channels in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Exp. Physiol.* 80, 803–813. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1995.sp003888>

- Žaloudíková, M., Vytášek, R., Vajnerová, O., Hniličková, O., Vízek, M., Hampl, V., Herget, J., 2016. Depletion of alveolar macrophages attenuates hypoxic pulmonary hypertension but not hypoxia-induced increase in serum concentration of MCP-1. *Physiol. Res.* 65, 763–768. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933187>
- Zhang, Y.-T., Xue, J.-J., Wang, Q., Cheng, S.-Y., Chen, Z.-C., Li, H.-Y., Shan, J.-J., Cheng, K.-L., Zeng, W.-J., 2019. Dehydroepiandrosterone attenuates pulmonary artery and right ventricular remodeling in a rat model of pulmonary hypertension due to left heart failure. *Life Sci.* 219, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.12.056>
- Zhao, Y.D., Courtman, D.W., Deng, Y., Kugathasan, L., Zhang, Q., Stewart, D.J., 2005. Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease. *Circ. Res.* 96, 442–450. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000157672.70560.7b>
- Zhou, Q., Liao, J.K., 2010. Pleiotropic Effects of Statins—Basic Research and Clinical Perspectives—. *Circ. J.* 74, 818–826.
- Zhou, Q., Liao, J.K., 2009. Statins and cardiovascular diseases: from cholesterol lowering to pleiotropy. *Curr. Pharm. Des.* 15, 467–478.
- Zinellu, A., Paliogiannis, P., Usai, M.F., Carru, C., Mangoni, A.A., 2019. Effect of statin treatment on circulating malondialdehyde concentrations: a systematic review and meta-analysis. *Ther. Adv. Chronic Dis.* 10, 2040622319862714. <https://doi.org/10.1177/2040622319862714>

8. PŘÍLOHY

Publikace *in extenso* :

1. Krása K, Vajnerova O, D Uris Ova J, Minaříkova M, Miková D, Srbová M, Chalupský K, Kaftanová B, Hampl V. **Simvastatin and dehydroepiandrosterone sulfate effects against hypoxic pulmonary hypertension are not additive.** *Physiol Res.* 2022 Dec 16;71(6):801-810. doi: 10.33549/physiolres.934913. Epub 2022 Nov 25. PMID: 36426885; PMCID: PMC9814989.

Publikace *v recenzním řízení* :

1. 1. Novák T, Žaloudíková M, Smolková P, Kaftanová B, Edlmanová J, Krása K, Hampl V. **Hypoxia-inducible factors activator, roxadustat, increases pulmonary vascular resistance in rats**
2. Chovanec M, Ďurišová J, Vajnerová O, Baňasová A, Vízek M, Žaloudíková M, Uhlík J, Krása K, Hampl V, Herget J **A simple model of reactive pulmonary hypertension in left heart pressure overload induced by partial intravascular occlusion of ascending aorta**

Simvastatin and Dehydroepiandrosterone Sulfate Effects Against Hypoxic Pulmonary Hypertension Are Not Additive

Kryštof KRÁSA^{1,2}, Olga VAJNEROVÁ¹, Jana ĎURIŠOVÁ¹, Marcela MINAŘÍKOVÁ¹, Dana MIKOVÁ¹, Martina SRBOVÁ³, Karel CHALUPSKÝ¹, Barbora KAFTANOVÁ¹, Václav HAMPL¹

¹Department of Physiology, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, ²Military University Hospital Prague, Department of Internal Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and Military University Hospital, Prague, Czech Republic, ³Department of Medical Chemistry and Clinical Biochemistry, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Received April 9, 2022

Accepted August 30, 2022

Epub Ahead of Print November 25, 2022

Summary

Pulmonary hypertension is a group of disorders characterized by elevated mean pulmonary artery pressure (mPAP) and pulmonary vascular resistance. To test our hypothesis that combining two drugs useful in experimental pulmonary hypertension, statins and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), is more effective than either agent alone, we induced pulmonary hypertension in adult male rats by exposing them to hypoxia (10 %O₂) for 3 weeks. We treated them with simvastatin (60 mg/l) and DHEA-S (100 mg/l) in drinking water, either alone or in combination. Both simvastatin and DHEA-S reduced mPAP (from mean±s.d. of 34.4±4.4 to 27.6±5.9 and 26.7±4.8 mmHg, respectively), yet their combination was not more effective (26.7±7.9 mmHg). Differences in the degree of oxidative stress (indicated by malondialdehyde plasma concentration), the rate of superoxide production (electron paramagnetic resonance), or blood nitric oxide levels (chemiluminescence) did not explain the lack of additivity of the effect of DHEA-S and simvastatin on pulmonary hypertension. We propose that the main mechanism of both drugs on pulmonary hypertension could be their inhibitory effect on 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase, which could explain their lack of additivity.

Key words

Statin • Dehydroepiandrosterone • Pulmonary hypertension • Rats

Corresponding author

Kryštof Krása, ÚVN, U Vojenské nemocnice 1200/1, 16902 Prague 6, Czech Republic, kry.krása@gmail.com

Introduction

Pulmonary hypertension is a diverse group of disorders characterized by elevated mean pulmonary artery pressure (mPAP) and pulmonary vascular resistance. Both elevated pulmonary vascular smooth muscle tension and remodeling of the pulmonary vascular wall contribute, to a variable degree, to increased pulmonary vascular resistance. In the absolute majority of patients, pulmonary hypertension is a secondary consequence of some other disease, especially circulatory or respiratory [1]. The prognosis of primary disease is significantly worse if it is complicated by pulmonary hypertension. Although the possibilities of therapy have improved significantly in the last two decades, they still have limited effectiveness and there is a clear need for new therapeutic procedures, including off-label and combination approaches [2].

A good example of an off-label therapy for pulmonary hypertension is the use of statins. Although this group of competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase is used primarily to reduce cardiovascular risks by lowering blood cholesterol levels [3], there is a large body of evidence that they prevent and can reduce pulmonary hypertension in experimental animals [4-7]. The mechanisms of this effect seem to include restoration of

nitric oxide (NO) synthase expression and/or activity reduced in some (but not all [8]) forms of pulmonary hypertension [9,10], decreased plasma concentration of asymmetric dimethylarginine (an endogenous NO synthase inhibitor) [10], and antioxidant activity [11,12] (although a pro-oxidant effect of statins has also been reported [12]). The results with statins in human patients are less conclusive and may depend on the particular type of pulmonary hypertension [13-16]. Therefore, it is worth testing whether combining statins with other therapies could be more effective than statins alone. For example, the combination of statins with sildenafil was shown to be more effective against pulmonary hypertension than either therapy alone in some [17] but not all [18] studies.

Another promising approach to pulmonary hypertension therapy could be the use of dehydroepiandrosterone (DHEA). DHEA is a naturally occurring cholesterol-derived steroid hormone synthesized mainly in the adrenal cortex that serves as a precursor for both estrogens and androgens and has a variety of biological effects of its own [19]. DHEA circulates in the blood mostly in the form of its 3 β -sulfate ester (DHEA-sulfate, DHEA-S), which also mediates many of its effects [20]. DHEA/DHEA-S possess several properties that may be beneficial in pulmonary hypertension, including antioxidant activity [21], stimulation of NO synthesis [22], activation of Ca²⁺-gated K⁺ (K_{Ca}) channels with large conductance (BK_{Ca}) [23] that mediate vasodilation in the pulmonary circulation [24,25], and inhibition of L-type voltage-gated Ca²⁺ channels [26]. Furthermore, DHEA can block superoxide production by alveolar macrophages [27], which is also part of the hypoxic pulmonary hypertension mechanism [28,29]. Because of these properties, and because its exogenous administration is well tolerated in humans, DHEA (or DHEA-S) is attractive as a potential treatment of pulmonary hypertension, especially as plasma levels of DHEA/DHEA-S are reduced in patients with this disease [30]. It has been shown repeatedly that administration of DHEA or DHEA-S partially prevents and reduces experimental pulmonary hypertension [23,31-33].

The present study was therefore designed to test the hypothesis that a combination therapy with oral statin (simvastatin) and oral DHEA-S will be more effective in preventing chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats than either of the treatments alone. Since orally ingested DHEA is converted to DHEA-S when passing through the intestines and liver [20], we decided to use

DHEA-S in drinking water.

Methods

The experiments were carried out according to EU regulations for the use of experimental animals and in accordance with the ARRIVE guidelines. They were approved by the Charles University Second Faculty of Medicine Animal Studies Committee.

All drugs and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic).

Experimental groups and drug administration

The study utilized adult Wistar rats (~350 g at the beginning of the experiment). For the sake of compatibility with previously published studies with statins and DHEA-S, only males were used. They were randomly assigned to one of five groups - one normoxic control (NC, n=16, kept in room air throughout the experiment) and 4 chronically hypoxic (normobaric 10 % O₂ for 3 weeks). Of those, one group was treated with an inhibitor of HMG-CoA reductase, simvastatin, administered in drinking water at a dose of 60 mg/l, throughout the hypoxic exposure (group HS, n=9). Since simvastatin is not soluble in water, it was first dissolved in a small volume of ethanol and then added to the drinking water to yield a final ethanol concentration of 0.5 %. The dose of simvastatin was calculated using our earlier observation (now confirmed) that an adult male rat in 10 % O₂ drinks about 30 ml/day and therefore the effective dose by gavage [7]. Another group received, also in drinking water, DHEA-S at 100 mg/l [31] for the entire duration of the hypoxic exposure (group HD, n=10). The third hypoxic group was treated with a combination of DHEA-S (100 mg/l) and simvastatin (60 mg/l) in drinking water with 0.5 % ethanol (group HDS, n=9). The last group drinking plain water in hypoxia served as hypoxic controls (HC, n=9).

We consider the amount of ethanol consumed with simvastatin negligible, as doses ten times higher are used as a model of moderate alcohol use [34,35]. However, to verify that the differences between the groups were not due to the presence of ethanol in the drinking water of simvastatin-treated rats, parts of the remaining groups also received 0.5 % ethanol (8 of 16 rats in NC, 4 of 10 in HD, and 3 of 9 in HC). Unless otherwise stated, the results were the same with and without ethanol and they were thus pooled for statistical analysis.

Experimental protocol and measurements

After 3 weeks of hypoxia (or equivalent age in NC), rats were anesthetized with thiopental (30 mg/kg of body weight, i.p.). Pulmonary artery pressure was measured in intact chest rats spontaneously breathing room air by pulmonary artery catheterization as previously described [31,36]. The trachea was then accessed through a throat skin incision and used to intubate and ventilate the rat with air (50 breaths/min; peak inspiratory pressure 10 cm H₂O; end-expiratory pressure 0 cm H₂O). The chest was then opened by sternotomy and an ultrasound flow probe (Transonic Systems Inc, Ithaca, NY, USA) was placed on the ascending aorta to measure cardiac output [31]. In some rats, this procedure caused excessive bleeding, so the number of rats for which we have cardiac output values is somewhat lower than that for which we have other variables. Cardiac index was calculated as cardiac output/body weight and pulmonary vascular resistance index (PVRI) as mPAP/cardiac output/body weight. Subsequently, arterial blood samples were collected to measure hematocrit. To assess a possible role of NO alterations, the sum of plasma concentrations of NO and its oxidation products (nitrites and nitrates, NO_x) was measured by chemiluminescence (NOA 280i, Sievers, Boulder, CO, USA) after hot acidic reduction as previously described [37].

Serum samples were also used to determine the concentration of malondialdehyde (MDA) with HPLC [38] as a measure of oxidative stress [39]. Briefly, 0.05 % butylhydroxytoluene, 0.44 M H₃PO₄ and 42 mM thiobarbituric acid were added to samples and standards (1,1,3,3-tetraethoxypropane) of different concentrations. The samples were vortexed and then heated at 100 °C for 1 hour. They were then cooled on ice for 5 minutes and the MDA-thiobarbituric acid complex was extracted into butanol. The tubes were centrifuged for 5 minutes at 10,000 g to form two separate phases. Aliquots were pipetted into vials and measured by HPLC (Jasco, Tokyo, Japan). The analysis was performed on the Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 4,6x 250 mm, 5 µm column. The optimal flow rate was set at 1 ml/min, for a mobile phase with a composition of methanol/50 mM KH₂PO₄ (40:60, v/v). The fluorescence detector was set at 515/553 nm (excitation/emission). Evaluation was performed using ChromNAV software (Jasco).

Electron paramagnetic resonance (EPR) using 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine hydrochloride (CMH, 10 µM) as a superoxide

(O₂⁻) detecting spin probe was applied to measure the superoxide production rate in fresh blood [40]. Samples were prepared by adding 5 µM diethyldithiocarbamate, 25 µM desferrioxamine, and 10 µM CMH (Noxygen, Elzach, Germany) and 5 µl of fresh blood in 50 µl of Krebs-Hepes buffer. The samples were placed in airtight glass capillaries and the spectra were recorded in an EPR spectrometer with a temperature-controlled resonator (Escan, Bruker Corp., Billerica, MA, USA). The EPR settings for the CMH spin label were center field 3455 G, sweep width 10 G, frequency 9.7690 GHz, microwave power 23.89 mW, and modulation amplitude 2.93 G. Spectra were recorded over 10 min.

After obtaining all samples, the heart was dissected and weighed in parts in the fresh state. The weight of the right ventricle relative to body weight and to the sum of left ventricle plus septum weight was used as a measure of right ventricular hypertrophy.

Statistical analysis

All differences between the groups were analyzed using 1-way ANOVA followed (if significant) by Fischer's least significant difference post hoc test using the Prism 9 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). *p* < 0.05 was preselected to reject a null hypothesis of no difference in all cases. The results are reported as means ± s.d.

Results

All rats assigned to the experimental groups survived till the end of the study with no obvious problems. Compared to normoxic controls, all rats exposed to chronic hypoxia had reduced body weight, but there were no differences in body weight among the treatments, indicating similar water (and thus drug) intake in all hypoxic groups (Table 1). Hematocrit was increased similarly in all hypoxic groups (Table 2), indicating that the effects of therapy on pulmonary vascular resistance and mPAP were not caused by changes in blood viscosity.

As expected, the increase in mPAP caused by chronic hypoxia was reduced (approximately by one half) by the treatment with DHEA-S alone. Similarly, simvastatin treatment alone also significantly reduced mPAP compared to hypoxic controls; the mPAP reducing effect of statin treatment was about the same as that of DHEA-S (Fig. 1a). Contrary to our hypothesis, simultaneous treatment with both drugs (DHEA-S +

statin) did not result in any additional reduction in mPAP (Fig. 1a). Cardiac output and cardiac index did not differ among the groups (Table 2). However, PVRI, significantly elevated in hypoxic controls, did not significantly differ from normoxic controls in any of the treated groups (HD, HS and HDS) and was significantly lower in both groups treated with simvastatin (HS and

HDS) than in hypoxic controls (Fig. 1b).

The weight of the left ventricle plus the septum relative to body weight was similar in all groups (Table 1). The weight of the right ventricle relative to body weight, as well as relative to the left ventricle plus septum weight, was increased similarly in all groups exposed to chronic hypoxia (Table 1).

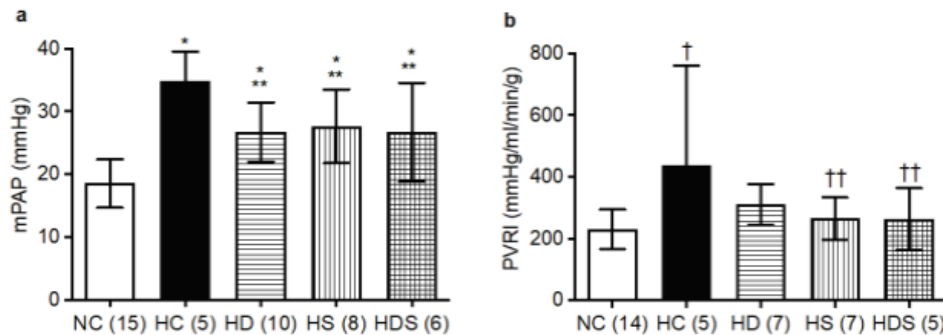


Fig. 1. Mean pulmonary arterial pressure (mPAP, **a**) and pulmonary vascular resistance index (PVRI, **b**), elevated by chronic hypoxia, are reduced by treatment with DHEA-S, simvastatin, and their combination. NC, normoxic control group; HC, hypoxic control group (3 weeks in 10% O₂); HD, group treated with DHEA-S throughout the 3-weeks exposure to hypoxia; HS, group treated with simvastatin throughout the 3-weeks exposure to hypoxia; HDS, group treated with a combination of simvastatin + DHEA-S throughout the 3-weeks exposure to hypoxia. The columns and lines represent means and s.d., respectively; in parentheses are the *n*s. Differences among the groups not specifically marked are not statistically significant ($p < 0.05$, 1-way ANOVA and Fischer's least significant difference post hoc test). * $p < 0.002$ vs. NC, † $p = 0.005$ vs. NC, ** $p < 0.013$ vs. HC, †† $p < 0.045$ vs. HC

Table 1. Body and heart ventricles weights

Group (n)	BW (g)	RV (mg)	LV+S (mg)	RV/BW (%)	LV+S/BW (%)	RV/LV+S
NC (16)	446 ± 75	210 ± 21	838 ± 79	0.048 ± 0.007	0.19 ± 0.02	0.251 ± 0.015
HC (9)	327 ± 15*	269 ± 41**	695 ± 51*	0.082 ± 0.011*	0.21 ± 0.01	0.386 ± 0.042*
HD (10)	304 ± 43*	263 ± 56***	638 ± 49*	0.086 ± 0.010*	0.21 ± 0.02	0.409 ± 0.061*
HS (9)	281 ± 23*	239 ± 48	606 ± 50*†	0.085 ± 0.014*	0.22 ± 0.01	0.395 ± 0.073*
HDS (9)	288 ± 33*	241 ± 61	606 ± 63*†	0.083 ± 0.015*	0.21 ± 0.01	0.393 ± 0.071*

NC, normoxic control group; HC, hypoxic control group (3 weeks in 10% O₂); HD, group treated with DHEA-S throughout the 3-weeks exposure to hypoxia; HS, group treated with simvastatin throughout the 3-weeks exposure to hypoxia; HDS, group treated with a combination of simvastatin + DHEA-S throughout the 3-weeks exposure to hypoxia; BW, body weight; RV, right ventricle weight; LV+S, the sum of the weights of the left ventricle and septum. Data are means ± s.d. Differences among the groups not specifically marked are not statistically significant ($p < 0.05$, 1-way ANOVA and Fischer's least significant difference post hoc test). * $P < 0.0001$ vs. NC, ** $P < 0.005$ vs. NC, *** $P < 0.01$ vs. NC

Table 2. Cardiac output, cardiac index, and hematocrit

Group	Cardiac output (ml/min)	Cardiac index (ml/min/kg BW)	Hematocrit (%)
NC	36.9 ± 9.7 (n=14)	84 ± 24 (n=14)	51.4 ± 3.4 (n=16)
HC	36.8 ± 21.0 (n=6)	113 ± 65 (n=6)	63.7 ± 3.2* (n=9)
HD	27.3 ± 6.5 (n=7)	91 ± 17 (n=7)	59.6 ± 6.0 (n=8)
HS	29.0 ± 6.7 (n=8)	103 ± 17 (n=8)	62.3 ± 3.8* (n=9)
HDS	27.0 ± 8.0 (n=7)	92 ± 22 (n=7)	62.4 ± 4.3* (n=9)

Group abbreviations as in Table 1. Data are means ± s.d. Differences among the groups not specifically marked are not statistically significant ($p < 0.05$, 1-way ANOVA and Fischer's least significant difference post hoc test). * $P < 0.0001$ vs. NC

DHEA-S alone or simvastatin alone. In rats treated with the DHEA-S + simvastatin combination, the NO_x values Plasma NO_x concentration was significantly elevated by chronic hypoxia. The values were similar in hypoxic controls and in rats treated in hypoxia with did not differ significantly ($p=0.064$) from those in normoxic controls, but they also did not differ significantly ($p=0.313$) from the hypoxic controls (Fig. 2).

Plasma MDA concentration, a marker of oxidative stress, was one of the few variables in our study affected by the solvent that the rats drank (water vs. 0.5 % ethanol). MDA levels were significantly higher in animals drinking this weak ethanol solution compared to otherwise identically treated groups drinking water. This was so in normoxic controls and, to a lesser extent, in rats treated with DHEA-S in hypoxia. The same trend existed also in the hypoxic controls, where, however, we were able to measure only two rats drinking ethanol solution, so in this case the data are far from conclusive.

For this reason, we made separate statistical comparisons of MDA for rats drinking ethanol solution (with the exclusion of the too small hypoxia-only group) and water. In water-drinking rats, plasma MDA was slightly reduced by chronic hypoxia and restored by DHEA-S treatment (Fig. 3a). In rats drinking water with 0.5 % ethanol, plasma MDA was highly significantly reduced by DHEA-S treatment and even more so in both groups treated with simvastatin (alone or in combination with DHEA-S) compared to normoxic controls. The two simvastatin groups (HS and HDS) did not differ between each other (Fig. 3b).

The rate of superoxide production also appeared to be affected by the solvent consumed by the rats, at least in normoxic controls, where we had sufficient numbers for direct comparison (3471 ± 423 pmol/min/l of blood in water-drinking rats and 4006 ± 304 pmol/min/l in ethanol solution-drinking rats, $p=0.0113$). For this reason, we calculated the differences between groups separately for animals drinking each solvent.

In water-drinking rats we found an increased rate of superoxide production in the DHEA-S treated group compared to the normoxic controls group (Fig. 4a). In the rats drinking weak ethanol solution, the rate of superoxide production was higher in the HDS group compared to both the normoxic controls and rats treated in hypoxia with simvastatin alone (Fig. 4b). Taken together, these data seem to indicate that neither chronic hypoxia nor simvastatin treatment alters the rate of superoxide production. DHEA-S treatment, alone or in combination with statin, on the other hand, does elevate this variable.

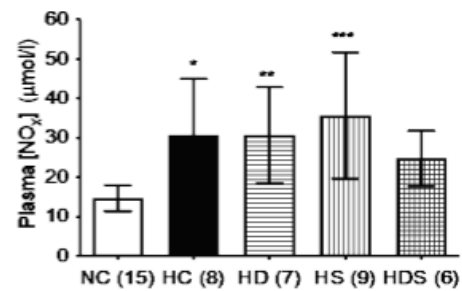


Fig. 2. Plasma concentration of nitric oxide and its oxidation products (NO_x), elevated by chronic hypoxia, is not affected by DHEA-S or simvastatin treatment. When simvastatin and DHEA-S are combined, plasma NO_x no longer differs from normoxic controls. Group abbreviations as in Fig. 1; in parentheses are the *n*s. The columns and lines represent means and s.d., respectively. Differences among the groups not specifically marked are not statistically significant ($p<0.05$, 1-way ANOVA and Fischer's least significant difference post hoc test). * $p=0.0017$ vs. NC, ** $p=0.0027$ vs. NC, *** $p<0.0001$ vs. NC

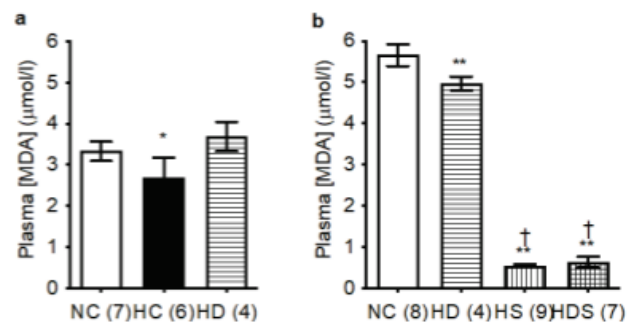


Fig. 3. Simvastatin markedly reduces plasma malondialdehyde (MDA) concentration. **a)** Rats drinking no alcohol. **b)** Rats drinking a weak ethanol solution (0.5 %). Group abbreviations as in Fig. 1; in parentheses are the *n*s. The columns and lines represent means and s.d., respectively. Differences among the groups not specifically marked are not statistically significant ($p<0.05$, 1-way ANOVA and Fischer's least significant difference post hoc test). * $p<0.01$ vs. NC and HD, ** $p<0.0001$ vs. NC, † $p<0.0001$ vs. HD

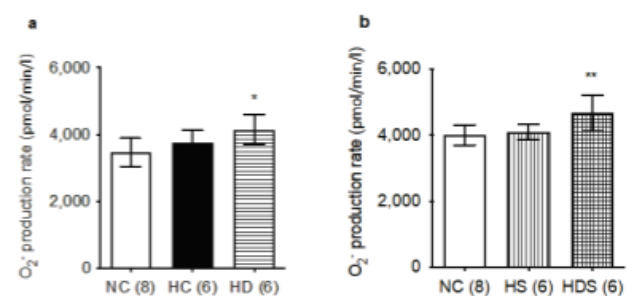


Fig. 4. DHEA-S, but not simvastatin or chronic hypoxia, increase the rate of superoxide (O_2^-) production. **a)** Rats drinking no alcohol. **b)** Rats drinking a weak ethanol solution (0.5 %). Group abbreviations as in Fig. 1; in parentheses are the *n*s. The columns and lines represent means and s.d., respectively. Differences among the groups not specifically marked are not statistically significant ($p<0.05$, 1-way ANOVA and Fischer's least significant difference post hoc test). * $p=0.008$ vs. NC, ** $p<0.02$ vs. NC and HS

Discussion

The main finding of the present study is that treatment of rats with a combination of DHEA-S and simvastatin is about as effective in reducing pulmonary hypertension in a hypoxic rat model as either treatment alone.

Statins are widely used for their cholesterol lowering effect. They competitively inhibit HMG-CoA reductase, the rate-controlling enzyme in the production of cholesterol [3]. In addition to this main effect, statins have a number of other, so-called pleiotropic effects that include antioxidant, antiproliferative, antithrombotic, and anti-inflammatory properties. Following the initial report that statin treatment can reduce experimentally induced pulmonary hypertension [4], a number of studies described the ability of various statins to partly prevent the development of pulmonary hypertension, or reduce an already established one, in several animal models [5-7], although there are also reports of minimal effectiveness of statins against established monocrotaline pulmonary hypertension [41,42].

In human patients, the studies are less conclusive. Three independent meta-analyses did not find any beneficial effect of statin therapy on pulmonary hypertension from all causes [13-15]. This could be related to the paradox that statins reduce low-density lipoproteincholesterol [43], but low-density lipoprotein cholesterol is already low in patients with pulmonary arterial hypertension, and successful pulmonary hypertension therapy increases these low levels [44]. Nevertheless, analyses focused only on patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) found reduced pulmonary hypertension in those treated with statins [16]. Our rat model of pulmonary hypertension induced by chronic hypoxia corresponds well with the situation of COPD patients, where the main cause for the development of pulmonary hypertension is their chronically hypoxemic status.

DHEA is an abundant steroid hormone that exists in the blood mainly in the form of its 3 β -sulfate ester, DHEA-S, to which it is converted by sulfotransferases especially in the liver and adrenal cortex. Most of the effects of DHEA are mediated by DHEA-S[20]. We and others have shown that DHEA/DHEA-S treatment partly prevents and reverses experimental pulmonary hypertension [23,31-33]. Improved mPAP and pulmonary vascular resistance were then demonstrated in a small group of patients with

COPD-related pulmonary hypertension [45]. The beneficial effect of DHEA supplementation corresponds to reduced plasma levels of DHEA-S in patients with pulmonary hypertension [30]. Our results fully confirm the beneficial effect of DHEA/DHEA-S supplementation on pulmonary hypertension.

Somewhat surprisingly, the positive effects of simvastatin, DHEA-S, and their combination on mPAP and PVRI were not reflected by reductions of right ventricle hypertrophy. While traditionally the enlargement of the right ventricle had been considered a simple mechanistic consequence of the afterload increased by the pulmonary hypertension, today it is evident that the relationship between right ventricle size and mPAP is more complex. For example, several long-term studies in humans found no positive effect of epoprostenol treatment on the right ventricular mass despite improvement of pulmonary hypertension [46]. Dissociation between a positive treatment effect on mPAP and no effect on right ventricle hypertrophy has also been reported in animal models [47].

Why are the effects of simvastatin and DHEA-S on pulmonary hypertension not additive? One possibility is that the majority of the beneficial effects on pulmonary hypertension is through the antioxidant activity. The effect of simvastatin on plasma MDA was really profound and DHEA-S could add only little to it, especially as its own effect on MDA was relatively modest. However, this possibility seems unlikely since the effect of simvastatin on pulmonary hypertension was very similar to that of DHEA-S, yet the magnitude of their influence on plasma MDA was quite disparate.

One difference in the mechanism of action between statins and DHEA is their effect on various K channels that control pulmonary arterial vascular smooth muscle cell membrane potential and thus their tension. DHEA activates K_{Ca} channels, specifically the charybdotoxin sensitive BK_{Ca} (K_{Ca}1.1) [23]. The possible activation of voltage-gated K⁺ (K_V) channels by DHEA was variably confirmed [23] and excluded (with a possible exception of K_V1.3) [48]. Statins, on the other hand, are known to stimulate the ATP-sensitive K⁺ channels (that play little role in the regulation of pulmonary arterial vascular smooth muscle) [49]. Statins were reported to activate K_V channels in general [50] and to inhibit K_V1.3 channels in cancerous T cells [51]. In vascular smooth muscle, K_V1.3 upregulation is important for proliferation and migration [52]. Statins' influence on the activity of the BK_{Ca} channels has not been reported.

Thus, DHEA appears to possess a mechanism for pulmonary vasodilation (BK_{Ca} channel activation) that statins lack. This would be expected to result in an additive effect on pulmonary hypertension. The lack of additivity may mean that the participation of the opening of the BK_{Ca} channel in the mechanism of the effect of DHEA on pulmonary hypertension is not essential. Alternatively, statins might activate BK_{Ca} channels indirectly, through their promotion of NO activity, since NO causes pulmonary vasodilation by activating BK_{Ca} channels [25]. Nevertheless, in our experiment, plasma NO_x concentration was not elevated by simvastatin in rats with PH (Fig. 2).

Another possible explanation for the lack of DHEA-S and statin additivity in their effect against pulmonary hypertension could be related to the fact that cholesterol is a precursor of DHEA synthesis. It is thus possible that simvastatin treatment reduced endogenous DHEA (and DHEA-S) production and adding exogenous DHEA-S to the statin therapy merely reconstituted normal levels of DHEA-S rather than increasing them above normal. In fact, a meta-analysis of studies in humans showed that statins decrease DHEA levels in women with polycystic ovary syndrome, although this effect was reported only after atorvastatin therapy, but not simvastatin [53]. However, if DHEA-S and statin affected pulmonary hypertension by different mechanisms, one would still expect the effect of simvastatin alone (presumably with lower DHEA-S levels) to be smaller than its effect with DHEA-S added.

Finally, DHEA can resemble statins in their capacity to inhibit HMG-CoA reductase [54]. This would mean that the reduction of pulmonary hypertension by statins does not belong among their pleiotropic effects unrelated to the inhibition of HMG-CoA reductase. In fact, that is what Girgis *et al.* [6] have concluded from their data showing that attenuation of pulmonary hypertension by simvastatin could be prevented by supplementation with the product of HMG-CoA reductase activity, mevalonate. The mechanisms whereby

decreased HMG-CoA reductase activity can lead to less pulmonary hypertension are unknown and deserve further exploration.

One limitation of the present study is that it only used males, but not females. Sex differences in pulmonary vascular physiology and pathophysiology are well established [55]. Normal DHEA-S levels are higher in men than in women [56]. DHEA/DHEA-S levels are lower in men with pulmonary hypertension compared to men without the disease [30]. Cardiovascular benefits of statin therapy seem to be less in women than in men [57]. Therefore, there are grounds to believe that both simvastatin alone and DHEA-S alone could have somewhat different effects in females than in males. However, the focus of the study was the combined effect of the simultaneous administration of both agents, and here it is difficult to imagine argumentation favoring the presence of such a combo effect in females when it was not found in males. Nevertheless, further work on this issue seems warranted.

In conclusion, we confirmed the beneficial effect of statin and DHEA-S treatment on mPAP and PVRI in pulmonary hypertension. We found that combined treatment with both drugs together does not have an additive effect on pulmonary hypertension. One possible explanation is that each of the drugs reduces pulmonary hypertension primarily through their inhibitory effect on HMG-CoA reductase. Statins and DHEA-S can be combined in pulmonary hypertension if needed for other reasons.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to the late Prof. Jan Herget, M.D. (+2019) for fruitful discussions of the study. Technical assistance of Mrs. Veronika Smolková is acknowledged. Supported by the Czech Republic Grant Agency grant #17-11223S.

References

1. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:D34-D41. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.10.029>
2. Corris PA, Seeger W. Call it by the correct name - pulmonary hypertension not pulmonary arterial hypertension: growing recognition of the global health impact for a well-recognized condition and the role of the Pulmonary Vascular Research Institute. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2020;318:L992-L4. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00098.2020>

3. Davies JT, Delfino SF, Feinberg CE, Johnson MF, Nappi VL, Olinger JT, Schwab AP, Swanson HI. Current and emerging uses of statins in clinical therapeutics: a review. *Lipid Insights* 2016;9:13-29. <https://doi.org/10.4137/LPI.S37450>
4. Nishimura T, Faul JL, Berry GJ, Vaszar LT, Qiu D, Pearl RG, Kao PN. Simvastatin attenuates smooth muscle neointimal proliferation and pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1403-8. <https://doi.org/10.1164/rccm.200203-268OC>
5. Katsiki N, Wierzbicki AS, Mikhailidis DP. Pulmonary arterial hypertension and statins: an update. *Curr Opin Cardiol* 2011;26:322-6. <https://doi.org/10.1097/HCO.0b013e32834659bf>
6. Girgis RE, Mozammel S, Champion HC, Li D, Peng X, Shimoda L, Tudor RM, Johns RA, Hassoun PM. Regression of chronic hypoxic pulmonary hypertension by simvastatin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L1105-L10. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00411.2006>
7. Nishimura T, Vaszar LT, Faul JL, Zhao G, Berry GJ, Shi L, Qiu D, Benson G, Pearl RG, Kao PN. Simvastatin rescues rats from fatal pulmonary hypertension by inducing apoptosis of neointimal smooth muscle cells. *Circulation* 2003;108:1640-5. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000087592.47401.37>
8. Hampl V, Herget J. Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev* 2000;80:1337-72. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1337>
9. Murata T, Kinoshita K, Hori M, Kuwahara M, Tsubone H, Karaki H, Ozaki H. Statin protects endothelial nitric oxide synthase activity in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2335-42. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000186184.33537.48>
10. Pei Y, Ma P, Wang X, Zhang W, Zhang X, Zheng P, Yan L, Xu Q, Dai G. Rosuvastatin attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension via regulation of Akt/eNOS signaling and asymmetric dimethylarginine metabolism. *Eur J Pharmacol* 2011;666:165-72. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.05.035>
11. Davignon J, Jacob RF, Mason RP. The antioxidant effects of statins. *Coron Artery Dis* 2004;15:251-8. <https://doi.org/10.1097/01.mca.0000131573.31966.34>
12. Beltowski J. Statins and modulation of oxidative stress. *Toxicol Mech Methods* 2005;15:61-92. <https://doi.org/10.1080/15376520590918766>
13. Anand V, Garg S, Duval S, Thenappan T. A systematic review and meta-analysis of trials using statins in pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ* 2016;6:295-301. <https://doi.org/10.1086/687304>
14. Rysz-Gorzynska M, Gluba-Brzozka A, Sahebkar A, Serban MC, Mikhailidis DP, Ursoniu S, Toth PP, Bittner V, Watts GF, Lip GY, Rysz J, Catapano AL, Banach M. Efficacy of statin therapy in pulmonary arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2016;6:30060. <https://doi.org/10.1038/srep30060>
15. Wang L, Qu M, Chen Y, Zhou Y, Wan Z. Statins have no additional benefit for pulmonary hypertension: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One* 2016;11:e0168101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168101>
16. Lu Y, Chang R, Yao J, Xu X, Teng Y, Cheng N. Effectiveness of long-term using statins in COPD - a network meta-analysis. *Respir Res* 2019;20:17. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-0984-3>
17. Zhao L, Sebkhii A, Ali O, Wojciak-Stothard B, Mamanova L, Yang Q, Wharton J, Wilkins MR. Simvastatin and sildenafil combine to attenuate pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2009;34:948-57. <https://doi.org/10.1183/09031936.00143508>
18. Lee DS, Kim YK, Jung YW. Simvastatin, sildenafil and their combination in monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension. *Korean Circ J* 2010;40:659-64. <https://doi.org/10.4070/kcj.2010.40.12.659>
19. Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J. DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front Neuroendocrinol* 2001;22:185-212. <https://doi.org/10.1006/frne.2001.0216>
20. Celec P, Stárka L. Dehydroepiandrosterone - is the fountain of youth drying out? *Physiol Res* 2003;52:397-407.
21. Schwartz AG, Pashko LL. Dehydroepiandrosterone, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and longevity. *Ageing Res Rev* 2004;3:171-87. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2003.05.001>
22. Liu D, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Gai2,3. *J Biol Chem* 2002;277:21379-88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200491200>

23. Bonnet S, Dumas-de-La-Roque E, Begueret H, Marthan R, Fayon M, Dos Santos P, Savineau J-P, Baulieu E-E. Dehydroepiandrosterone (DHEA) prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9488-93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1633724100>
24. Yuan X-J. Voltage gated K⁺ currents regulate resting membrane potential and [Ca²⁺]_i in pulmonary artery myocytes. *Circ Res* 1995;77:370-8. <https://doi.org/10.1161/01.RES.77.2.370>
25. Hampl V, Huang JM, Weir EK, Archer SL. Activation of the cGMP-dependent protein kinase mimics the stimulatory effect of nitric oxide and cGMP on calcium-gated potassium channels. *Physiol Res* 1995;44:39-44.
26. Ochi R, Chettimada S, Kizub I, Gupte SA. Dehydroepiandrosterone inhibits ICa_L and its window current in voltage-dependent and -independent mechanisms in arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2018;315:H1602-H13. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00291.2018>
27. Rom WN, Harkin T. Dehydroepiandrosterone inhibits the spontaneous release of superoxide radical by alveolar macrophages in vitro in asbestosis. *Environ Res* 1991;55:145-56. [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(05\)80171-9](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(05)80171-9)
28. Žaloudíková M, Vytášek R, Rašková M, Vízek M, Uhlík J, Hampl V. The effect of exposure to hypoxia on superoxide formation by alveolar macrophages is indirect. *Life Sci* 2019;236:116864. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116864>
29. Žaloudíková M, Vytášek R, Vajnerová O, Hnilíčková O, Vízek M, Hampl V, Herget J. Depletion of alveolar macrophages attenuates hypoxic pulmonary hypertension but not hypoxia-induced increase in serum concentration of MCP-1. *Physiol Res* 2016;65:763-8. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933187>
30. Ventetuolo CE, Baird GL, Barr RG, Bluemke DA, Fritz JS, Hill NS, Klinger JR, Lima JA, Ouyang P, Palevsky HI, Palmisciano AJ, Krishnan I, Pinder D, Preston IR, Roberts KE, Kawut SM. Higher estradiol and lower dehydroepiandrosterone-sulfate levels are associated with pulmonary arterial hypertension in men. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;193:1168-75. <https://doi.org/10.1164/rccm.201509-1785OC>
31. Hampl V, Bíbová J, Povýšilová V, Herget J. Dehydroepiandrosterone sulfate reduces experimental pulmonary hypertension in rats. *Eur Respir J* 2003;21:862-5. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00084503>
32. Oka M, Karoor V, Homma N, Nagaoka T, Sakao E, Golembeski SM, Limbird J, Imamura M, Gebb SA, Fagan KA, McMurtry IF. Dehydroepiandrosterone upregulates soluble guanylate cyclase and inhibits hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 2007;74:377-87. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.01.021>
33. Zhang YT, Xue JJ, Wang Q, Cheng SY, Chen ZC, Li HY, Shan JJ, Cheng KL, Zeng WJ. Dehydroepiandrosterone attenuates pulmonary artery and right ventricular remodeling in a rat model of pulmonary hypertension due to left heart failure. *Life Sci* 2019;219:82-9. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.12.056>
34. Silva AF, Sousa-Nunes F, Faria-Costa G, Rodrigues I, Guimaraes JT, Leite-Moreira A, Henriques-Coelho T, Negro R, Moreira-Goncalves D. Effects of chronic moderate alcohol consumption on right ventricle and pulmonary remodelling. *Exp Physiol* 2021;106:1359-72. <https://doi.org/10.1113/EP088788>
35. Jakoubek V, Hampl V. Alcohol and fetoplacental vasoconstrictor reactivity. *Physiol Res* 2018;67:509-13. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933609>
36. Herget J, Paleček F. Pulmonary arterial blood pressure in closed chest rats. Changes after catecholamines, histamine and serotonin. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1972;198:107-17.
37. Beitl E, Baňasová A, Míková D, Hampl V. Nitric oxide as an indicator for severity of injury in polytrauma. *Bratisl Med J* 2016;117:217-20. https://doi.org/10.4149/BLL_2016_041
38. Agarwal R, Chase SD. Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J Chromatogr B* 2002;775:121-6. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00273-8](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00273-8)
39. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005;15:316-28. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>
40. Chalupsky K, Kracun D, Kanchev I, Bertram K, Grolach A. Folic acid promotes recycling of tetrahydrobiopterin and protects against hypoxia-induced pulmonary hypertension by recoupling endothelial nitric oxide synthase. *Antioxid Redox Signal* 2015;23:1076-91. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6329>
41. McMurtry MS, Bonnet S, Michelakis ED, Bonnet S, Haromy A, Archer SL. Statin therapy, alone or with rapamycin, does not reverse monocrotaline pulmonary arterial hypertension: the rapamycin-atorvastatin-simvastatin study. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L933-L40. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00310.2006>

42. Sun X, Ku DD. Rosuvastatin provides pleiotropic protection against pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy, and coronary endothelial dysfunction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H801-H9. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01112.2007>
43. Stroes E. Statins and LDL-cholesterol lowering: an overview. *Curr Med Res Opin* 2005;21:S9-S16. <https://doi.org/10.1185/030079905X59102>
44. Kopec G, Waligora M, Tyrka A, Jonas K, Pencina MJ, Zdrojewski T, Moertl D, Stokwizewski J, Zagodzón P, Podolec P. Low-density lipoprotein cholesterol and survival in pulmonary arterial hypertension. *Sci Rep* 2017;7:41650. <https://doi.org/10.1038/srep41650>
45. Dumas de La Roque E, Savineau JP, Metivier AC, Billes MA, Kraemer JP, Doutreleau S, Jougon J, Marthan R, Moore N, Fayon M, Baulieu EE, Dromer C. Dehydroepiandrosterone (DHEA) improves pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a pilot study. *Ann Endocrinol* 2012;73:20-5. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2011.12.005>
46. Vonk Noordegraaf A, Galie N. The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev* 2011;20:243-53. <https://doi.org/10.1183/09059180.00006511>
47. all MK, Waypa GB, Mungai PT, Nielsen JM, Czech L, Dudley VJ, Beussink L, Dettman RW, Berkelhamer SK, Steinhorn RH, Shah SJ, Schumacker PT. Regulation of hypoxia-induced pulmonary hypertension by vascular smooth muscle hypoxia-inducible factor-1 α . *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:314-24. <https://doi.org/10.1164/rccm.201302-0302OC>
48. Peng W, Hoidal JR, Farrukh IS. Role of a novel KCa opener in regulating K⁺ channels of hypoxic human pulmonary vascular cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:737-45. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.20.4.3390>
49. Sehra D, Sehra S, Sehra ST. Cardiovascular pleiotropic effects of statins and new onset diabetes: is there a common link: do we need to evaluate the role of KATP channels? *Expert Opin Drug Saf* 2017;16:823-31. <https://doi.org/10.1080/14740338.2017.1338269>
50. Chen Y, Zhang H, Liu H, Cao A. Mechanisms of simvastatin-induced vasodilatation of rat superior mesenteric arteries. *Biomed Rep* 2016;5:491-6. <https://doi.org/10.3892/br.2016.756>
51. Teisseyre A, Uryga A, Michalak K. Statins as inhibitors of voltage-gated potassium channels Kv1.3 in cancer cells. *J Mol Struct* 2021;1230:129905. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.129905>
52. Cheong A, Li J, Sukumar P, Kumar B, Zeng F, Riches K, Munsch C, Wood IC, Porter KE, Beech DJ. Potent suppression of vascular smooth muscle cell migration and human neointimal hyperplasia by KV1.3 channel blockers. *Cardiovasc Res* 2011;89:282-9. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq305>
53. Yang S, Gu YY, Jing F, Yu CX, Guan QB. The effect of statins on levels of dehydroepiandrosterone (DHEA) in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Med Sci Monit* 2019;25:590-7. <https://doi.org/10.12659/MSM.914128>
54. Pascale RM, Simile MM, De Miglio MR, Nufri A, Seddaiu MA, Muroli MR, Danni O, Rao KN, Feo F. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity and gene expression by dehydroepiandrosterone in preneoplastic liver nodules. *Carcinogenesis* 1995;16:1537-42. <https://doi.org/10.1093/carcin/16.7.1537>
55. Hampl V, Bíbová J, Ošťádalová I, Povýšilová V, Herget J. Gender differences in the long-term effects of perinatal hypoxia on the pulmonary circulation in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L386-L92. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00389.2002>
56. Goldman N, Gleib DA. Sex differences in the relationship between DHEAS and health. *Exp Gerontol* 2007;42:979-87. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.05.005>
57. Karp I, Chen S-F, Pilote L. Sex differences in the effectiveness of statins after myocardial infarction. *CMAJ* 2007;176:333-8. <https://doi.org/10.1503/cmaj.060627>

Hypoxia-inducible factors activator, roxadustat, increases pulmonary vascular resistance in rats

Tomáš Novák¹

Marie Žaloudíková¹

Pavλίna Smolková¹

Barbora Kaftanová¹ (<https://orcid.org/0000-0001-9199-1732>)

Johana Edlmanová¹

Kryštof Krása^{1,2}

Václav Hampel^{1*} (<https://orcid.org/0000-0001-5776-4624>)

¹Department of Physiology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

²Department of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University and Military University Hospital, Prague, Czech Republic

Correspondence: Physiology, 2.LF UK, Plzeňská 311, Prague 5, Czech Republic

Short title: HIF activator increases pulmonary vascular resistance

Summary:

Activators of hypoxia inducible factors (HIFs), such as roxadustat, are promising agents for anemia treatment. However, since HIFs are also involved in regulation of the pulmonary circulation, we hypothesized that roxadustat increases pulmonary vascular resistance and vasoconstrictor reactivity. Using isolated, cell-free solution perfused rat lungs we found perfusion pressure-flow curves to be shifted to higher pressures, even though not as much as by chronic hypoxic exposure.

Vasoconstrictor reactivity to angiotensin II and acute hypoxic challenges was not altered by roxadustat. The puropoted ACE2 activator, diminazene aceturate (DIZE), produced paradoxical, unexplained pulmonary vasoconstriction. We conclude that the risk of pulmonary hypertension in patients treated with roxadustat is not grave but real and its monitoring is advisable.

Key words

pulmonary hypertension; hypoxia-inducible factor; ACE2; diminazene aceturate

One of the important contributors to pulmonary hypertension, a frequent disorder associated with significant morbidity and mortality, is chronic hypoxia [1].

Expression of a large number of genes is adjusted to oxygen availability through the hypoxia-inducible factor (HIF) family of transcription factors [2]. Many of the pulmonary vascular changes in chronic hypoxia are mediated by HIFs [3].

As the first gene for which HIF regulation was described was erythropoietin [2], pharmacological interference with the HIF system has been investigated as a possible therapy for anemia. Of particular interest is a group of agents (e.g. roxadustat) that inhibit prolyl hydroxylases [4]. HIFs are heterodimers. While the β subunit is stable, the α subunit is labeled by ubiquitination in the presence of oxygen and degraded. Thus, the dimer cannot form and the expression of genes controlled by HIFs does not occur. When oxygen is deficient, ubiquitination is limited, the α subunit survives, forms a dimer with the β subunit, and transcription of corresponding genes ensues. The enzyme that utilizes oxygen to initiate ubiquitination of the α subunit is prolyl hydroxylase [2]. Pharmacological inhibition of this enzyme in normoxia therefore acts on the HIF system similarly to hypoxia, limiting the degradation of the α -subunit and thus allowing the formation of a complete HIF dimer. Thus, pharmacological inhibition of prolyl hydroxylase stimulates erythropoiesis. This appears useful especially in anemic patients with chronic renal failure [5].

A potential concern with the use of these agents, however, is the risk of pulmonary hypertension, inasmuch HIF activation is part of its mechanism [3]. Endothelial prolyl hydroxylase 2 gene knockout induces pulmonary hypertension in mice [6]. Attenuation of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) activity by roxadustat [4] may also work to the detriment of patients, as ACE2 counteracts pulmonary hypertension [7].

This study therefore evaluated the effect of roxadustat on lung vascular resistance and vasoreactivity and its alteration by an ACE2 stimulator, diminazene aceturate (DIZE) [8].

Methods

The experiments were performed using adult male Wistar rats (AnLab, Prague, Czech Republic) in accordance with the European Guidelines on Laboratory Animal Care. They were approved by the Ministry of Education, Youth and Sports as the Czech Republic's authority competent to approve experimental projects pursuant to the Animal Protection Act. Rats were kept at room temperature with free access to standard diet (AnLab) and tap water.

One group was treated with roxadustat for 2 weeks (group Rox2w, n=9). Five milligrams of roxadustat (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA; all other drugs were from Sigma-Aldrich, Prague, Czechia) were dissolved in 25 μ l DMSO + 200 μ l PEG + 25 μ l TWEEN 80 + 250 μ l water and injected i.p. (10 mg/kg BW) every other day [4,9]. Since we expected that it will increase hematocrit, which itself elevates pulmonary vascular resistance, we used another group that received roxadustat only once and was studied 48 h later, so that any pulmonary vascular mechanisms controlled by HIF could be altered, but the effect on hematocrit has not yet manifested (Rox2d, n=9). A control group was treated the same way as Rox2w, except that they were injected with solvent without roxadustat (n=8). To check for possible effects of the solvent itself, a group was included that was not treated in any way (untreated group, 0Tx, n=5). To compare the results with a situation of naturally elevated HIFs, the last group was treated identically to controls, except that it was exposed to chronic hypoxia (10% O₂) for the two weeks of solvent injections (group CH, n=6).

The pulmonary vasoconstrictive properties were evaluated by analyzing the perfusion pressure-flow (P/Q) relationship in isolated lungs perfused *ex vivo* at 40 ml/min/kg BW with a cell-free Krebs solution with 4% albumin (to exclude the confounding effect of hematocrit variations) and ventilated with air + 5% CO₂ at 60 breaths/min with a +2 cmH₂O end-expiratory pressure [10,11]. Before lung isolation, the rats were anesthetized with thiopental (30 mg/kg BW i.p.) and a blood sample was taken by cardiac puncture to measure hematocrit. The P/Q relationship was determined by measuring the pressure while the perfusion was first stopped for ~30 sec and then increased to 36 ml/min/kg BW in 3 even steps (~30 sec each). Since the P/Q relationship in this range appeared close to linear, it was evaluated with linear regression ($R^2 > 0.8925$).

Vasoconstrictor reactivity was then tested by injecting angiotensin II (0.15 μ g) into the inflow line, followed, after perfusion pressure stabilization (~8 min), with ventilatory hypoxia (0% O₂ + 5% CO₂, 10 min). This angiotensin II + acute hypoxia sequence was repeated once more. DIZE (0.1 mM) was then

added to the perfusate and after a 10-min stabilization, the whole protocol (P/Q, angiotensin II and acute hypoxia twice) was repeated.

The results were analyzed statistically with Prism 9.5 software (GraphPad Software, Boston, MA, USA) and presented as means±SD. Groups were compared using one-way ANOVA with Fisher's LSD test. The P/Q curves before and after DIZE administration were evaluated separately in each group using two-way repeated measures ANOVA. The vasoconstrictor responses before and after DIZE were compared separately for each group with paired t-test. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Chronic but not acute roxadustat treatment increased hematocrit compared both to control and untreated group, but not as much as chronic hypoxia (Table).

Baseline perfusion pressure in the isolated lungs was higher in the Rox2d group (9.8 ± 1.6 mmHg) than in controls (7.9 ± 1.8 , $P=0.0364$). It was even higher in the CH group (13.0 ± 2.0), compared both to controls and untreated ($P < 0.0001$) and to both roxadustat groups ($P \leq 0.0011$). It was 9.2 ± 1.9 mmHg in the Rox2w group.

The slope of the P/Q regression lines did not differ among the groups (i.e. the lines were parallel), whereas the intercept with the pressure axis was increased by roxadustat already after 2 days (4.2 ± 1.5 mmHg) and did not further change after 2 weeks (3.9 ± 1.5) compared to control (2.6 ± 1.4 , $P \leq 0.0427$) and untreated (1.5 ± 0.8 , $P \leq 0.003$) groups (that did not differ one from another). The pressure axis intercept was even higher in the CH group (7.6 ± 1.1 , $P < 0.0001$ vs. all other groups). The P/Q pressure axis intercept corresponds to the critical closing pressure of the pulmonary vasculature [12].

Consistent with this, the value at which the perfusion pressure equilibrated when perfusion was stopped did not differ between control (0.1 ± 0.6 mmHg) and untreated (-0.2 ± 0.5 , $P=0.6737$) groups, but was elevated similarly ($P < 0.05$) in the R2d (0.8 ± 0.4) and R2w (0.8 ± 0.6) groups and even more so in the CH group (2.1 ± 1.3 , $P \leq 0.0028$). The stop-flow pressure reflects critical closing pressure (if

critical closing pressure was zero, then the pressure on the inflow side should equilibrate with the outflow pressure of -2 cm H₂O).

The vasoconstrictor reactivity to angiotensin II was potentiated by chronic hypoxia, but was not altered by Roxadustat compared to control or untreated rats. It was higher in the Rox2w than Rox2d group (Table). Reactivity to acute hypoxic challenges did not differ among the groups.

DIZE did not alter the P/Q lines in the control and R2d groups, but it shifted them to higher pressures in the OTx, R2w and CH groups (Figure). The vasoconstrictor responses to acute hypoxia were not altered, while those to angiotensin II rose after DIZE in controls (to 18.2±6.8 mmHg, $P=0.0148$ vs. before DIZE), Rox2d (11.5±6.2, $P=0.0387$) and Rox2w (17.8±6.1, $P=0.0004$) groups, but not in the CH group (19.6±6.2, $P=0.3171$).

These data show that inhibition of prolyl hydroxylases (and thus HIF activation) by roxadustat elevates pulmonary vascular critical closing pressure, thus shifting pressures over a range of flow rates to higher values. This effect is independent of the influence of roxadustat on hematocrit, but is smaller than the established pulmonary hypertension model of chronic hypoxia. In line with our previous observations that essential changes in the development of chronic hypoxic pulmonary hypertension occur during the first days of hypoxic exposure [13], the effect of roxadustat on the pulmonary circulation is faster (already after 2 days) than on hematocrit. Since we detected the effect of roxadustat in lungs perfused with a cell-free solution, it is likely that *in vivo*, where the positive effect of roxadustat on hematocrit is also present, its effect on pulmonary vascular resistance will be even greater.

Acute pulmonary vasoconstrictor reactivity (to angiotensin II and 0%O₂) was not affected by roxadustat. This is surprising, inasmuch roxadustat was reported to downregulate vascular A1 receptors [14]. Furthermore, the expression and activity of voltage-gated K⁺ channels, important in the mechanism of acute hypoxic vasoconstriction [15], are affected by HIFs [3]. Our data suggest that this influence is not particularly severe.

Antitrypanosomal drug DIZE and ACE2 stimulator [8] was reported useful in cardiovascular disorders including experimental pulmonary hypertension [16]. Our findings of the P/Q lines shifted to higher pressures and potentiated angiotensin II reactivity in most of our experimental groups is thus surprising. It is likely that some DIZE actions other than ACE2 activation played a role. One possibility could be interference with acid-sensitive ion channels [17], recently shown to be important in pulmonary vascular smooth muscle regulation [18]. Although we do not understand this paradoxical effect of DIZE, we consider useful reporting it.

In conclusion, the risk of HIF stabilizer-induced pulmonary hypertension is real and worth considering, especially as pulmonary hypertension is a common complication of chronic kidney disease even without such treatment [19]. Fortunately, increased pulmonary vasoconstrictor reactivity, which would be an additional risk factor, does not occur with roxadustat. HIFs do not seem to play a significant role in hypoxic pulmonary vasoconstriction. Lastly, ACE2 stimulator, DIZE, may cause paradoxical pulmonary vasoconstriction.

Acknowledgments.

Funded by the Charles University Grant Agency grant # 438322.

Table: Hematocrit and vasoconstrictor reactivity (second repetition of the challenges)

Group	Hematocrit (%)	Angiotensin II (Δ perfusion pressure, mmHg)	Acute 0% O ₂ (Δ perfusion pressure, mmHg)
OTx	39.6±2.3	9.8±5.1	23.8±9.8
Control	39.7±2.5	10.8±5.6	23.3±12.5
Rox2d	41.8±2.3	7.4±2.3	17.1±7.4
Rox2w	46.6±1.8**†††††	12.8±6.0 [†]	26.5±11.4
CH	49.8±1.7**†††††§	20.9±5.7**†††††§§	28.6±8.6

* $P < 0.01$ vs. Control

** $P \leq 0.0008$ vs. Control

[†] $P < 0.01$ vs. OTx

^{††} $P < 0.001$ vs. OTx

^{†††} $P < 0.0001$ vs. OTx

[†] $P = 0.0284$ vs. Rox2d

^{††} $P \leq 0.0004$ vs. Rox2d

[§] $P < 0.05$ vs. Rox2w

^{§§} $P = 0.0049$ vs. Rox2w

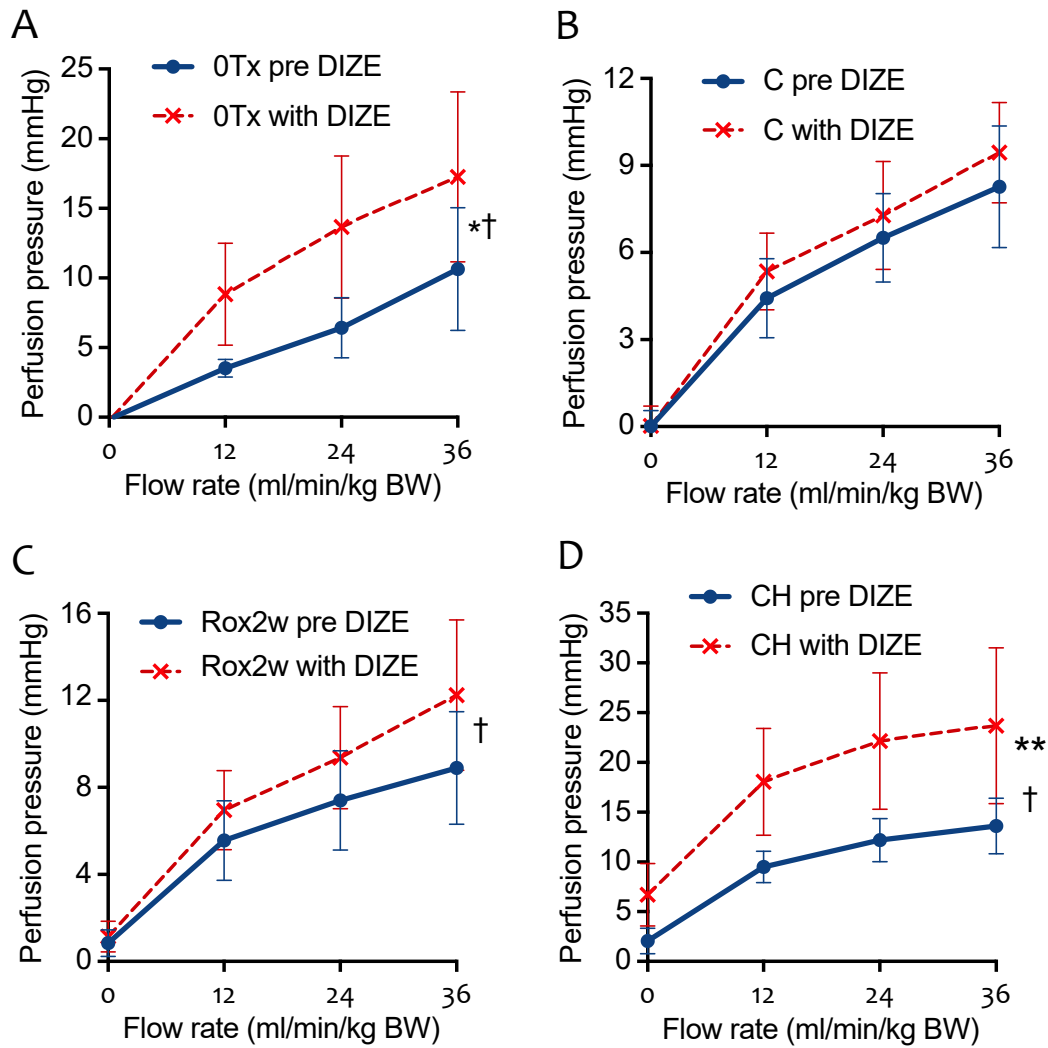


Figure: Perfusion pressure-flow curves are shifted to higher pressures by diminazene aceturate (DIZE) in untreated (OTx; A), roxadustat-treated (for 2 weeks, Rox2w; panel C) and chronically hypoxic (CH; D), but not control (C, panel B) and roxadustat-treated (once before the measurement, Rox2d, not shown) groups.

Flow was a significant source of variation in all groups ($P < 0.0001$, two-way repeated measures ANOVA).

* $P = 0.0453$ effect of group

** $P = 0.0064$ effect of group

† $P \leq 0.0055$ effect of group x flow interaction

References

1. Suresh K, Shimoda LA. Lung circulation. *Compr Physiol* 2016;6:897-943.
2. Semenza GL. Regulation of physiological responses to continuous and intermittent hypoxia by hypoxia-inducible factor 1. *Exp Physiol* 2006;91:803-6.
3. Pullamsetti SS, Mamazhakypov A, Weissmann N, Seeger W, Savai R. Hypoxia-inducible factor signaling in pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2020;130:5638-51.
4. Keeley T, Zhuang X, Lee J, Prange-Barczynska M, Tsukuda S, Morgan S, Harding A et al. Hypoxic and pharmacological activation of HIFs inhibits SARS-CoV-2 infection of lung epithelial cells. *Cell Reports* 2021;35:109020.
5. Chen N, Hao C, Peng X, Lin H, Yin A, Hao L, Tao Y et al. Roxadustat for anemia in patients with kidney disease not receiving dialysis. *N Engl J Med* 2019;381:1001-10.
6. Tang H, Babicheva A, McDermott KM, Gu Y, Ayon RJ, Song S, Wang Z et al. Endothelial HIF-2 α contributes to severe pulmonary hypertension due to endothelial-to-mesenchymal transition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2018;314:L256-L75.
7. Hampl V, Herget J, Bíbová J, Baňasová A, Husková Z, Vaňourková Z, Jíchová Š et al. Intrapulmonary activation of the angiotensin-converting enzyme type 2/angiotensin 1-7/G-protein-coupled Mas receptor axis attenuates pulmonary hypertension in Ren-2 transgenic rats exposed to chronic hypoxia. *Physiol Res* 2015;64:25-38.
8. Qaradakh T, Gadanec LK, McSweeney KR, Tacey A, Apostolopoulos V, Levinger I, Rimarova K et al. The potential actions of angiotensin-converting enzyme II (ACE2) activator diminazene aceturate (DIZE) in various diseases. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2020;47:751-8.
9. Burmakin M, Fasching A, Kobayashi H, Urrutia AA, Damdimopoulos A, Palm F, Haase VH. Pharmacological HIF-PHD inhibition reduces renovascular resistance and increases glomerular filtration by stimulating nitric oxide generation. *Acta Physiol* 2021;233:e13668.
10. Bělohávková S, Šimák J, Kokešová A, Hniličková O, Hampl V. Fenfluramine-induced pulmonary vasoconstriction: role of serotonin receptors and potassium channels. *J Appl Physiol* 2001;91:755-61.
11. Herget J, Chovanec M. Isolated perfused murine lung: a well characterized preparation for studying lung vascular function. *Drug Discovery Today: Disease Models* 2010;7:131-5.
12. Dawson CA, Linehan JH, Bronikowski TA: Pressure and flow in the pulmonary vascular bed. In: *Pulmonary Vascular Physiology and Pathophysiology*. EK Weir, JT Reeves (eds), Marcel Dekker, New York, 1989, pp 51-105.
13. Hampl V, Bíbová J, Baňasová A, Uhlík J, Miková D, Hniličková O, Lachmanová V et al. Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L11-L20.
14. Yu J, Wang S, Shi W, Zhou W, Niu Y, Huang S, Zhang Y et al. Roxadustat prevents Ang II hypertension by targeting angiotensin receptors and eNOS. *JCI Insight* 2021;6:e133690.
15. Archer SL, London B, Hampl V, Wu X, Nsair A, Puttagunta L, Hashimoto K et al. Impairment of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice lacking the voltage gated potassium channel, Kv1.5. *FASEB J* 2001;15:1801-3.

16. Shenoy V, Gjymishka A, Jarajapu YP, Qi Y, Afzal A, Rigatto K, Ferreira AJ et al. Diminazene attenuates pulmonary hypertension and improves angiogenic progenitor cell functions in experimental models. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:648-57.
17. da Silva Oliveira GL, de Freitas RM. Diminazene aceturate - An antiparasitic drug of antiquity: Advances in pharmacology & therapeutics. *Pharmacol Res* 2015;102:138-57.
18. Jernigan NL, Naik JS, Resta TC. Acid-sensing ion channel 1 contributes to pulmonary arterial smooth muscle cell depolarization following hypoxic pulmonary hypertension. *J Physiol* 2021;
19. Edmonston DL, Parikh KS, Rajagopal S, Shaw LK, Abraham D, Grabner A, Sparks MA et al. Pulmonary hypertension subtypes and mortality in CKD. *Am J Kidney Dis* 2020;75:713-24.

A simple model of reactive pulmonary hypertension in left heart pressure overload induced by partial intravascular occlusion of ascending aorta

Milan Chovanec^{1,2}, Jana Ďurišová¹, Olga Vajnerová¹, Alena Baňasová¹, Martin Vízek³, Marie Žaloudíková¹, Jiří Uhlík⁴, Kryštof Krása^{1,5}, Václav Hampl¹, Jan Herget¹¹

1. Department of Physiology, Second Medical School, Charles University, Plzeňská 311, Prague 5, Czech Republic (jana.durisova@lf2.cuni.cz, olga.vajnerova@lf2.cuni.cz, alena.banasova@lf2.cuni.cz, marie.zaloudikova@lf2cuni.cz, vaclav.hampl@lf2.cuni.cz)
2. Department of Cardiology, Na Homolce Hospital, Roentgenova 37, Prague 5, Czech Republic (mchovanec@seznam.cz)
3. Department of Pathophysiology, Second Medical School, Charles University, Plzeňská 311, Prague 5, Czech Republic (martin.vizek@lf2.cuni.cz)
4. Department of Histology and Embryology, Second Medical School, Charles University, Plzeňská 311, Prague 5, Czech Republic (jiri.uhlik@lf2.cuni.cz)
5. Department of Internal Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and Military University Hospital, U Vojenské nemocnice, Prague 6, Czech Republic (kry.krasa@gmail.com)

Running title: Simple model of reactive pulmonary hypertension in left heart disease

Number of words in the paper (without references and figure legends): 4447

Number of references: 55

¹ Professor Jan Herget, M.D. passed away before the final version of the manuscript was completed.

New findings:

- What is the central question of this study?
 - Can pulmonary hypertension caused by left heart pressure overload be adequately modelled by a simple procedure of partial intravascular aortic obstruction?

- What is the main finding and its importance?
 - Partial aortic obstruction achieved via carotid artery access without opening the chest, and thus without lengthy recovery of seriously ill rats, models the left heart pressure overload with pulmonary hypertension that has a precapillary and a vasoconstrictive, as well as vascular remodelling components.
 - The procedure offers a new and simple model of group 2 pulmonary hypertension (secondary to left heart disease).

Abstract:

Pulmonary hypertension is a group of diseases characterised by elevated pulmonary artery pressure and pulmonary vascular resistance with significant morbidity and mortality. The most prevalent type is secondary to left heart pressure overload (referred to as group 2, PH2). The available experimental models of PH2 use partial pulmonary clamping by technically non-trivial open chest surgery with lengthy recovery. Here, we introduce a simple model, in which reduction of the ascending aorta cross-sectional area is achieved not by external clamping, but by partial intravascular obstruction without opening the chest. In anaesthetised rats, a blind polyethylene tubing was advanced from the right carotid artery to just above the aortic valve. The procedure is quick (~10 min) and easy to learn. Mortality does not exceed 10% in young adult rats. Three weeks later, the presence of left heart pressure overload was confirmed by measuring left ventricular end-diastolic pressure by direct puncture (1.3 ± 0.2 vs. 0.4 ± 0.3 mmHg in controls, mean \pm SD, $P < 0.0001$). The presence of pulmonary hypertension was documented by measuring pulmonary artery pressure by catheterisation in vivo (22.3 ± 2.3 vs. 16.9 ± 2.7 mmHg, $P = 0.0282$) and by detecting right ventricular hypertrophy and increased muscularisation of peripheral pulmonary vessels. Contributions of vasoconstriction and of precapillary vascular segment to the increased pulmonary vascular resistance were demonstrated, respectively, by normalisation of resistance by a vasodilator, sodium nitroprusside, and by arterial occlusion technique in isolated lungs. These changes were mostly comparable, but not additive, to those induced by an established pulmonary hypertension model, chronic hypoxic exposure. Intravascular partial aortic obstruction thus offers an easy model of pulmonary hypertension induced by left heart disease that has a vasoconstrictor and precapillary component.

Keywords: reactive pulmonary hypertension, left ventricle pressure overload, chronic hypoxia, rat, pulmonary artery pressure, group 2 pulmonary hypertension, model, method, heart failure with preserved ejection fraction, pulmonary vascular reactivity

List of abbreviations:

- BW–body weight
- C – control group
- %DL – percentage of peripheral pulmonary vessels that are double-laminated (have two layers of elastic laminae with a smooth muscle layer between them)
- H – group exposed to hypoxia for 3 weeks
- LV+S – left ventricle plus septum
- Δ Pa–arterial pressure drop – the difference between the baseline perfusion pressure in isolated lungs and the inflection point separating the rapid and the gradual phases of pressure drop after the inflow occlusion, reflecting the precapillary resistance
- PAO – group measured 3 weeks after partial aortic occlusion
- PAO+H –group measured 3 weeks after partial aortic occlusion spent in hypoxia
- PAP – pulmonary artery pressure
- PH2 – group 2 pulmonary hypertension (induced by left heart disease)
- RV – right ventricle
- RV/LV+S–right ventricle/left ventricle plus septum weight ratio

Introduction:

Pulmonary hypertension is a group of diseases of various origins associated with high morbidity and mortality. It is characterised by elevated pulmonary artery pressure (PAP) and pulmonary vascular resistance that induce right ventricle (RV) hypertrophy and eventually failure (Galie *et al.*, 2016). In the western population, pulmonary hypertension is most often induced by left heart disease (clinically classified as group 2 pulmonary hypertension, PH2), the prognosis of which it worsens significantly (Galie *et al.*, 2016; Wijeratne *et al.*, 2018; Vachiery *et al.*, 2019). The increase in PAP in PH2 is caused primarily by passive transmission of elevated left atrial pressure upstream (venous, postcapillary pulmonary hypertension) (Boucherat *et al.*, 2022). Often, however, the PAP is elevated further by active vasoconstriction of the pulmonary arterioles and/or by pulmonary arteriolar remodelling. When both components, venous and arterial, are present, PH2 is classified as reactive (Ross, 1976; Gerges *et al.*, 2013; Guazzi, 2014). Reactive pulmonary hypertension accounts for at least 15% of all cases of pulmonary hypertension (Vachiery *et al.*, 2013).

Currently, no effective treatment is available to reduce the morbidity and mortality of patients with PH2 (Vachiery *et al.*, 2019). In fact, vasodilator therapy, which is quite useful in group 1 pulmonary hypertension, may actually be risky in PH2 patients, probably because vasodilators release precapillary vasoconstriction that partly protects the microcirculation from excessive filtration at elevated outflow pressures (Breitling *et al.*, 2015). There is relatively little information available on the pathophysiological mechanisms involved in the development of the arterial component of reactive PH2. The factors that determine the transition of PH2 from passive to reactive form are not known (Breitling *et al.*, 2015; Al-Omary *et al.*, 2020). Suitable animal models are essential for advancement of this knowledge (Boucherat *et al.*, 2022).

The available models used to study PH2 use one of three main strategies (Boucherat *et al.*, 2022). One is to inflict injury on the left ventricle that leads to its failure. Examples include myocardial infarction by coronary binding (Jasmin *et al.*, 2003; Jasmin *et al.*, 2004) or experimental metabolic syndrome (Lai *et al.*, 2016). These models closely mimic specific clinical situations, but the effects on the pulmonary circulation might be confounded by other effects of the primary experimental insult. Another approach is to directly increase the left ventricular pressure overload by increasing the resistance of the left ventricle outflow tract. This is achieved by partial external clamping or binding of the ascending aorta in mice

(Rockman *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2012) or, much more often, rats (supracoronary aortic banding) (Dai *et al.*, 2004; Hentschel *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2009; Kerem *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2011; Hunt *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016; Breitling *et al.*, 2017; Ranchoux *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020; Lambert *et al.*, 2021). The third possibility is to partially clamp the large pulmonary veins, but this was only reported in larger animals (pigs) (Aguero *et al.*, 2014; Pereda *et al.*, 2014; van Duin *et al.*, 2019).

The common denominator of these models is that they require prolonged recovery of seriously sick animals from open chest surgery. The surgery itself is more or less complicated and takes non-trivial time and failed attempts to learn. Therefore, a technically easier model using small laboratory rodents (to reduce costs) is desirable. Here, we introduce a new, simple rat model of PH2 that is based on the idea that reduction of the internal cross-sectional area of the aorta can be achieved not only by partial compression from the outside, but also by partial obstruction from the inside. We describe the procedure of partial aortic obstruction via intravascular approach (through carotid artery) without opening the chest and document that it does indeed result in pulmonary hypertension. In addition, we show that this pulmonary hypertension is of the reactive type. Since chronic hypoxemia is common in PH2, we also studied the effect of chronic exposure to hypoxia on our model.

Methods:

Ethics Approval

Experiments were performed on adult male Wistar rats (from AnLab, Prague, Czech Republic) in accordance with the EU regulation for using experimental animals. All procedures and protocols were approved by the Animal Studies Committee of the Charles University Second Medical School and by the Ministry of Education, Youth and Sports as the Czech Republic's authority competent to approve experimental projects pursuant to the Animal Protection Act (decision #5682/2020-2). The project was carried out with detailed understanding of the ethical principles of this journal by all authors and in accordance with its animal ethics checklist.

The rats were kept at room temperature with free access to the standard food diet (AnLab) and tap water. For all surgical procedures, they were anaesthetised with 30 mg.kg⁻¹ body weight (BW), IP. (all drugs and chemicals were obtained from Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic). The length of any surgical procedure rarely exceeded ~15 min. The sufficient depth of anaesthesia was regularly checked by the absence of a reaction to light touch of the cornea with a piece of paper tissue. After measurements, rats were sacrificed by intracardial thiopental overdose or by removing their heart under deep anaesthesia.

Partial intravascular obstruction of the aorta

In anesthetized, spontaneously breathing rats, the right carotid artery was accessed and, through a small incision in its wall, a polyethylene tubing (o.d. 0.96 mm, length 25 mm) closed at the distal end, was introduced into the ascending aorta and advanced so that its tip was just above the aortic valve. The distal end of the tubing was then attached to the carotid artery with a suture. The distance between the incision in the carotid artery and the aortic valve was ~25 mm in rats 180 - 230 g BW.

Experimental groups and protocols

We used the following experimental groups:

- Controls (group C; no intervention);

- Rats with partial aortic obstruction studied 3 weeks after the procedure (PAO group);
- Rats with partial aortic obstruction exposed to chronic hypoxia for 3 weeks (PAO+H group; $F_{I_{O_2}} = 0.1$ starting the second day after partial aortic obstruction);
- Hypoxic controls (H group; exposed to hypoxia as the PAO+H group, but with no aortic obstruction).

Five separate studies (A-E) were performed:

Study A - confirming left ventricle failure

In study A, we confirmed that our method indeed did produce left ventricle failure. We measured left ventricle diastolic pressure in anesthetized, mechanically ventilated (through tracheostomy) rats with chest open by midline sternotomy by punching the left ventricular wall with a needle connected to a pressure transducer. Heart rate was also determined from pressure recordings. Only the PAO and C groups were used in Study A.

Study B – detecting the presence of pulmonary hypertension

We measured PAP in anaesthetised, intact chest, spontaneously breathing rats as previously described (Herget & Paleček, 1972; Herget *et al.*, 2003; Hampl *et al.*, 2006). Briefly, the right jugular vein was accessed from a midline throat skin cut and blunt dissection. It was then cannulated through a small incision by a heparinized polyethylene catheter (1.1 mm o.d. and 0.75 mm i.d.) contained within a polyethylene introducer (1.2 mm i.d.). Just prior to the procedure, the introducer was thermoplastically precast into a hockey-stick form in order to ease its access into the RV through the right atrium, and the catheter itself was thermoplastically moulded into a U-shaped form to facilitate turning the tip of the catheter back into the pulmonary artery when it was forwarded from the introducer after it had penetrated into the RV from the right atrium. The progress of the catheterisation procedure was monitored in real time by reading the shape of the pressure waves as they changed from the right atrium through the RV into the pulmonary artery (Herget & Paleček, 1972). Once the catheter was in the pulmonary artery, the introducer was removed. After a stable PAP recording was obtained for several minutes, the chest was opened by sternotomy and the position of the catheter tip in the pulmonary artery was verified.

The heart was cut out and the weights of the heart ventricles were measured in a fresh state to determine their changes in response to pressure overload. The reversibility of heart changes was checked in a supplementary experimental group - rats studied 3 weeks after removing the cannula that had been in place for 3 weeks.

Study C - contribution of pulmonary arteries to PH

In study C, our aim was to distinguish whether pulmonary hypertension was caused just by passive upstream transmission of increased left heart pressure or whether elevated pulmonary arterial resistance participated in increased PAP. Measurements were performed in isolated lungs perfused *ex vivo* with Krebs solution with 4% albumin (Hampl *et al.*, 2000; Bělohávková *et al.*, 2001; Herget & Chovanec, 2010) using an inflow occlusion technique to determine the arterial portion of pulmonary vascular resistance (Herget & Kuklík, 1995; Hampl *et al.*, 2000). When the inflow into the pulmonary artery is rapidly occluded, the pressure measured in the very short segment of the perfusion circuit between the site of occlusion and the input into the pulmonary artery first drops very rapidly. This almost linear drop is followed by a much slower fade-off phase (Figure 1). It was demonstrated that the difference between the baseline perfusion pressure and the inflection point separating the rapid and the gradual phases of pressure drop after the inflow occlusion (Δ Pa) reflects the arterial component of total pulmonary vascular resistance (Hakim *et al.*, 1982; Linehan & Dawson, 1983; Dawson *et al.*, 1988).

Meclofenamate (17 μ M) and L-NAME (50 μ M) were added to the perfusate to exclude prostaglandins and nitric oxide involvement, respectively (Hampl & Herget, 2000; Bělohávková *et al.*, 2001; Herget & Chovanec, 2010). The isolated lungs were ventilated at 50 breaths/min with a maximum inspiratory pressure of +10 cm H₂O and an end-expiratory pressure of +2.0 cm H₂O. The moistened ventilation gas consisted of 21% O₂ + 5% CO₂ + 74% N₂. The perfusion flow rate was set to 40 ml/min/kg BW and the outflow pressure to -2 cm H₂O.

After stabilisation of the preparation for 10 minutes with normoxic ventilation, angiotensin II (0.2 μ g) was injected into the inflow line followed by ventilatory hypoxia (0% O₂ + 5% CO₂ + 75% N₂ for ~10 min). Both challenges were repeated again after a ~10 min resting period (normoxic ventilation). Then, ventilation (21% O₂) was arrested at the end of expiration

(alveolar pressure +2.0 cm of H₂O), and the inflow line was instantly clamped with an electromagnetically controlled clamp. The perfusion pump was shut off at the instant of inflow occlusion.

Study D - role of vasoconstriction

Study D used isolated perfused lungs as described above. After stabilization and priming with two cycles of angiotensin II injection and hypoxic ventilation (as in Study C), the relationship between perfusion flow rate (increased in a stepwise manner from 12 to 52 ml/min/kg BW, i.e. from 30 to 130% of the basal flow rate) and pressure (measured) was determined.

After another 5 minutes of stabilization at basal flow (40 ml/min/kg BW), sodium nitroprusside was added into the reservoir (20 µM concentration in the perfusate) to remove any vascular smooth tone, and the pressure-flow relationship was measured again 5 minutes later.

Since the pressure-flow relationship was nearly linear in the studied range of flow rates on visual inspection, linear regression was performed to analyse these data (Herget *et al.*, 1995; Hampl *et al.*, 2000). The slope of the pressure-flow line reflects the incremental resistance of the pulmonary circulation (Dawson *et al.*, 1989).

Study E – structural changes of small pre-alveolar vessels

The lungs were removed from deeply anaesthetised rats and filled with a neutral formol solution at a pressure of 12 cm H₂O through the trachea. They were then placed in the same solution for several days. Lung sections were cut and stained by haematoxylin and Weigert resorcin-fuchsin method to stain elastic fibres. Since the muscular layer is enclosed between two elastic laminae, whereas the nonmuscularized vessels have only one lamina in the media, the vascular muscularization was evaluated by counting all distal vessels bound to alveolar ducts or to alveoli (o.d. ≤ 300 µm) on one slide from each rat and determining the percentage of them having two elastic laminae (% double laminated vessels, %DL) (Herget *et al.*, 2003; Al-Hiti *et al.*, 2013). Only the PAO and C groups were used in Study E.

Statistical evaluation

Prism 9.5 (GraphPad Software, Boston, MA USA; RRID:SCR_002798) was used for statistical calculations. The groups were compared using one-way ANOVA followed by Fisher's least significant difference *post hoc* test. In studies A and E, where only two groups were used, an unpaired two-sided t-test was employed. In all cases, the level of significance was set *a priori* at $P < 0.05$. The results are presented as means \pm SD.

Results:

Our procedure of partial intravascular occlusion of the ascending aorta via carotid artery access in rats is simple and easy. It takes ~10 minutes to perform and mortality is ~10% in young adult rats (BW<250 g). Mortality was unacceptably high(~90%) for older rats (BW>250 g). A critical point of the procedure was to implant the tip of the tubing just above the aortic valve because implantation through the valve quickly leads to acute heart failure and death. We found the tubing of o.d. = 0.96 mm to be optimal in Wistar rats of 180 - 240 g BW.

Three weeks of partial aortic obstruction resulted in ~10% BW loss (Figure 2). As expected, chronic exposure to hypoxia also reduced BW (by ~20 %, significantly more than in the PAO group). This effect of chronic hypoxia was further markedly aggravated by simultaneous partial aortic obstruction (Figure 2).

Study A - confirming left ventricle failure

Induction of left heart pressure overload by our partial aortic obstruction procedure was confirmed by elevated left ventricular end-diastolic pressure in the PAO group compared to controls (Figure 3A). Heart rate was higher in the PAO group than in controls (Figure 3B).

Study B – detecting the presence of pulmonary hypertension

Mean PAP was significantly higher 3 weeks after partial aortic obstruction than in control rats (Figure 4A). Correspondingly, the RV weight was increased, both relative to BW and to the left ventricle plus septum (LV+S) weight (Figure 4B and 5A).

Chronic hypoxic exposure increased mean PAP (and RV weight) more than the partial aortic obstruction procedure (Figures 4 and 5A). Combining hypoxic exposure with partial aortic obstruction (group PAO+H) did not cause further statistically significant rise in mean PAP over the value in the group H. The RV weight /BW ratio was higher in the PAO+H than in H group (Figure 5A), but because the hypoxic exposure apparently aggravated the left ventricular failure, as judged from the higher LV+S weight/BW ratio in the PAO+H than in the PAO group (Figure 5B), the RV/LV+S weight ratio (RV/LV+S) did not differ between

the PAO+H and H groups (Figure 4B). Chronic hypoxia itself did not cause a statistically significant increase in the LV+S weight/BW ratio.

Heart hypertrophy induced by partial aortic occlusion was completely reversible. At the end of a 3-week recovery period after removal of the obstructing cannula from the ascending aorta, where it had been for 3 weeks, the LV+S weight/BW ratio was $1.64 \pm 0.13 \times 10^{-3}$ compared to $1.71 \pm 0.01 \times 10^{-3}$ in controls ($P = 0.3256$; $n = 8$ and 6). The RV weight /BW ratio was also normalised ($0.47 \pm 0.08 \times 10^{-3}$ vs $0.48 \pm 0.06 \times 10^{-3}$; $P = 0.6568$), as was the RV/LV+S (0.29 ± 0.06 vs. 0.28 ± 0.03 ; $P = 0.9026$). This "de-banding procedure" had zero mortality.

Study C - contribution of pulmonary arteries to pulmonary hypertension

Baseline perfusion pressure values in isolated lungs were pooled from Studies C and D because they were obtained under identical conditions. The baseline perfusion pressure was significantly higher 3 weeks after partial aortic obstruction than in control rats (Figure 6A). Chronic hypoxic exposure also increased baseline perfusion pressure, more so than in the PAO group. Combining partial aortic obstruction with chronic hypoxia did not further increase baseline perfusion pressure in isolated lungs over the values found in the PAO and H groups (Figure 6A).

The rapid portion of the perfusion pressure drop after arterial occlusion (ΔPa , reflecting precapillary resistance) was significantly larger after the partial aortic obstruction than in control lungs (Figures 1 and 6B). As expected, the arterial pressure drop was also enlarged in the lungs of rats exposed to chronic hypoxia. There was no significant difference in the arterial pressure drop between the PAO and H groups. Partial aortic obstruction and chronic hypoxia did not have any statistically significant cumulative effect on arterial pressure drop (Figure 6B).

Study D - role of vasoconstriction

Partial aortic obstruction resulted in an increased slope of the pressure-flow relationship in isolated lungs (Figure 7). Chronic hypoxia increased the slope of the pressure-flow line in a manner similar to partial aortic obstruction. Pressure axis intercept did not differ among the groups with the exception of PAO+H being higher than controls (5.8 ± 3.8 vs. 2.8 ± 3.6 mmHg, $P = 0.0074$; $n = 7$ /group).

Sodium nitroprusside had no appreciable effect on the pressure-flow line in the control group (Figures 7B and 8A). In the PAO group, sodium nitroprusside reduced the pressure-flow slope to a value close to that in controls (Figures 7B and 8B). In the H and PAO+H groups, the pressure-flow slopes did not differ significantly before and after sodium nitroprusside (Figures 7B and 8C and D); however, the whole lines were shifted parallelly towards lower pressures ($P = 0.0491$ and 0.0004 , respectively; $n = 7/\text{group}$).

The magnitude of the vasoconstrictor responses to angiotensin II were increased in the lungs from the PAO and PAO+H groups compared to controls (Figure 9A). Chronic hypoxia alone did not alter this reactivity. Compared to controls, vasoconstrictor responses to acute hypoxic challenges were elevated similarly in the PAO, H and PAO+H groups (Figure 9B). All data on vasoconstrictor reactivity were pooled from studies C and D, inasmuch as they were obtained under identical protocols from the same experimental groups.

Study E – structural changes of small pre-alveolar vessels

The partial aortic obstruction resulted in markedly increased muscularization of the pre-alveolar pulmonary vessels 3 weeks after the procedure (Figure 3C).

Discussion:

We present a new, simple, easy, minimally invasive, and reversible method of pulmonary hypertension induced by left-heart pressure overload in rats. It does not require complicated microsurgical techniques or open chest surgery. The procedure is performed in short-term anaesthesia (thiopental in our experiments) with spontaneous breathing and requires minimal recovery. The procedure has an acceptable mortality of ~10% in young animals. The learning curve is short (<10 failed attempts). We did not encounter any failure of the method after successful implantation of the tubing into the ascending aorta. The left heart pressure overload is not severe enough to cause death within the time frame tested.

The weight changes of the heart ventricles induced by the procedure are fully reversible. Similar dynamics has previously been reported for the left ventricle and the whole heart after removing an external band from the ascending aorta (Cho et al., 2014).

In addition to causing left heart pressure overload (elevated left ventricular end-diastolic pressure), our method also induces pulmonary hypertension, as evidenced by increased PAP and enlarged RV *in vivo* and by raised vascular resistance in isolated lungs (increased perfusion pressure at constant flow, increased slope of the pressure-flow lines). The elevated vascular resistance in isolated lungs (where the factor of the raised outflow pressure is eliminated) shows that this pulmonary hypertension is not just a passive upstream transmission of left heart pressure overload, but rather involves changes of the pulmonary vessels themselves ("reactive" form, or stage, of PH2). Our results with isolated lung inflow occlusions reveal a significant participation of increased pulmonary precapillary resistance. The increase in pulmonary vascular resistance was almost completely eliminated by a vasodilator, sodium nitroprusside, indicating an essential role of vasoconstriction in pulmonary hypertension in this model. Nevertheless, the model is also characterised by a marked muscularization of peripheral pulmonary vessels (higher %DL), which is also likely to contribute to the elevated PAP. This is indirectly supported by the potentiated vasoconstrictor reactivity to angiotensin II and acute hypoxic challenges.

Compared to an established model of group 3 pulmonary hypertension, chronic hypoxia, the partial aortic obstruction elevated the measures of pulmonary hypertension to the same extent (pressure-flow slope, %DL) or less (mean PAP, RV/LV+S). This corresponds to the

clinical experience that pulmonary hypertension in patients with left heart failure is often not very severe, especially at rest (Butler *et al.*, 1999; Lam *et al.*, 2009; Maron *et al.*, 2016).

The degree of pulmonary vascular remodelling (%DL) after partial aortic obstruction was not directly compared to that after chronic hypoxia in this study. However, it appeared higher (74 %, up from 25 % in controls) than previously reported by us in hypoxic rats (~35 - 60 %) (Hampl & Herget, 1990; Herget *et al.*, 1998; Hampl *et al.*, 2003; Herget *et al.*, 2003; Lachmanová *et al.*, 2005; Chovanec *et al.*, 2009). Extensive pulmonary vascular remodelling in PH2 was reported previously in rats, mice, and humans (Delgado *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2012; Hunt *et al.*, 2013; Fayyaz *et al.*, 2018).

It is somewhat surprising that combining partial aortic obstruction with hypoxic exposure did not further aggravate most of the symptoms of pulmonary hypertension (PAP *in vivo* and RV/LV+S, perfusion pressure in isolated lungs) as compared to rats exposed to hypoxia alone. It may suggest that the effect of partial aortic obstruction on the pulmonary vessels is not mediated by making animals hypoxemic. Thus, whatever mechanism is triggered by left heart pressure overload, it 'competes' for an effect on pulmonary vessels with hypoxia (which is stronger, as discussed above). At the same time, compared to hypoxia alone and partial aortic obstruction alone, BW was markedly reduced by their combination, suggesting additive effects on BW. The fact that the weight of both ventricles in relation to BW was also increased in the PAO+H group compared to both PAO and H groups can be explained by a disproportionately larger loss of weight of other tissues within the studied time framework.

A limitation of this model is its sudden onset, which does not reflect the typical clinical situation of PH2, in which the left heart pressure overload usually develops gradually, allowing for the heart to adapt to increasing pressure. We believe this is the reason why, somewhat paradoxically, the introduction of a tubing of the same size was much better tolerated by smaller than larger animals. Their young age probably enabled them to compensate more effectively for the sudden increase in afterload. This is the main disadvantage of our procedure compared to the most frequently used rat model of PH2, supracoronary aortic banding. In that procedure, the ascending aorta is partially occluded by a suture or clamp in small (juvenile) rats (80 - 100 g BW). Then, as they grow, the proportion of the aortic cross-sectional area that is restricted becomes relatively larger

and the pressure overload gradually increases. The full development of the model usually lasts over 2 months (Dai *et al.*, 2004; Hentschel *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2009; Kerem *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2011; Hunt *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016; Breitling *et al.*, 2017; Ranchoux *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020; Lambert *et al.*, 2021). The advantage of our model, on the other hand, is that it uses fully adult rats (200-250 g) and thus simulates the more frequent clinical situation of left heart disease occurring in adulthood rather than in adolescence.

In conclusion, we present a novel, simple to perform and use rat model of pulmonary hypertension induced by left heart pressure overload caused by partial intravascular obstruction of the ascending aorta. The model displays both increased muscularization of peripheral pulmonary vessels and increased vascular tone with significant involvement of the precapillary part of the pulmonary vasculature. Due to its simplicity and properties, it can be useful for further studies of PH2 pathophysiology and potential therapies.

Funding

The work was supported by Czech Science Foundation grants # 13-01710S and 17-11223S and Charles University grant # 210216.

Acknowledgements

We thank Mrs Monika Taylor for help with English language. We also thank Drs. Jakub Terl and Tomas Skorkovsky for their help with preparation of tissues for histological examination.

Conflicts of Interest

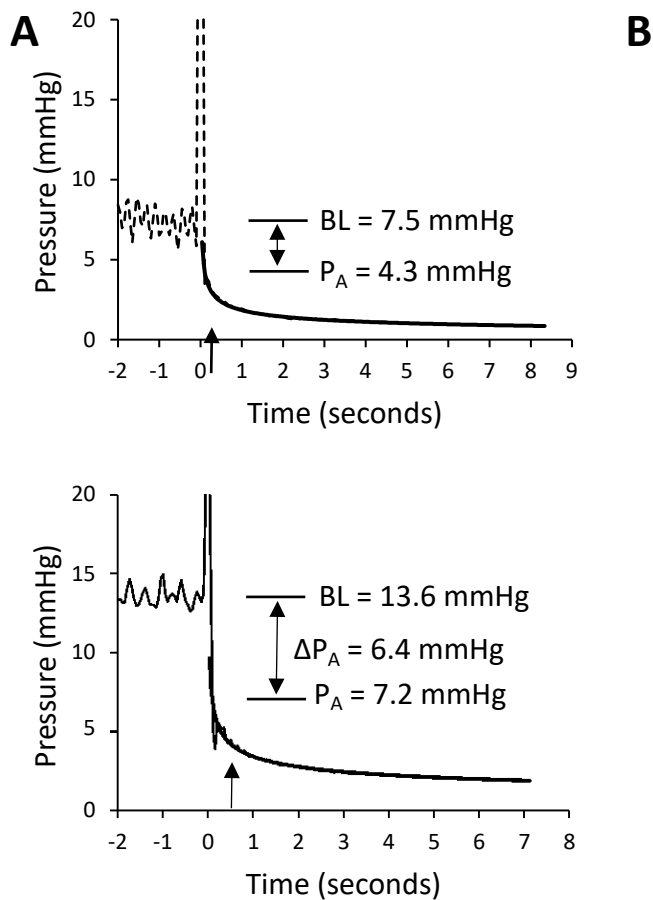
None of the authors has a conflict of interest.

Authors' contributions**Data Availability**

Data supporting the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Figure legends:

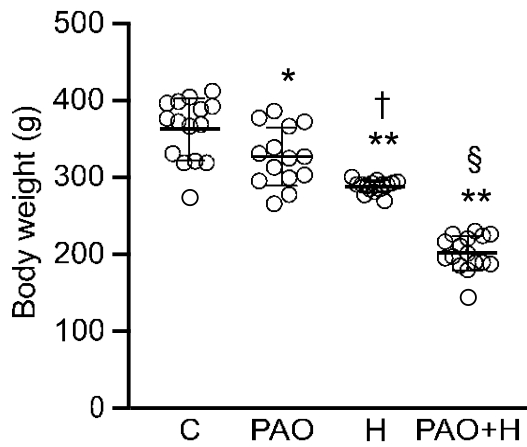
Figure 1: Inflow occlusion manoeuvre in isolated lungs.



Examples of pressure recordings during sudden arterial occlusions in isolated lungs. Dotted lines show the actual pressure recordings, the solid lines show the power regressions of the slower part of the pressure decay after arterial occlusion. BL = mean baseline perfusion pressure before the arterial occlusion (flow rate = 0.04 ml/min/g of body weight), P_A = intercept between the rapid decrease in pressure after arterial occlusion and the power regression of the slow pressure decay, $\Delta P_A = BL - P_A$ difference.

A: Example of a control lung. B: Example of the lung isolated 3 weeks after partial aortic obstruction (PAO group).

Figure 2: Body weight is reduced by partial aortic obstruction, chronic hypoxia, and their combination.



C = control group, PAO = group 3 weeks after partial aortic occlusion, H = rats after a 3 week hypoxic exposure, PAO+H =rats exposed to 3 weeks of hypoxia with partial aortic occlusion. Circles represent individual values, horizontal lines are means and SD.

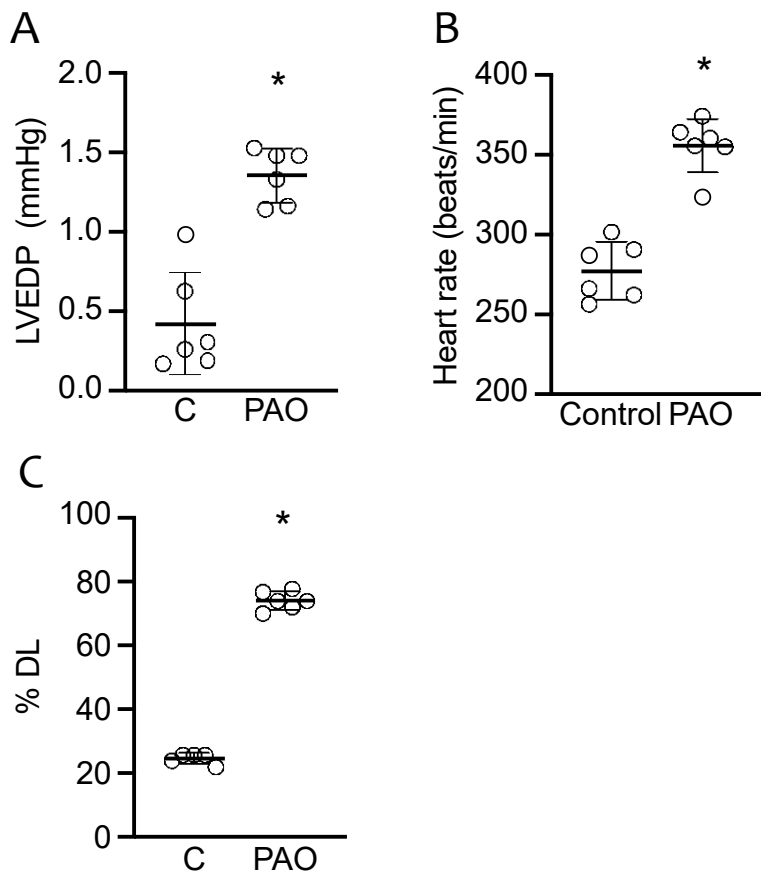
* $P = 0.0022$ vs. group C

** $P < 0.0001$ vs. group C

† $P = 0.0011$ vs. group PAO

§ $P < 0.0001$ vs. groups PAO and H

Figure 3: Left ventricular end-diastolic pressure (A), heart rate (B), and muscularisation of peripheral pulmonary vessels (C) are increased in rats with partial aortic obstruction.

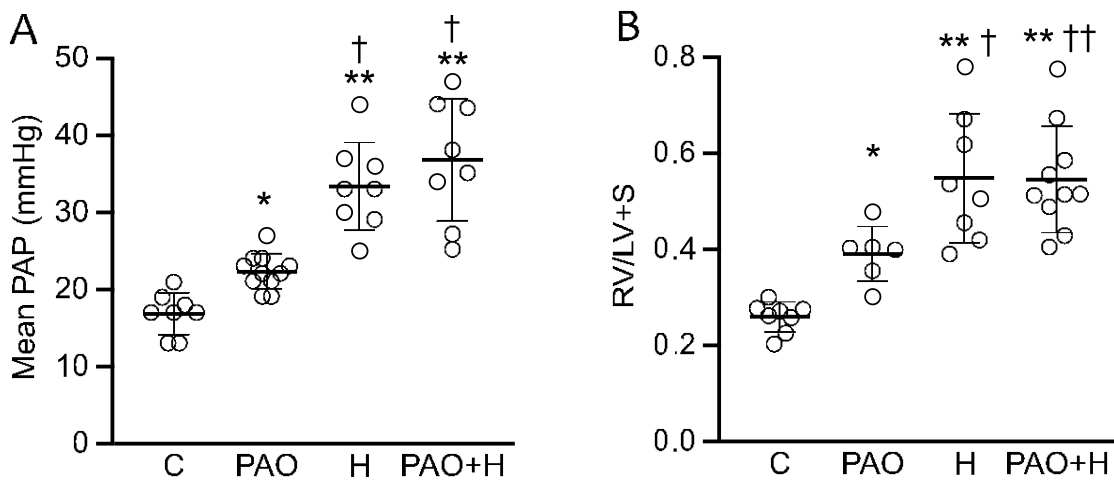


LVEDP = left ventricular end-diastolic pressure, %DL = percentage of the small pulmonary vessels that have double elastic laminae. C = control group, PAO = group 3 weeks after partial aortic occlusion.

Circles represent individual values, horizontal lines are means and SD.

* $P < 0.0001$ vs. group C

Figure 4: Mean pulmonary arterial pressure in vivo (A) and right-to-left heart ventricle weight index (B) are increased by partial aortic obstruction, chronic hypoxia and their combination.



PAP = pulmonary arterial pressure, RV/LV+S = weight of the right ventricle relative to the left ventricle and septum. For group denominations on horizontal axis, see legend to Figure 2. Circles represent individual values, horizontal lines are means and SD.

* $P = 0.0282$ (in A) or 0.0186 (in B) vs. group C

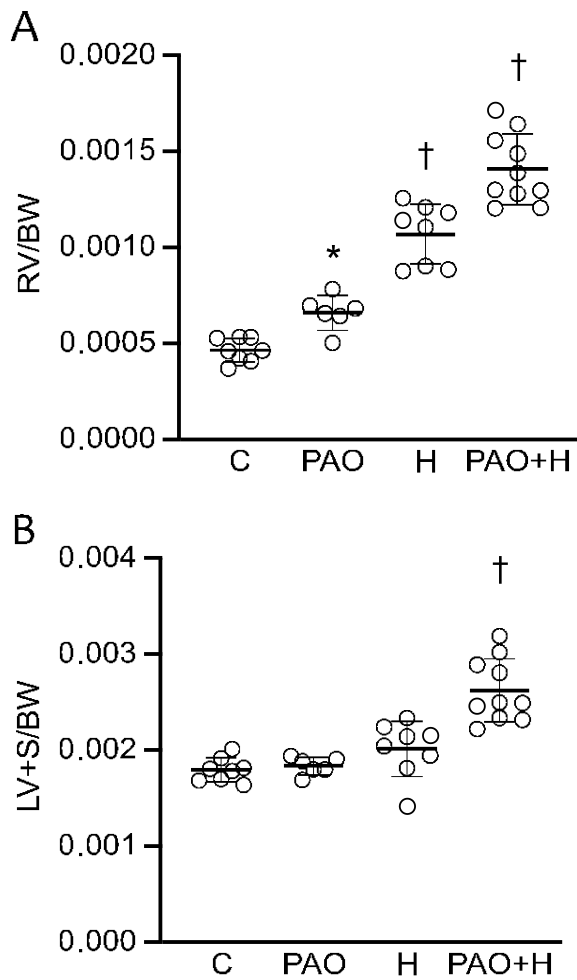
** $P < 0.0001$ vs. group C

† $P < 0.0001$ (in A) or $P = 0.0058$ (in B) vs. group PAO

†† $P = 0.0045$ vs. group PAO

Group PAO+H vs H: $P = 0.1989$ (in A) or 0.9692 (in B).

Figure 5: Relative weights of the right (A) and left (B) heart ventricles



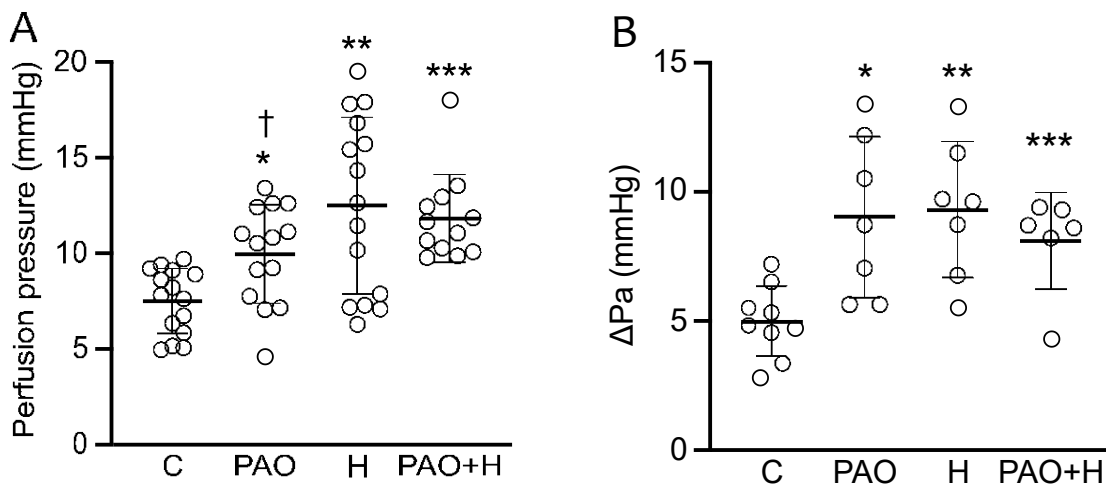
RV/BW = right ventricle weight relative to body weight, LV+S/BW = left ventricle and septum weight relative to body weight. For group denominations on horizontal axis, see legend to Figure 2. Circles represent individual values, horizontal lines are means and SD.

* $P = 0.0158$ vs. group C

† $P < 0.0001$ vs. all other groups

All other differences in panel A: $P \geq 0.0928$

Figure 6: Baseline perfusion pressure (A) and arterial pressure drop (ΔPa , B) in isolated lungs are increased by partial aortic obstruction, chronic hypoxia and their combination.



Baseline perfusion pressure was measured at a flow rate of 0.04 ml/min/g body weight. For explanation of ΔPa , see Figure 1. For group denominations on horizontal axis, see legend to Figure 2. Circles represent individual values, horizontal lines are means and SD.

* $P = 0.036$ (in A) or 0.0020 (in B) vs. group C

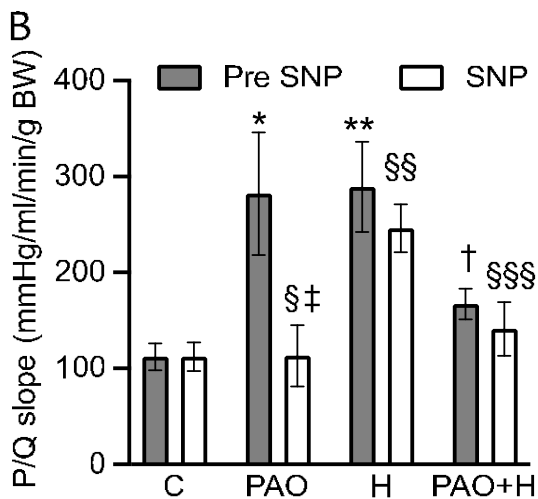
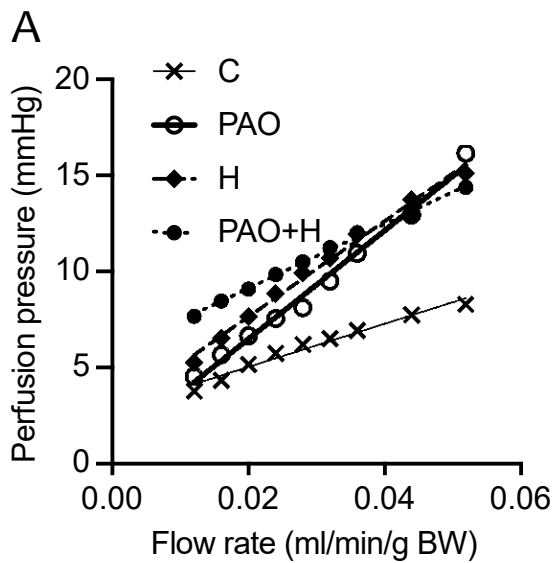
** $P < 0.0001$ (in A) or $P = 0.0011$ (in B) vs. group C

*** $P = 0.0007$ (in A) or 0.0173 (in B) vs. group C

† $P = 0.0319$ vs. group H

Other differences: $P \geq 0.1306$ (in A) or 0.362 (in B)

Figure 7: Relationship between flow rate and perfusion pressure in isolated lungs.



A: Points represent group means ($n = 7/\text{group}$), standard deviations are omitted for clarity here and are shown in Figure 8. The lines are linear regressions of the data for each group.

B: Slopes of the linear regressions of the perfusion pressure-flow (P/Q) data in isolated lungs before and after sodium nitroprusside (SNP) administration (means and SD, $n = 7/\text{group}$). BW = body weight.

For group denominations on the horizontal axis, see the legend of Figure 2.

* $P = 0.0024$ vs. group C before SNP

** $P = 0.0142$ vs. group C before SNP

† $P = 0.0462$ vs. group PAO before SNP

§ $P = 0.0003$ vs. group H with SNP

§§ $P < 0.0001$ vs. group C with SNP

§§§ $P = 0.0028$ vs. group H with SNP

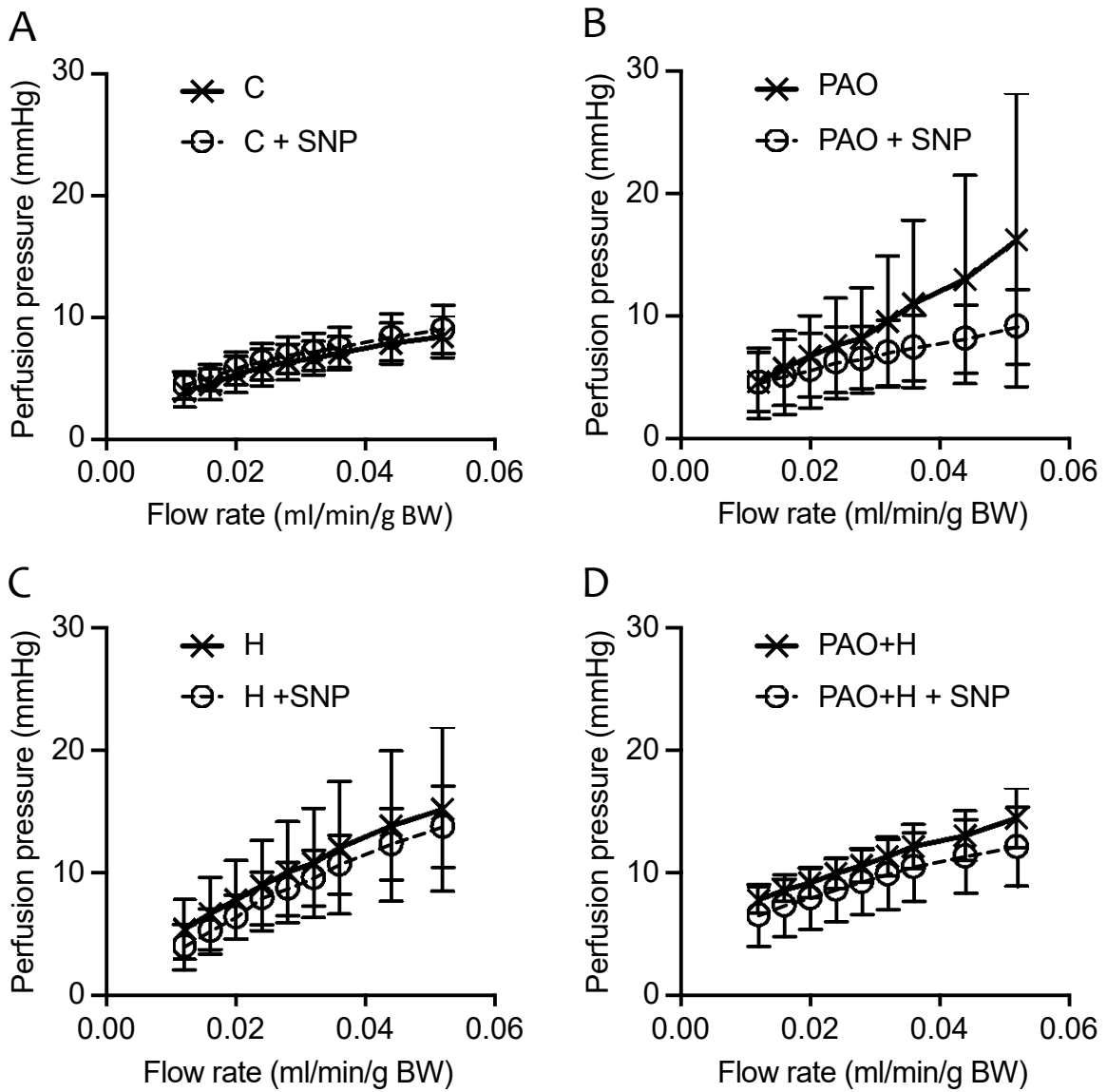
‡ $P = 0.0285$ vs. the same group before SNP

All other differences before SNP: $P \geq 0.1535$

All other differences with SNP: $P \geq 0.3920$

All other differences between pre- and post-SNP values: $P \geq 0.4398$

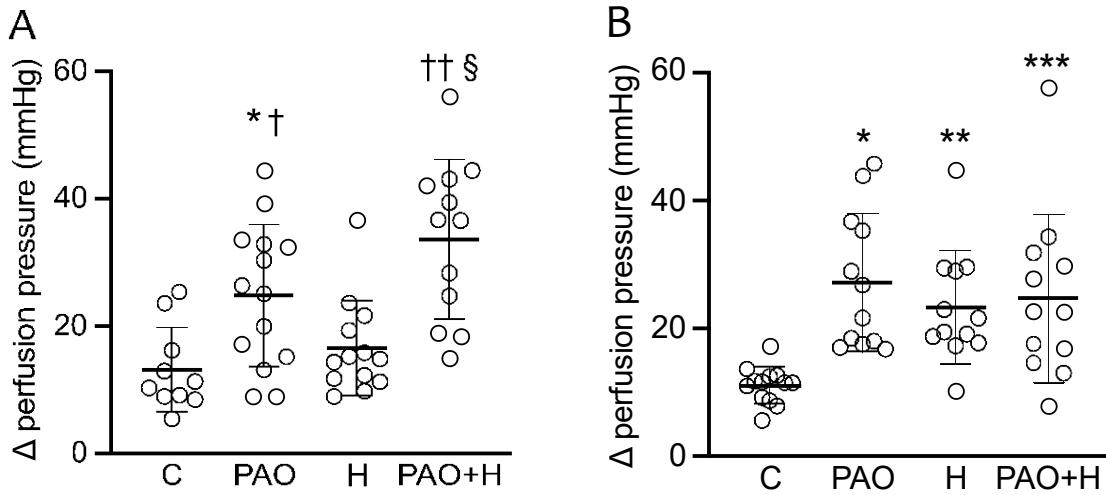
Figure 8: Effect of sodium nitroprusside (SNP) on the relationship between flow rate and perfusion pressure in isolated lungs.



A: Control rats (group C); B: rats 3 weeks after partial aortic occlusion (group PAO); C: rats after 3 weeks of hypoxic exposure (group H); D: rats exposed to 3 weeks of hypoxia with partial aortic occlusion (group PAO+H).

Means and SD (n = 7/group).

Figure 9: Acute vasoconstrictor reactivity in isolated lungs is potentiated by partial aortic obstruction.



A: Change in perfusion pressure elicited by angiotensin II injection (0.2 μg) into the inflow line is increased by partial aortic obstruction with or without concomitant chronic hypoxia.

B: Change in perfusion pressure elicited by acute hypoxic (0% O₂) ventilation is increased by partial aortic obstruction, chronic hypoxia, and their combination.

For group denominations on the horizontal axis, see the legend of Figure 2. Circles represent individual values, horizontal lines are means and SD.

* $P = 0.0069$ (in A) or $P = 0.0001$ (in B) vs. group C

** $P = 0.0028$ vs. group C

*** $P = 0.0010$ vs. group C

† $P = 0.0342$ vs. group H

†† $P = 0.0296$ vs. group PAO

§ $P < 0.0001$ vs. groups C and H

Groups C vs. H in A: $P = 0.4341$; all other differences in B: $P \geq 0.3256$

References:

- Aguero, J., Ishikawa, K., Hadri, L., Santos-Gallego, C., Fish, K., Hammoudi, N., Chaanine, A., Torquato, S., Naim, C., Ibanez, B., Pereda, D., Garcia-Alvarez, A., Fuster, V., Sengupta, P.P., Leopold, J.A. & Hajjar, R.J. (2014). Characterization of right ventricular remodeling and failure in a chronic pulmonary hypertension model. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 307(8), H1204-H1215. <https://doi:10.1152/ajpheart.00246.2014>
- Al-Hiti, H., Chovanec, M., Melenovský, V., Vajnerová, O., Baňasová, A., Kautzner, J. & Herget, J. (2013). L-arginine in combination with sildenafil potentiates the attenuation of hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Physiological Research* 62(6), 589-595. <https://doi:10.33549/physiolres.932463>
- Al-Omary, M.S., Sugito, S., Boyle, A.J., Sverdlov, A.L. & Collins, N.J. (2020). Pulmonary hypertension due to left heart disease: diagnosis, pathophysiology, and therapy. *Hypertension* 75(6), 1397-1408. <https://doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14330>
- Bělohávková, S., Šimák, J., Kokešová, A., Hniličková, O. & Hampl, V. (2001). Fenfluramine-induced pulmonary vasoconstriction: role of serotonin receptors and potassium channels. *Journal of Applied Physiology* 91(2), 755-761. <https://doi:10.1152/jappl.2001.91.2.755>
- Boucherat, O., Agrawal, V., Lawrie, A. & Bonnet, S. (2022). The latest in animal models of pulmonary hypertension and right ventricular failure. *Circulation Research* 130(9), 1466-1486. <https://doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.319971>
- Breitling, S., Hui, Z., Zabini, D., Hu, Y., Hoffmann, J., Goldenberg, N.M., Tabuchi, A., Buelow, R., Dos Santos, C. & Kuebler, W.M. (2017). The mast cell-B cell axis in lung vascular remodeling and pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 312(5), L710-L721. <https://doi:10.1152/ajplung.00311.2016>
- Breitling, S., Ravindran, K., Goldenberg, N.M. & Kuebler, W.M. (2015). The pathophysiology of pulmonary hypertension in left heart disease. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 309(9), L924-L941. <https://doi:10.1152/ajplung.00146.2015>
- Butler, J., Chomsky, D.B. & Wilson, J.R. (1999). Pulmonary hypertension and exercise intolerance in patients with heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 34(6), 1802-1806. [https://doi:https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(99\)00408-8](https://doi:https://doi.org/10.1016/S0735-1097(99)00408-8)
- Chen, Y., Guo, H., Xu, D., Xu, X., Wang, H., Hu, X., Lu, Z., Kwak, D., Xu, Y., Gunther, R., Huo, Y. & Weir, E.K. (2012). Left ventricular failure produces profound lung remodeling and pulmonary hypertension in mice: heart failure causes severe lung disease. *Hypertension* 59(6), 1170-1178. <https://doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.186072>

- Cho, J.S., Cho, E.J., Lee, J., Choi, H.-D., Park, K.C., Lee, K.-H., Yang, K.-J., Park, M.-W., Park, G.-M., Her, S.-H. & Kim, C.J. (2014). Myocardial mechanics in a rat model with banding and debanding of the ascending aorta. *J. Cardiovasc. Ultrasound* 22(4), 189-195. <https://doi:10.4250/jcu.2014.22.4.189>
- Chovanec, M., Novotná, J., Wilhelm, J., Hampl, V., Vizek, M. & Herget, J. (2009). Hypercapnia attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting lung radical injury. *Physiological Research* 58(Suppl. 2), S79-S85. <https://doi:10.33549/physiolres.931923>
- Dai, Z.-K., Tan, M.-S., Chai, C.-Y., Yeh, J.-L., Chou, S.-H., Chiu, C.-C., Jeng, A.Y., Chen, I.-J. & Wu, J.-R. (2004). Upregulation of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 in pulmonary hypertension secondary to heart failure in aorta-banded rats. *Pediatric Pulmonology* 37(3), 249-256. <https://doi:10.1002/ppul.10413>
- Dawson, C.A., Bronikowski, T.A., Linehan, J.H. & Rickaby, D.A. (1988). Distributions of vascular pressure and resistance in the lung. *Journal of Applied Physiology* 64, 274-284. <https://doi:10.1152/jap.1988.64.1.274>
- Dawson, C.A., Linehan, J.H. & Bronikowski, T.A. (1989). Pressure and flow in the pulmonary vascular bed. In *Pulmonary Vascular Physiology and Pathophysiology*, vol. 38. ed. Weir EK & Reeves JT, pp. 51-105. Marcel Dekker, New York.
- Delgado, J.F., Conde, E., Sanchez, V., Lopez-Rios, F., Gomez-Sanchez, M.A., Escribano, P., Sotelo, T., Gomez de la Camara, A., Cortina, J. & de la Calzada, C.S. (2005). Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension due to chronic heart failure. *European Journal of Heart Failure* 7(6), 1011-1016. <https://doi:10.1016/j.ejheart.2004.10.021>
- Fayyaz, A.U., Edwards, W.D., Maleszewski, J.J., Konik, E.A., DuBrock, H.M., Borlaug, B.A., Frantz, R.P., Jenkins, S.M. & Redfield, M.M. (2018). Global pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension associated with heart failure and preserved or reduced ejection fraction. *Circulation* 137(17), 1796-1810. <https://doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031608>
- Galie, N., Humbert, M., Vachiery, J.L., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A., Simonneau, G., Peacock, A., Vonk Noordegraaf, A., Beghetti, M., Ghofrani, A., Gomez Sanchez, M.A., Hansmann, G., Klepetko, W., Lancellotti, P., Matucci, M., McDonagh, T., Pierard, L.A., Trindade, P.T., Zompatori, M., Hoeper, M. & Group, E.S.C.S.D. (2016). 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European Heart Journal* 37(1), 67-119. <https://doi:10.1093/eurheartj/ehv317>
- Gerges, C., Gerges, M., Lang, M.B., Zhang, Y., Jakowitsch, J., Probst, P., Maurer, G. & Lang, I.M. (2013). Diastolic pulmonary vascular pressure gradient: a predictor of

- prognosis in “out-of-proportion” pulmonary hypertension. *Chest* 143(3), 758-766. <https://doi:10.1378/chest.12-1653>
- Guazzi, M. (2014). Pulmonary hypertension in heart failure preserved ejection fraction: prevalence, pathophysiology, and clinical perspectives. *Circulation Heart Failure* 7(2), 367-377. <https://doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000823>
- Hakim, T.S., Michel, R.P. & Chang, H.K. (1982). Partitioning of pulmonary vascular resistance in dogs by arterial and venous occlusion. *Journal of Applied Physiology* 52(3), 710-715. <https://doi:10.1152/jappl.1982.52.3.710>
- Hampl, V., Bíbová, J., Baňasová, A., Uhlík, J., Miková, D., Hniličková, O., Lachmanová, V. & Herget, J. (2006). Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 290(1), L11-L20. <https://doi:10.1152/ajplung.00023.2005>
- Hampl, V., Bíbová, J. & Herget, J. (2000). Perinatal history of hypoxia leads to lower vascular pressures and hyporeactivity to angiotensin II in isolated lungs of adult rats. *Physiological Research* 49(5), 567-575.
- Hampl, V., Bíbová, J., Povýšilová, V. & Herget, J. (2003). Dehydroepiandrosterone sulfate reduces experimental pulmonary hypertension in rats. *European Respiratory Journal* 21(5), 862-865. <https://doi:10.1183/09031936.03.00084503>
- Hampl, V. & Herget, J. (1990). Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia. *American Review of Respiratory Diseases* 142, 619-624. <https://doi:10.1164/ajrccm/142.3.619>
- Hampl, V. & Herget, J. (2000). Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiological Reviews* 80(4), 1337-1372. <https://doi:10.1152/physrev.2000.80.4.1337>
- Hentschel, T., Yin, N., Riad, A., Habbazettl, H., Weimann, J., Koster, A., Tschope, C., Kuppe, H. & Kuebler, Wolfgang M. (2007). Inhalation of the phosphodiesterase-3 inhibitor milrinone attenuates pulmonary hypertension in a rat model of congestive heart failure. *Anesthesiology* 106(1), 124-131. <https://doi:10.1097/00000542-200701000-00021>
- Herget, J. & Chovanec, M. (2010). Isolated perfused murine lung: a well characterized preparation for studying lung vascular function. *Drug Discovery Today: Disease Models* 7(3-4), 131-135. <https://doi:10.1016/j.ddmod.2011.03.008>
- Herget, J., Hampl, V., Povýšilová, V. & Slavík, Z. (1995). Long-term effects of prenatal indomethacin administration on the pulmonary circulation in rats. *European Respiratory Journal* 8(2), 209-215. <https://doi:10.1183/09031936.95.08020209>
- Herget, J., Kawiková, I. & Hampl, V. (1998). Adrenalectomy in rats depresses hypoxic pulmonary vasoconstriction in vitro but does not attenuate the pulmonary hypertension of chronic hypoxia in vivo. *Experimental and clinical cardiology* 3(1), 28-32.

- Herget, J. & Kuklík, V. (1995). Perinatal lung injury extends in adults the site of hypoxic pulmonary vasoconstriction upstream. *Physiological Research* 44(1), 25-30.
- Herget, J., Novotná, J., Bíbová, J., Povýšilová, V., Vaňková, M. & Hampl, V. (2003). Metalloproteinase inhibition by Batimastat attenuates pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 285(1), L199-L208. <https://doi:10.1152/ajplung.00167.2002>
- Herget, J. & Paleček, F. (1972). Pulmonary arterial blood pressure in closed chest rats. Changes after catecholamines, histamine and serotonin. *Archives Internationales de Pharmacodynamie Et de Therapie* 198, 107-117.
- Hunt, J.M., Bethea, B., Liu, X., Gandjeva, A., Mammen, P.P., Stacher, E., Gandjeva, M.R., Parish, E., Perez, M., Smith, L., Graham, B.B., Kuebler, W.M. & Tuder, R.M. (2013). Pulmonary veins in the normal lung and pulmonary hypertension due to left heart disease. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 305(10), L725-L736. <https://doi:10.1152/ajplung.00186.2013>
- Jasmin, J.-F., Calderone, A., Leung, T.-K., Villeneuve, L. & Dupuis, J. (2003). Lung structural remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: complete reversal with irbesartan. *Cardiovascular Research* 58(3), 621-631. [https://doi:10.1016/s0008-6363\(03\)00290-6](https://doi:10.1016/s0008-6363(03)00290-6)
- Jasmin, J.-F., Mercier, I., Hnasko, R., Cheung, M.W.-C., Tanowitz, H.B., Dupuis, J. & Lisanti, M.P. (2004). Lung remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: pathogenic role of reduced caveolin expression. *Cardiovascular Research* 63(4), 747-755. <https://doi:10.1016/j.cardiores.2004.05.018>
- Kerem, A., Yin, J., Kaestle, S.M., Hoffmann, J., Schoene, A.M., Singh, B., Kuppe, H., Borst, M.M. & Kuebler, W.M. (2010). Lung endothelial dysfunction in congestive heart failure: role of impaired Ca²⁺ signaling and cytoskeletal reorganization. *Circulation Research* 106(6), 1103-1116. <https://doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.210542>
- Lachmanová, V., Hnilíčková, O., Povýšilová, V., Hampl, V. & Herget, J. (2005). N-acetylcysteine inhibits hypoxic pulmonary hypertension most effectively in the initial phase of chronic hypoxia. *Life Sciences* 77(2), 175-182. <https://doi:10.1016/j.lfs.2004.11.027>
- Lai, Y.-C., Tabima, D.M., Dube, J.J., Hughan, K.S., Vanderpool, R.R., Goncharov, D.A., St Croix, C.M., Garcia-Ocana, A., Goncharova, E.A., Tofovic, S.P., Mora, A.L. & Gladwin, M.T. (2016). SIRT3-AMP-activated protein kinase activation by nitrite and metformin improves hyperglycemia and normalizes pulmonary hypertension associated with heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* 133(8), 717-731. <https://doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018935>
- Lam, C.S., Roger, V.L., Rodeheffer, R.J., Borlaug, B.A., Enders, F.T. & Redfield, M.M. (2009). Pulmonary hypertension in heart failure with preserved ejection fraction: a community-based study. *Journal of the American College of Cardiology* 53(13), 1119-1126. <https://doi:10.1016/j.jacc.2008.11.051>

- Lambert, M., Mendes-Ferreira, P., Ghigna, M.-R., LeRibeuz, H., Adao, R., Boet, A., Capuano, V., Rucker-Martin, C., Bras-Silva, C., Quarck, R., Domergue, V., Vachieri, J.-L., Humbert, M., Perros, F., Montani, D. & Antigny, F. (2021). Kcnk3 dysfunction exaggerates the development of pulmonary hypertension induced by left ventricular pressure overload. *Cardiovascular Research* 117(12), 2474-2488. <https://doi:10.1093/cvr/cvab016>
- Linehan, J.H. & Dawson, C.A. (1983). A three-compartment model of the pulmonary vasculature: effects of vasoconstriction. *Journal of Applied Physiology* 55(3), 923-928. <https://doi:10.1152/jap.1983.55.3.923>
- Maron, B.A., Hess, E., Maddox, T.M., Opatowsky, A.R., Tedford, R.J., Lahm, T., Joynt, K.E., Kass, D.J., Stephens, T., Stanislawski, M.A., Swenson, E.R., Goldstein, R.H., Leopold, J.A., Zamanian, R.T., Elwing, J.M., Plomondon, M.E., Grunwald, G.K., Barón, A.E., Rumsfeld, J.S. & Choudhary, G. (2016). Association of borderline pulmonary hypertension with mortality and hospitalization in a large patient cohort: Insights from the veterans affairs clinical assessment, reporting, and tracking program. *Circulation* 133(13), 1240-1248. <https://doi:10.1161/circulationaha.115.020207>
- Pereda, D., Garcia-Alvarez, A., Sanchez-Quintana, D., Nuno, M., Fernandez-Friera, L., Fernandez-Jimenez, R., Garcia-Ruiz, J.M., Sandoval, E., Aguero, J., Castella, M., Hajjar, R.J., Fuster, V. & Ibanez, B. (2014). Swine model of chronic postcapillary pulmonary hypertension with right ventricular remodeling: long-term characterization by cardiac catheterization, magnetic resonance, and pathology. *Journal of Cardiovascular Translational Research* 7(5), 494-506. <https://doi:10.1007/s12265-014-9564-6>
- Ranchoux, B., Nadeau, V., Bourgeois, A., Provencher, S., Tremblay, E., Omura, J., Cote, N., Abu-Alhayja'a, R., Dumais, V., Nachbar, R.T., Tastet, L., Dahou, A., Breuils-Bonnet, S., Marette, A., Pibarot, P., Dupuis, J., Paulin, R., Boucherat, O., Archer, S.L., Bonnet, S. & Potus, F. (2019). Metabolic syndrome exacerbates pulmonary hypertension due to left heart disease. *Circulation Research* 125(4), 449-466. <https://doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.314555>
- Rockman, H.A., Ross, R.S., Harris, A.N., Knowlton, K.U., Steinhilber, M.E., Field, L.J., J. Ross, J. & Chien, K.R. (1991). Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(18), 8277-8281. <https://doi:10.1073/pnas.88.18.8277>
- Ross, J.J. (1976). The concept of afterload mismatch and its implications in the clinical assessment of cardiac contractility. *Jap. Circ. J.* 40(8), 865-875. <https://doi:10.1253/jcj.40.865>
- Vachieri, J.L., Adir, Y., Barbera, J.A., Champion, H., Coghlan, J.G., Cottin, V., De Marco, T., Galie, N., Ghio, S., Gibbs, J.S., Martinez, F., Semigran, M., Simonneau, G., Wells, A. & Seeger, W. (2013). Pulmonary hypertension due to left heart diseases. *Journal of the American College of Cardiology* 62(25 Suppl), D100-108. <https://doi:10.1016/j.jacc.2013.10.033>

- Vachieri, J.L., Tedford, R.J., Rosenkranz, S., Palazzini, M., Lang, I., Guazzi, M., Coghlan, G., Chazova, I. & De Marco, T. (2019). Pulmonary hypertension due to left heart disease. *European Respiratory Journal* 53(1). <https://doi:10.1183/13993003.01897-2018>
- van Duin, R.W.B., Stam, K., Cai, Z., Uitterdijk, A., Garcia-Alvarez, A., Ibanez, B., Danser, A.H.J., Reiss, I.K.M., Duncker, D.J. & Merkus, D. (2019). Transition from post-capillary pulmonary hypertension to combined pre- and post-capillary pulmonary hypertension in swine: a key role for endothelin. *Journal of Physiology and Pharmacology* 597(4), 1157-1173. <https://doi:10.1113/JP275987>
- Wang, Q., Guo, Y.-Z., Zhang, Y.-T., Xue, J.-J., Chen, Z.-C., Cheng, S.-Y., Ou, M.-D., Cheng, K.-L. & Zeng, W.-J. (2016). The effects and mechanism of atorvastatin on pulmonary hypertension due to left heart disease. *PLoS One* 11(7), e0157171. <https://doi:10.1371/journal.pone.0157171>
- Wijeratne, D.T., Lajkosz, K., Brogly, S.B., Lougheed, M.D., Jiang, L., Housin, A., Barber, D., Johnson, A., Doliszny, K.M. & Archer, S.L. (2018). Increasing incidence and prevalence of World Health Organization groups 1 to 4 pulmonary hypertension: A population-based cohort study in Ontario, Canada. *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes* 11(2), e003973. <https://doi:10.1161/CIRCOUTCOMES.117.003973>
- Yin, J., Kukucka, M., Hoffmann, J., Sterner-Kock, A., Burhenne, J., Haefeli, W.E., Kuppe, H. & Kuebler, W.M. (2011). Sildenafil preserves lung endothelial function and prevents pulmonary vascular remodeling in a rat model of diastolic heart failure. *Circulation: Heart Failure* 4(2), 198-206. <https://doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.957050>
- Yin, N., Kaestle, S., Yin, J., Hentschel, T., Pries, A.R., Kuppe, H. & Kuebler, W.M. (2009). Inhaled nitric oxide versus aerosolized iloprost for the treatment of pulmonary hypertension with left heart disease. *Critical Care Medicine* 37(3), 980-986. <https://doi:10.1097/CCM.0b013e3181962ce6>
- Zhang, H., Huang, W., Liu, H., Zheng, Y. & Liao, L. (2020). Mechanical stretching of pulmonary vein stimulates matrix metalloproteinase-9 and transforming growth factor-beta1 through stretch-activated channel/MAPK pathways in pulmonary hypertension due to left heart disease model rats. *PLoS One* 15(9), e0235824. <https://doi:10.1371/journal.pone.0235824>
- Zhang, Y.T., Xue, J.J., Wang, Q., Cheng, S.Y., Chen, Z.C., Li, H.Y., Shan, J.J., Cheng, K.L. & Zeng, W.J. (2019). Dehydroepiandrosterone attenuates pulmonary artery and right ventricular remodeling in a rat model of pulmonary hypertension due to left heart failure. *Life Sciences* 219, 82-89. <https://doi:10.1016/j.lfs.2018.12.056>