

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**2. lékařská fakulta**

**Význam volných kyslíkových radikálů při ischemicko-reperfúzním  
poškození plic získaných od dárců po srdeční zástavě**

**Disertační práce**

**Vypracoval:**

*MUDr. Daniel Hodyc*

**Školitel:**

*prof. MUDr. Jan Herget, DrSc*

**Praha 2008**

## Obsah:

<b>1. TEORETICKÝ ÚVOD</b> .....	5
<b>1.1. TRANSPLANTACE PLIC JAKO KURATIVNÍ METODA PRO ONEMOCNĚNÍ S FATÁLNÍ PROGNÓZOU</b> .....	5
<b>1.2. TRANSPLANTACE PLIC OD DÁRCŮ S NEBIJÍCÍM SRDCEM</b> .....	6
<b>1.3. EXPERIMENTÁLNÍ MODEL ODBĚRU, UCHOVÁNÍ A NÁSLEDNÉ TRANSPLANTACE PLIC ODEBRANÝCH OD DÁRCE PO SRDEČNÍ ZÁSTAVĚ</b> .....	7
<b>1.4. TEPLÁ ISCHÉMIE PLIC A ISCHMICKO – REPERFÚZNÍ POŠKOZENÍ</b> .....	8
<b>1.5. OXIDAČNÍ STRES A VOLNÉ KYSLÍKOVÉ RADIKÁLY</b> .....	9
<b>1.6. VÝZNAM VOLNÝCH KYSLÍKOVÝCH RADIKÁLŮ PŘI TEPLÉ ISCHÉMII A NÁSLEDNÉ REPERFÚZI</b> .....	11
<b>1.7. ÚLOHA VOLNÝCH KYSLÍKOVÝCH RADIKÁLŮ V MECHANISMU HYPOXICKÉ PLICNÍ VAZOKONSTRIKCE</b> .....	12
<b>2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	15
<b>2.1. ÚVOD</b> .....	15
<b>2.2. VLIV VENTILACE A HEPARINIZACE NA POŠKOZENÍ PLIC ZPŮSOBENÉ TEPLOU ISCHÉMIÍ, EFEKT PODÁNÍ SCAVENGERU VOLNÝCH KYSLÍKOVÝCH RADIKÁLŮ, TEMPOLU, PŘED NAVOZENÍM TEPLÉ ISCHÉMIE</b> .....	16
<b>2.2.1. Cíle studie</b> .....	16
<b>2.2.2. Materiál a popis metodiky</b> .....	16
<i>2.2.2.1 Popis experimentální metody</i> .....	16
<i>2.2.2.2. Experimentální skupiny</i> .....	19
<i>2.2.2.3. Statistické hodnocení výsledků</i> .....	21
<b>2.2.3. Výsledky</b> .....	21
<i>2.2.3.1. Zhodnocení funkčnosti preparátu v jednotlivých skupinách</i> .....	21
<i>2.2.3.2. Funkční hodnocení plic</i> .....	23
<b>2.2.4. Shrnutí výsledků a dílčí závěr</b> .....	26
<b>2.3. VLIV PODÁNÍ TEMPOLU V PRŮBĚHU REPERFÚZE PLIC, TESTOVÁNÍ PROTEKTIVNÍHO ÚČINKU NA ISCHEMICKO REPERFÚZNÍ POŠKOZENÍ</b> .....	28
<b>2.3.1. Cíle studie</b> .....	28
<b>2.3.2. Materiál a popis metodiky</b> .....	28
<b>2.3.3. Výsledky</b> .....	29
<b>2.3.4. Shrnutí výsledků a dílčí závěr</b> .....	32

<b>2.4 INHIBICE HYPOXICKÉ PLICNÍ VAZOKONSTRIKCE VYVOLANÁ TEMPOLEM</b> .....	34
<b>2.4.1. Úvod, cíle studie</b> .....	34
<b>2.4.2. Materiál a popis metodiky</b> .....	35
<i>2.4.2.1. Experiment A – vliv inhibice produkce NO a snížení koncentrace superoxidu tempolem na velikost hypoxické plicní vazokonstrikce</i> .....	35
<i>2.4.2.2. Experiment B – vliv změny bazálního perfúzního tlaku na tempolem vyvolanou inhibici hypoxické plicní vazokonstrikce</i> .....	37
<b>2.4.3. Výsledky</b> .....	39
<i>2.4.3.1. Experiment A</i> .....	39
<i>2.4.3.2. Experiment B</i> .....	40
<b>2.4.4. Shrnutí výsledků a dílčí závěr</b> .....	41
<b>2.5. CELKOVÉ SHRUTÍ VÝSLEDKŮ, ZÁVĚR</b> .....	43
<b>REFERENCE</b> .....	46
<b>SEZNAM PŘÍLOH - PUBLIKACE</b> .....	54

## **SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

**COPD** – chronic obstructive pulmonary disease, chronická obstrukční plicní nemoc

**HPV** – hypoxic pulmonary vasoconstriction, hypoxická plicní vazokonstrikce

**METC** - mitochondrial electron transport chain; elektronový transportní řetězec na mitochondriální membráně

**NHBD** – non-heart-beating donors; dárci orgánů po srdeční zástavě

**NO** – nitric oxide; oxid dusnatý

**ROS** – reactive oxygen species, volné kyslíkové radikály

**SOD** – superoxid dismutase, superoxid dismutasa

**W/D ratio** – wet to dry ratio; poměr mokré a suché váhy preparátu

**TAN** – total adenine nucleotide, celkové množství adeninových nukleotidů

## **1. TEORETICKÝ ÚVOD**

### **1.1. TRANSPLANTACE PLIC JAKO KURATIVNÍ METODA PRO ONEMOCNĚNÍ S FATÁLNÍ PROGNÓZOU**

Transplantace plic představuje v současné době hojně využívanou a etablovanou kurativní metodu v léčbě závažných plicních onemocnění v terminální fázi. Od doby první úspěšně provedené transplantace u člověka v roce 1983 (63, 75) prošla tato technika významným vývojem, zejména v oblastech použité chirurgické techniky, uchovávání orgánů, diagnostiky a následné terapie akutní rejekce a terapie infekčních komplikací transplantace.

V současnosti transplantuje plíce více než 140 pracovišť na světě, pouze 5 z nich však provede ročně více než 50 výkonů. V roce 2007 bylo celosvětově provedeno přes 2100 transplantací plic, z nichž více než polovinu představují bilobární transplantace (37, 76). Původní jedinou klinickou indikací k jednostranné transplantaci plic byla idiopathická plicní fibróza (58). V současnosti mezi nejčastější onemocnění, pro něž je indikována transplantace plic, patří chronická obstrukční plicní nemoc (COPD) v terminálním stádiu (61,2% všech monolobárních a 32% bilobárních transplantací), dále idiopathická plicní fibróza (24% monolobárních transplantací), cystická fibróza (32% bilobárních transplantací), plicní emfyzém a primární plicní hypertenze (62). Třileté přežití nyní představuje 64% všech pacientů transplantovaných po roce 2000 (27).

V České republice je v současnosti jediným pracovištěm, které se transplantacím plic věnuje III. chirurgická klinika 1. LFUK a FN Motol, kde bylo od roku 1997 provedeno již více než 110 mono- či bi-lobárních transplantací.

## 1.2. TRANSPLANTACE PLIC OD DÁRCŮ S NEBIJÍCÍM SRDCEM

Zdokonalení postupů v transplantaci plic a následné významné rozšíření indikací tohoto způsobu léčby vedlo v uplynulých deseti letech k rapidnímu nárůstu počtu pacientů na seznamech čekatelů na transplantaci (waiting listech). Důsledkem tohoto prodlužování čekacích listů je vysoká mortalita čekatelů indikovaných k transplantaci (35 – 50%), a to i přes stále se zlepšující předtransplantační péči o tyto pacienty. Důvodem k tomuto neustále se prohlubujícímu nepoměru mezi nabídkou vhodných orgánových dárců a čekatelů na transplantaci je vedle obecného nedostatku orgánových dárců rovněž skutečnost, že pouze 10% - 20% multiorgánových dárců splňuje náročná kritéria na funkční a morfologické vlastnosti plic a představuje tak vhodné potenciální dárcce pro plicní transplantaci (14). Přirozeným důsledkem této situace je snaha o hledání nových strategií, které by vedly k rozšíření skupiny dárců plic. Jedná se například o příbuzenské transplantace plicních laloků od živého dárce či využití tzv. marginálních kadaverózních dárců, tedy použití orgánu k transplantaci i v těch případech, kdy jsou stanovené parametry splněny pouze zcela hraničně (například dlouhodobá umělá plicní ventilace dárce již nepředstavuje absolutní kontraindikaci k transplantaci, před transplantací se rutinně nevyžaduje kultivační vyšetření aj.).

Zcela novým přístupem je potom transplantace plic od dárců po srdeční zástavě. Klíčový rozdíl tohoto přístupu, oproti konvenčně užívanému transplantačnímu postupu, je v době trvání takzvané teplé ischémie. Za teplou ischémii je označován stav, kdy je v daném orgánu zastavena perfúze okysličenou krví (například v důsledku srdeční zástavy či naložením chirurgické svorky na orgán, odebíraný pro transplantační účely) a tento orgán je přitom ponechán při pokojové teplotě, tedy nedojde k jeho zchlazení. Při standardním transplantačním postupu je doba trvání této teplé ischémie omezena zcela na minimum (tedy trvá řádově maximálně několik minut). Orgán je na operačním sále odebírán při umělé plicní ventilaci s cirkulační podporou a je tedy perfundován okysličenou krví téměř až do chvíle jeho odběru z těla dárce. Bezprostředně poté je orgán uložen do chladného konzervačního roztoku (stav označující se jako studená ischémie), v němž může díky výrazně sníženým metabolickým dějům perzistovat ve funkčně dobrém stavu až několik hodin.

Idea transplantace plic od dárců po srdeční zástavě vychází ze skutečnosti, že přibližně jedna třetina všech úmrtí v západním světě je důsledkem ischemické choroby srdeční. Byly publikovány odhady, že 375 tisíc pacientů v Evropě a 275 tisíc pacientů v USA zemře ročně na náhlou srdeční zástavu (17, 21), přičemž platí, že přibližně v polovině případů dojde k srdeční zástavě mimo nemocniční zařízení. Pokud by bylo možné využít alespoň zlomek z těchto úmrtí jako potenciální zdroj plic k transplantaci, vedlo by to k výraznému zvýšení dostupnosti této terapeutické techniky. Vzhledem k tomu, že v těchto případech není samozřejmě možné minimalizovat dobu teplé ischemie, nezbytnou podmínkou pro možné úspěšné využití takto získaných plic je jejich ochrana před negativními účinky teplé ischemie, dobrá technika zhodnocení plicních funkcí před transplantací a protekce před poškozením způsobeným následnou reperfúzí orgánu (69).

Konkrétní postup odběru a transplantace plic od dárce po srdeční zástavě byl navržen a experimentálně poprvé realizován Thomasem Eganem (24-26), který byl následován celou řadou dalších (12, 29, 68). První klinický experiment, při němž byla lidskému pacientovi transplantována plíce získaná od dárce po srdeční zástavě publikoval v roce 2001 Steen (70). Od té doby se transplantace plic od dárce s nebijícím srdce stala etablovanou technikou na několika dalších světových pracovištích.

### **1.3. EXPERIMENTÁLNÍ MODEL ODBĚRU, UCHOVÁNÍ A NÁSLEDNÉ TRANSPLANTACE PLIC ODEBRANÝCH OD DÁRCE PO SRDEČNÍ ZÁSTAVĚ**

Zmíněný postup odběru a uchování plic, získaných od dárce po srdeční zástavě, byl mnoha experimentálními skupinami detailně rozpracován. Nejpoužívanější experimentální model, který rovněž dobře simuluje klinickou situaci, popsal Steen a spolupracovníci (69). Experimentální zvířata sloužící jako dárce orgánu (laboratorní prasata) jsou usmrcena navozením komorové fibrilace s následnou simulací kardiopulmonální resuscitace trvající 20 minut. 10 minut od ukončení neúspěšné resuscitace je podán do centrálního žilního katétru heparin, který je do plicního cévního

řečiště distribuován 1 minutu trvající nepřímou srdeční masáží. Poté je dárcovské zvíře ponecháno 45 – 60 minut při pokojové teplotě (teplá ischemie). Následně jsou do obou pleurálních dutin interkostálními prostory zavedeny katétry, jimiž je zajištěno intrapleurální topické chlazení plic Perfadexem o teplotě 12 °C.

Po různě dlouhé době topického chlazení - v popsaném protokolu 6 hodin, jsou však publikovány práce, popisující možnost tohoto způsobu uchování plic bez poškození až 72 hodin (66, 67) – je orgánový blok srdce-plíce vyňat a napojen na mimotělní perfúzní oběh. Poté je obnoven průtok plícemi perfúzním roztokem s postupně se zvyšující teplotou. Za podmínek kontinuální perfúze konstantním průtokem a ventilace atmosférickým vzduchem jsou hodnoceny plicní funkce – střední tlak v plicnici, plicní vaskulární rezistence, transportní schopnost plic pro kyslík a oxid uhličitý, změna hmotnosti určující přítomnost plicního edému aj. (10). Z tohoto modelu jsme vycházeli také my při sestavení a realizaci experimentálních modelu použitého v popsané studii (viz. experimentální část disertační práce).

Rovněž byla popsána řada experimentálních prací, kdy jsou takto získané plíce transplantovány žijícímu příjemci a hodnocení plicních funkcí je tedy provedeno in vivo (44, 48, 59).

#### **1.4. TEPLÁ ISCHÉMIE PLIC A ISCHÉMICKO – REPERFÚZNÍ POŠKOZENÍ**

Významnou výhodou plicní tkáně oproti všem ostatním tkáním lidského těla je možnost udržení dostatečné tkáňové oxygenace a tedy aerobního metabolismu i poté, co došlo k zástavě cirkulace (8). Dodávku kyslíku parenchymálním buňkám plicní tkáně je možné v průběhu teplé ischemie zajistit umělou ventilací plic. Byla publikována celá řada experimentálních prací, které ukázaly velmi dobré funkční parametry plic ventilovaných vzduchem či směsí plynů s vyšší koncentrací kyslíku (10, 79, 83).

V plicích, které nebyly ventilovány nebo byly ventilovány dusíkem byla u 50% pneumocytů popsána po čtyřech hodinách buněčná smrt (19). Pokud byly tyto



kadaverózní plíce ventilovány kyslíkem, bylo u těchto buněk pozorováno signifikantní prodloužení přežívání - více než 90% pneumocytů přežilo 4 hodiny a dokonce 75% z nich bylo stále živých po 12 hodinách od cirkulační zástavy (2). V plicích ventilovaných kyslíkem byla pozorována dlouhodobě stabilní hladina tkáňového ATP a adeninových nukleotidů (TAN, total adenin nucleotide) (20). Byla rovněž nalezena vysoká korelace mezi viabilitou pneumocytů a hladinou TAN a tato vysoká hladina TAN přetrvávala ve ventilovaných neperfundovaných plicích mnoho hodin po ukončení perfúze (22). Oproti tomu v kardiomyocytech dojde k úbytku poloviny TAN po šesti minutách od zastavení perfúze (46) a v jaterních buňkách do 2 hodin (42).

Existuje tedy reálný předpoklad potvrzený některými publikacemi, že ventilace plic kyslíkem nebo směsí plynů s vysokým obsahem kyslíku, by mohla vést ke zlepšení funkčních vlastností plic získaných od dárců po srdeční zástavě.

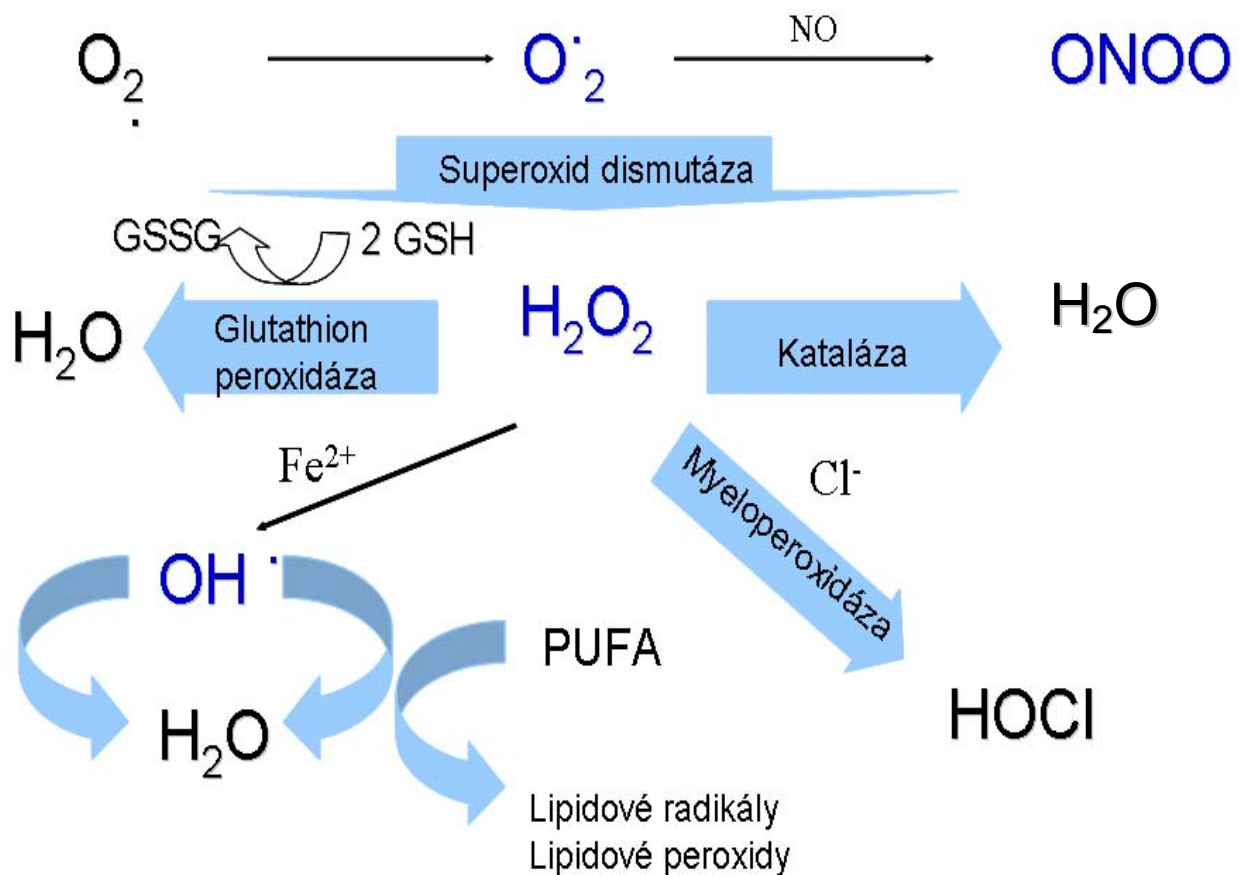
Popsaný protektivní účinek ventilace však nemusí být pouze nutným důsledkem kontinuální dodávky kyslíku plicnímu parenchymu. Při srovnání rozvoje edému plic, v nichž došlo po devadesátiminutové cirkulační zástavě k obnovení průtoku, byl pozorován jasný protektivní vliv ventilace, který se však nijak nelišil mezi skupinou ventilovanou dusíkem, atmosférickým vzduchem a kyslíkem (80). Rovněž byla popsána signifikantně lepší funkce plic získaných od kadaverózního dárce po hodinové srdeční zástavě, pokud byly plíce roztaženy jedním nádechem před navozením teplé ischemie (52, 53). Výsledky těchto pokusů vedou k interpretaci výsledků protektivního účinku ventilace spíše prostřednictvím efektu distenze alveolů – bylo opakovaně experimentálně prokázáno, že při vyšším vaskulárním tlaku distenze alveolů plynem snižuje filtraci a následnou tvorbu plicního edému (78).

## **1.5. OXIDAČNÍ STRES A VOLNÉ KYSLÍKOVÉ RADIKÁLY**

V určitém rozporu s popsáním pozitivním efektem ventilace plic kyslíkem při cirkulační zástavě jsou poznatky o významu volných kyslíkových radikálů pro tkáňové poškození a buněčnou smrt.

V prostředí s vyšším parciálním tlakem kyslíku, působením toxinů, při aktivaci makrofágů či při porušení přirozených antioxidačních mechanismů buněk dochází k produkci velkého množství reaktivních sloučenin kyslíku. Primárním a vysoce reaktivním volným kyslíkovým radikálem je superoxid, který vzniká v buňkách například jako produkt NADH oxidázy (30, 51) či respiračního řetězce na mitochondriální membráně (81). Tento vysoce reaktivní radikál je účinkem enzymu superoxid dismutázy rychle metabolizován na poněkud stabilnější radikál – peroxid vodíku. Účinek obou těchto radikálů na plicní cévní řečiš je silně vazokonstrikční (40, 50, 55). V přítomnosti vyšších tkáňových koncentrací NO je superoxid rovněž velmi rychle metabolizován na další kyslíkový radikál peroxynitrit, který působí v plicním řečišti vazokonstrikčně (7).

Peroxid vodíku je působením katalázy a glutathion peroxidázy metabolizován na vodu, v přítomnosti  $Fe^{2+}$  se mění na další vysoce reaktivní sloučeninu - hydroxylový radikál (16, 31, 32).

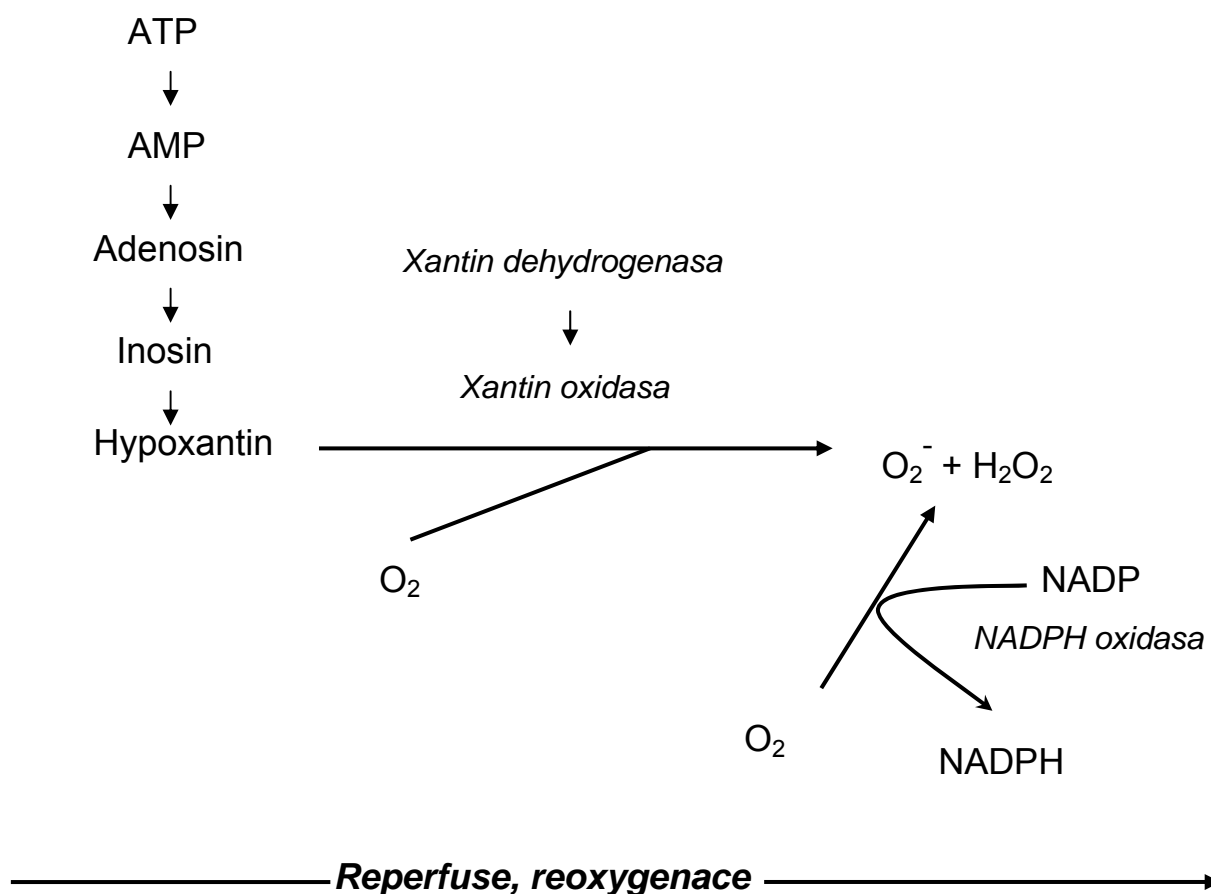


*Obr.1.1. Produkce volných kyslíkových radikálů a jejich vzájemná interakce*

## **1.6. VÝZNAM VOLNÝCH KYSLÍKOVÝCH RADIKÁLŮ PŘI TEPLÉ ISCHÉMII A NÁSLEDNÉ REPERFÚZI**

Je známo, že prolongovaná inhalace 100 % kyslíku vede k poškození řasinkových buněk respiračního epitelu, k poškození endotheliálních buněk a pneumocytů (54, 64). V přítomnosti vysokého parciálního tlaku kyslíku v alveolech dochází k výraznému poškození alveolokapilární membrány s následkem zvýšené propustnosti membrány a vzniku plicního edému (11, 43). K tomuto poškození dochází již v časných fázích expozice vysokému parciálnímu tlaku kyslíku při zástavě cirkulace (9, 13). Oproti tomu v perfundovaném orgánu je významnější poškození patrné až po delší době expozice kyslíku (15, 61). Tyto rozdíly v době expozice nutné pro manifestaci toxických účinků kyslíku ukazují na rozdílnou míru toxicity vysokých koncentrací kyslíku u perfundovaných a neperfundovaných plic.

Tento toxický účinek kyslíku přítomného ve směsi plynů použité k umělé ventilaci neperfundovaných plic byl popsán nejen při jeho 100% koncentraci ve ventilační směsi, ale rovněž také při ventilaci atmosférickým vzduchem (47). V průběhu ischemie orgánu je ATP katabolizován na hypoxantin a dochází k přeměně xantin dehydrogenázy na xantin oxidázu. Po obnovení průtoku a tedy dodávky kyslíku k danému orgánu dojde k masivní produkci volných kyslíkových radikálů. Pokud je tedy v ischemických plicích tvořen hypoxantin a v důsledku ventilace je zajištěna kontinuální dodávka kyslíku, jsou přítomny oba substráty z nichž činností právě xantin oxidázy mohou vznikat velká množství volných kyslíkových radikálů. Tato hypotéza je rovněž podporována opakovaným experimentálním pozorováním, kdy podání superoxid dismutázy vedlo k v průběhu teplé ischemie k omezení produkce kyslíkových radikálů (71, 72) či zlepšení některých funkčních vlastností plic (47).



*Obr.1.2. Tvorba volných kyslíkových radikálů při ischemicko – reperfučním poškození – schéma dle de Perrota (23).*

## 1.7. ÚLOHA VOLNÝCH KYSLÍKOVÝCH RADIKÁLŮ V MECHANISMU HYPOXICKÉ PLICNÍ VAZOKONSTRIKCE

Přestože existuje celá řada průkazných studií o významu volných kyslíkových radikálů v mechanismu regulace plicního cévního tonu a průběhu akutní a chronické ventilační hypoxie, přesný mechanismus jejich účinku a role jednotlivých volných kyslíkových radikálů (ROS) v hypoxické plicní vazokonstrikci zůstávají nejasné. Jednou ze sporných otázek je, zda hlavním zdrojem radikálů zapojených v HPV je elektronový transportní řetězec na membráně mitochondrií – METC (82) nebo

membránová NADPH-oxidáza (30). Další otázkou zůstává, jaký charakter změny koncentrace ROS spouští HPV – zda se jedná o zvýšení tkáňové koncentrace či její pokles.

Jedna skupina experimentátorů reprezentovaná K. Weirem a S. Archerem předpokládá, že spouštěcím mechanismem hypoxické plicní vazokonstrikce je náhlý pokles v produkci ROS. Podle jimi zavedené „Redoxní teorie“ existuje tonická, kontinuální produkce ROS v plicích a plicním cévním řečišti během normoxie (5). V průběhu akutní ventilační hypoxie popisují velmi rychlou inhibici produkce radikálů jak v izolovaných perfundovaných plicích, tak na preparátu izolovaného kroužku z plicní artérie. Předpokládají, že působení akutní ventilační hypoxie na METC inhibuje produkci ROS.

Redukce či oxidace cysteinových a methioninových skupin redukčním mediátorem, tedy například ROS, může způsobit konformační změny  $K_V$  kanálů. Inhibice těchto  $K_V$  kanálů způsobí depolaziraci buněčné membrány s následnou aktivací  $Ca^{2+}$  kanálů typu L. Důsledkem je influx vápníkových iontů a vazokonstrikční reakce (60). Podle „Redoxní teorie“ existuje fyziologická úloha pro kontinuální produkci ROS. Superoxid, který je během normoxie v nízkých koncentracích produkován, je enzymem superoxid dismutázou (SOD) rychle metabolizován na peroxid vodíku, který je následně katalázou redukován na kyslík a vodu. Sled těchto reakcí má za následek jednak ochranu buňky před potenciálně škodlivým účinkem superoxidu, důležitým efektem je však právě udržování kontinuální buněčné koncentrace peroxidu vodíku, protože právě pokles koncentrace peroxidu vodíku iniciuje mechanismus HPV. Poznatek o stimulaci HPV poklesem koncentrace peroxidu vodíku potvrzují také výzkumy skupiny M. Wolina (30), přestože tito autoři považují za hlavní zdroj ROS membránovou NADPH-oxidázu.

V protikladu k těmto závěrům stojí pozorování, která učinil například Liu (50). Tento autor měřil změnu koncentrace ROS pomocí fluorescence dichlorofluoresceinu, lucigenové chemoluminiscence a elektronové paramagnetické rezonance (EPR). Všemi popsanými metodami pozoroval nárůst v produkci ROS v plicních artériích v průběhu akutní hypoxie. Stejná pozorování opakovaně učinil Schumacker, který předpokládá náhlý nárůst produkce ROS jakožto spouštěcí mechanismus ke změně konformace

napětově řízených kanálů s následkem zvýšení influxu vápníku do buňky a vazokonstrikční reakcí (81, 82).

Důležitou roli v intenzitě výsledné vazokonstrikční odpovědi hrají nepochybně také interakce ROS s oxidem dusnatým. Opakovaně byl popsán vazodilatační efekt NO v plicním cévním řečišti. Inhibice syntézy NO pomocí L-NAME či L-NMMA významně zvyšuje vazokonstrikční odpověď plicního cévního řečiště na ventilační hypoxii (4, 34). Snížení koncentrace superoxidu působením SOD brání tvorbě peroxynitritu a tak udržuje vyšší koncentraci NO. Právě schopnosti udržovat stálou vyšší koncentraci NO je přinejmenším částečně přičítán protektivní efekt SOD (6). Někteří autoři dokonce považují za hlavní význam antioxidantů askorbátu, redukovaného glutationu a SOD ochranu NO před superoxidovými anionty (49). Toto může být také mechanismus, kterým některé scavengery ROS inhibují hypoxickou plicní vazokonstrikci.

## **2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **2.1. ÚVOD**

Jak bylo zmíněno výše, kritickým faktorem v použitelnosti plic získaných od dárce s nebujícím srdcem pro transplantační účely je míra poškození plicních funkcí způsobená teplou ischemií a následnou reperfúzí. V experimentální části předkládané práce jsme se tedy zaměřili na možné protektivní ovlivnění teplé ischemie ventilací a preventivní heparinizací. Na základě níže popsaných primárních výsledků jsme dále testovali vliv použití scavengeru volných kyslíkových radikálů – tempolu, podaného preventivně před navozením teplé ischemie a následně v průběhu reperfúze. Pro vysvětlení efektu podání tempolu na ischemicko-reperfúzní poškození se v další části předkládané práce zabýváme mechanismem, kterým tempol inhibuje hypoxickou plicní vazokonstrikci.

## **2.2. VLIV VENTILACE A HEPARINIZACE NA POŠKOZENÍ PLIC ZPŮSOBENÉ TEPLOU ISCHÉMIÍ, EFEKT PODÁNÍ SCAVENGERU VOLNÝCH KYSLÍKOVÝCH RADIKÁLŮ, TEMPOLU, PŘED NAVOZENÍM TEPLÉ ISCHÉMIE**

### **2.2.1. Cíle studie**

V předcházejícím teoretickém úvodu byly zmíněny studie, které popisují možný protektivní význam ventilace plic při teplé ischemii na zachování jejich funkčních vlastností. Vedle studií, které tento efekt ventilace přikládají spíše alveolární distenzi (1, 78), existuje skupina autorů popisujících zhoršení sledovaných plicních funkcí u skupin zvířat, která byla v průběhu teplé ischemie ventilována (66, 79). Obdobně nejednoznačný je pohled na snižování posmrtné koagulace preventivním podáním heparinu (10, 66).

Cílem této části studie bylo tedy vytvořit experimentální model ischemicko-reperfúzního poškození a následného hodnocení funkčních vlastností plic laboratorního potkana. Na tomto modelu jsme poté testovali vliv podání heparinu před navozením srdeční zástavy a ventilace plic v průběhu teplé ischemie na sledované funkční parametry. Na základě dílčích výsledků tohoto experimentu jsme rovněž testovali vliv preventivního podání scavengeru volných kyslíkových radikálů, tempolu, na poškození způsobené teplou ischemií.

Výsledky této studie byly zveřejněny v publikaci (38), která tvoří součást disertační práce (Příloha 1).

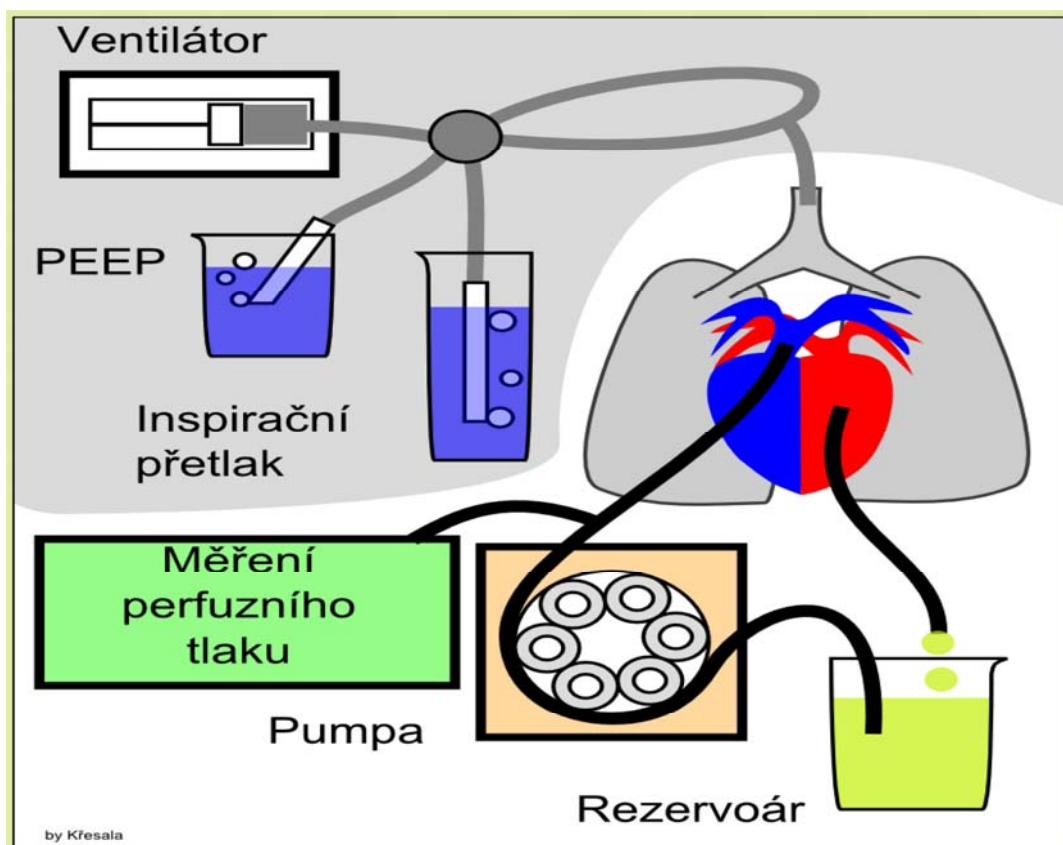
### **2.2.2. Materiál a popis metodiky**

#### ***2.2.2.1 Popis experimentální metody***

Protokol simulující postup odběru plic od dárce s nebijícím srdcem jsme ustanovili následovně.



Laboratorní potkan kmene Wistar byl anestetizován intraperitoneální aplikací thiopentalu sodného v dávce 50mg/kg. Následně byla vypreparována trachea a zavedena tracheální kanyla. Poté bylo experimentální zvíře usmrceno letální dávkou thiopentalu sodného (250mg/kg), podaného opět intraperitoneálně (45, 80). Následovala 1 hodina teplé ischémie, po kterou bylo zvíře ponecháno při laboratorní teplotě. Pak jsme provedli totální sternotomii, do hrudní dutiny zavedli 2 kanyly a preparát napojili na perfúzní chladicí okruh umístěný v chladné, teplotně stabilní komoře. Preparát jsme postupně zchladili na 12°C kontinuální topickou perfúzí hrudní dutiny Solným roztokem s Ficolem (4%). Tuto fázi označujeme jako studená ischémie a v našem experimentálním uspořádání trvala 90 minut. Poté byla perfúze ukončena, hrudní kanyly odstraněny a dříve popsáním postupem (33, 36) byl izolován orgánový blok srdce-plíce. Zavedená tracheální kanyla byla napojena na ventilátor (Harvard Rodent Ventilator 683; 50 dechů/min, pozitivní inspirační tlak 10 cm H<sub>2</sub>O, pozitivní tlak na konci výdechu, PEEP, 2 cm H<sub>2</sub>O) a plíce byly ventilovány normoxickou směsí plynů (21% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> + 74% N<sub>2</sub>). Následně byla zavedena kanyla do a.pulmonalis a do levé srdeční síně. Peristaltickou pumpou s nastaveným konstantním průtokem (4ml·100g t.hm.<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>) byl preparát perfundován Solným roztokem s Ficolem (4%) a Meclofenamátem (17·10<sup>-6</sup> M). Preparát byl prostřednictvím trachey upevněn do teplotně stálé (38 °C) vlhké komůrky. Poté co bylo odpuštěno prvních 20ml perfuzátu obsahujícího buněčný detritus a krevní elementy, byla výtoková kanyla napojena na cirkulační okruh. Následně byl preparát za kontinuální ventilace a perfúze ponechán ke stabilizaci dalších 15 minut (Schéma preparátu – obr. 1.3.).



*Obr. 1.3. Schéma uspořádání preparátu izolovaných perfundovaných plic*

Kontinuálně jsme po dobu 180 minut od reperfúze orgánu měřili velikost perfúzního tlaku, změnu hmotnosti plic a transportní schopnost plic pro kyslík. Pro měření perfúzního tlaku jsme použili tlakový snímač (Pressure transducer, PowerLab, ADI Instruments), připojený na vtokovou plicní kanylu. Pomocí dalšího převodníku (Force transducer, PowerLab, ADI Instruments) jsme kontinuálně měřili změnu hmotnosti preparátu, jakožto ukazatele rozvoje plicního edému. V časových intervalech 30, 90, 120 a 180 min od zahájení perfúze preparátu jsme měřili arterio – venózní rozdíl v parciálním tlaku  $O_2$ , tedy parametr transportní schopnosti plic pro kyslík. V popsáných časových intervalech byly provedeny odběry perfuzátu vždy z vtokové a výtokové plicní kanyly a v nich byl ihned po odběru stanoven parciální tlak kyslíku (ABL<sup>TM</sup> 5, Radiometer Medical A/S, Copenhagen, Denmark). Vzhledem k tomu, že experimenty provádíme na preparátu izolovaných plic bez jakéhokoliv předřazeného orgánu, který by svou činností spotřeboval kyslík a produkoval  $CO_2$ , bylo třeba parciální tlak kyslíku v perfuzátu přitékajícím do plic uměle snižovat. Toho jsme

dosáhli sycením perfuzátu v rezervoáru směsí plynů 5%CO<sub>2</sub> + 95%N<sub>2</sub>. Za těchto podmínek představoval rozdíl parciálního tlaku O<sub>2</sub> ve vtokové a výtokové kanyle ( $\Delta pO_2$ ) spolehlivý ukazatel transportní schopnosti plic.

### 2.2.2.2. Experimentální skupiny

Tento celý pokus byl rozdělen do tří dílčích, po sobě jdoucích experimentů:

*Experiment A – vliv ventilace v průběhu teplé ischemie na měřené funkční vlastnosti plic*

*Experiment B – vliv podání heparinu před navozením srdeční zástavy*

*Experiment C – ověření protektivního účinku scavengeru volných kyslíkových radikálů, tempolu, na měřené funkční vlastnosti plic*

	Skupiny	teplá ischemie	heparin	ventilace	tempol	počet zvířat
<b>Experiment A</b> <i>vliv ventilace</i>	Ak- kontroly	-	+	-	-	6
	An	+	-	-	-	6
	Av	+	-	vzduch	-	6
<b>Experiment B</b> <i>vliv podání heparinu</i>	Hh	+	+	-	-	6
	Hv	+	+	vzduch	-	6
<b>Experiment C</b> <i>vliv podání tempolu</i>	Tk - kontroly	-	+	-	+	6
	Tn	+	+	-	+	6
	Tv	+	+	vzduch	+	6

*Tab. 1 – Experimentální skupiny*

*Experiment A – vliv ventilace v průběhu teplé ischemie na měřené funkční vlastnosti plic*

Pro tuto část pokusu byly vytvořeny tři skupiny laboratorních zvířat – experimentální An, Av a kontrolní skupina Ak (Tab.1). V případě experimentální skupiny (An, Av) jsme postupovali podle výše popsaného protokolu odběru plic od dárce s nebijícím srdcem. Po anestézii, intubaci a usmrcení thiopentalem byla zvířata ze skupiny Av v průběhu 60 minut teplé ischemie ventilována vzduchem, zatímco skupina

An byla ponechána při teplé ischemii intaktní. Další postup, tedy studená ischemie, izolace orgánového bloku a hodnocení plicních funkcí bylo u obou skupin identické.

U kontrolní skupiny byl orgánový blok srdce plíce izolován v thiopentalové anestezii, tato zvířata tak neprodělala teplou ani studenou ischemii. Postup preparace a následná měření se opět zcela shodovali s pokusnými skupinami.

### ***Experiment B – vliv podání heparinu před navozením srdeční zástavy***

V experimentu B byla zvířata rozdělena do dvou experimentálních skupin – Hn a Hv (Tab.1.). Laboratorním potkanům v obou skupinách byla před usmrcením intrahepatálně podána bolusová dávka 600 I.U. heparinu (45). Zvířata byla následně intubována a usmrcena anestetikem. Při následné teplé ischemii byli potkani skupiny Hv ventilováni vzduchem, zatímco skupina Hn byla ponechána intaktní. Další experimentální postup byl u obou skupin zcela identický a odpovídal výše popsanému protokolu.

Jako kontrolní byla využita skupina Ak, popsaná v experimentu A.

### ***Experiment C – ověření protektivního účinku scavengeru volných kyslíkových radikálů, tempolu, na měřené funkční vlastnosti plic***

Vzhledem k dříve popsané vyšší produkci volných kyslíkových radikálů v ischemické tkáni jsme v této části pokusu testovali účinek vybraného scavengeru volných radikálů kyslíku.

Námi vybraným scavengerem ROS byl tempol (4-hydroxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl). U této látky byl opakovaně popsán efekt podobný účinku superoxid dismutázy – tedy přeměna volného superoxidu na peroxid vodíku. Zároveň byl u tempolu na preparátech buněčných i tkáňových kultur popsán protektivní účinek v prostředí s vysokou koncentrací peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu. Další výhodou tempolu je jeho volná prostupnost biologickými membránami a tedy intracelulární účinek.

V experimentu C jsme tedy vytvořili 3 skupiny potkanů – Tv, Tn a Tk (Tab.1.). Zvířatům ze skupin Tn a Tv byl po navození anestezie podán v bolusové dávce 50mg/kg intraperitoneálně tempol. Vzhledem k již známým výsledkům předchozích experimentálních částí byl zvířatům z obou skupin před usmrcením rovněž podán heparin. V průběhu následné teplé ischémie byla skupina Tv ventilována vzduchem, zatímco skupina Tn byla ponechána intaktní. Další postup zcela odpovídal výše popsanému protokolu.

Jako kontrolní jsme opět využili skupinu z předchozího experimentu – Ak. Pro ověření účinku tempolu na plicní funkce jsme vytvořili také druhou kontrolní skupinu – Tk. Zvířatům z této skupiny byl v anestezii intraperitoneálně podán tempol, poté byla provedena preparace bloku srdce-plíce, stejně jako u kontrolní skupiny.

### ***2.2.2.3. Statistické hodnocení výsledků***

Výsledky byly hodnoceny metodou analýzy variací opakovaných měření (ANOVA) s následnými testy dle Fishera (Fisher PLSD post hoc) a Gamese/Howella. K hodnocení byl použit software StatView 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Výsledky jsou číselně i graficky vyjadřovány jako střední hodnoty  $\pm$  SEM.

## **2.2.3. Výsledky**

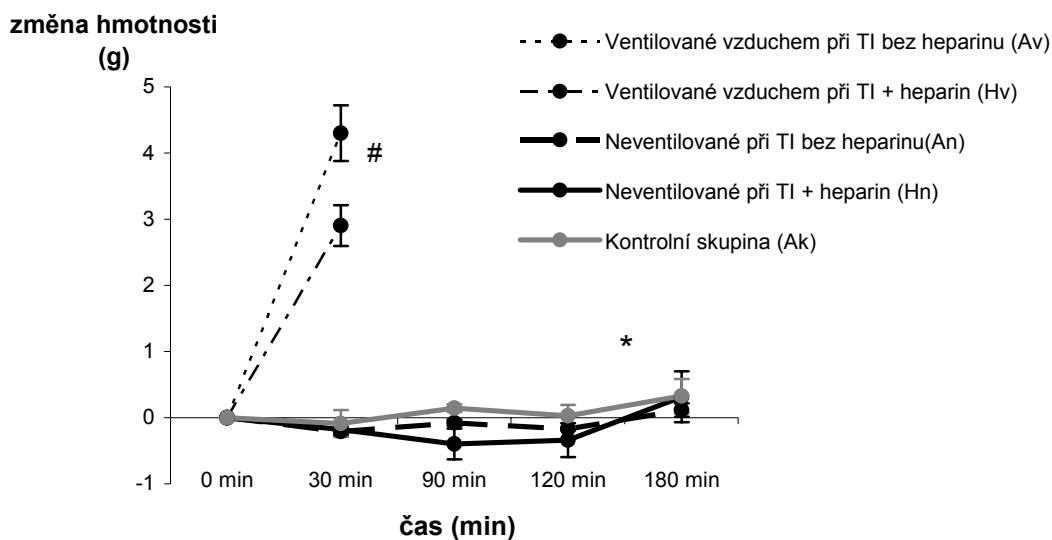
### ***2.2.3.1. Zhodnocení funkčnosti preparátu v jednotlivých skupinách***

Všechny preparáty získané ze skupin, které v průběhu teplé ischémie nebyly ventilovány (An, Hn), stejně jako všechny preparáty kontrolní skupiny (Ak), byly funkčně hodnotitelné po celou dobu stanovenou protokolem (180 minut). To znamená, že nebyla zaznamenána přítomnost masivního plicního edému, výrazné zvýšení prefúzního tlaku nebo porušení transportní schopnosti plic pro kyslík. Stejně tak jsme

ve všech těchto případech pozorovali signifikantní vazokonstrikční odpověď na bolusovou stimulaci angiotenzinem II a ventilaci hypoxickou směsí plynů.

Oproti tomu téměř u všech preparátů (vždy 5 ze skupiny 6ti zvířat) ze skupin, které byly ventilovány v průběhu teplé ischemie (Hv, Av), byl pozorován masivní plicní edém, který se manifestoval bezprostředně po počátku reperfúze a do 30ti minut se rozvinul natolik, že znemožňoval další funkční hodnocení plic (viz. níže, Obr. 2.2.4.).

V protikladu k těmto výsledkům u ventilovaných skupin v experimentu A a B, preparáty ze skupin v experimentu C, kterým byl podán tempol, byly dobře funkčně hodnotitelné po celou dobu stanovenou protokolem bez výraznějších známek rozvoje edému, a to bez ohledu, zda byly v průběhu teplé ischemie ventilovány nebo ne (Obr. 2.2.1.).



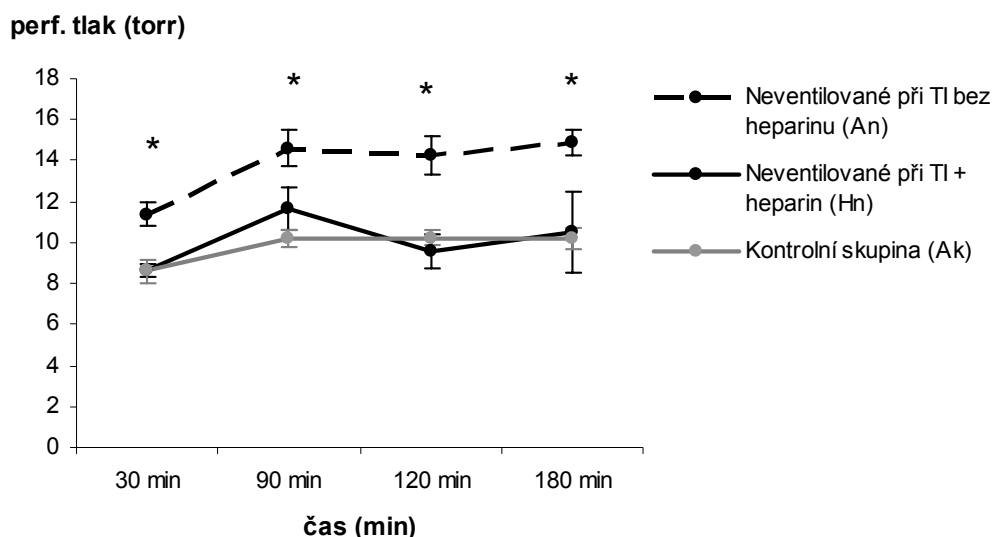
**Obr. 2.2.1. Ventilace plic vzduchem v průběhu teplé ischemie vede k tvorbě plicního edému**  
# Výrazný nárůst hmotnosti preparátu, ukazující na přítomnost plicního edému; \* V průběhu posledních 60ti minut experimentu došlo k mírnému nárůstu hmotnosti preparátu u všech sledovaných skupin ( $p < 0,001$ ).

### 2.2.3.2. Funkční hodnocení plic

#### *Vliv ventilace a heparinizace na funkční vlastnosti plic (Experiment A, B)*

Mezi neventilovanými skupinami (An, Hn) a kontrolní skupinou jsme nezaznamenali signifikantní rozdíl v parametru změny hmotnosti preparátu.

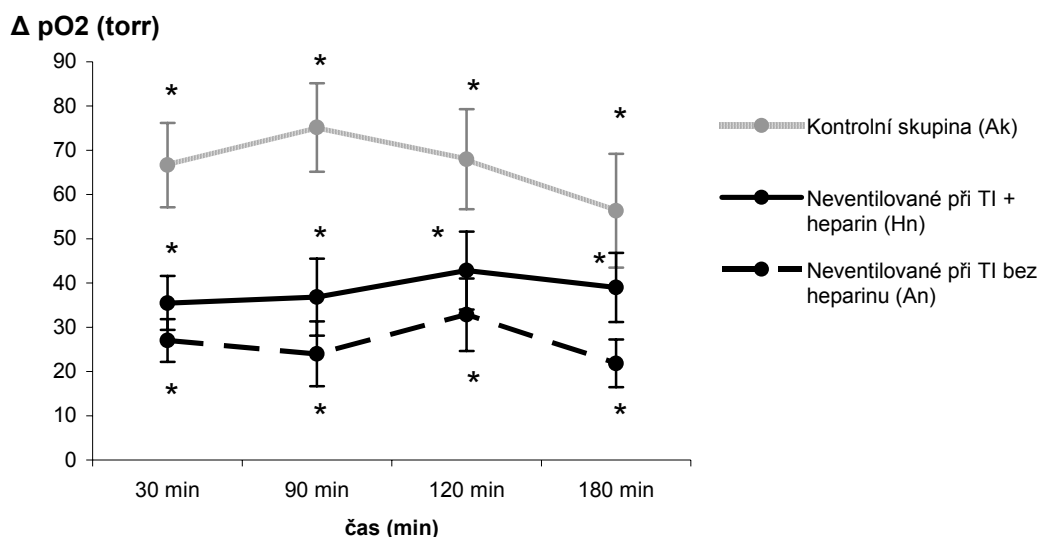
Vzhledem k masivnímu plicnímu edému, pozorovanému u obou ventilovaných skupin (Av, Hv) jsme transportní schopnost plic pro kyslík a perfúzní tlak hodnotili pouze u neventilovaných skupin a kontrol. Perfúzní tlak u neventilované skupiny bez heparinu (An) byl signifikantně vyšší ve srovnání s analogickou skupinou s heparinem (Hn) i se skupinou kontrolní, Ak (Obr. 2.2.2.).



**Obr. 2.2.2. Heparinizace zabránila zvýšení perfúzního tlaku v plicním cévním řečišti U skupiny, které nebyl podán heparin (An), jsme pozorovali signifikantní nárůst perfúzního tlaku ve srovnání s heparinizovanou i kontrolní skupinou (Hn, Ak); \*  $p < 0,005$ .**

Nejlepší transportní schopnost plic pro kyslík, vyjádřenou jako arterio-venózní diferenci parciálního tlaku kyslíku ( $\Delta pO_2$ ), jsme zaznamenali u kontrolní skupiny. Tato změna byla u kontrolní skupina signifikantně vyšší ve srovnání s oběma neventilovanými skupinami (An, Hn). Tento rozdíl byl však výrazně vyšší při srovnání kontrolní skupiny se skupinou bez heparinu, než při srovnání kontrol s heparinizovanou

skupinou. Rovněž při vzájemném srovnání obou neventilovaných skupin jsme zjistili signifikantně vyšší  $\Delta pO_2$  u skupiny, které byl před navozením srdeční zástavy podán heparin (Obr. 2.2.3.).



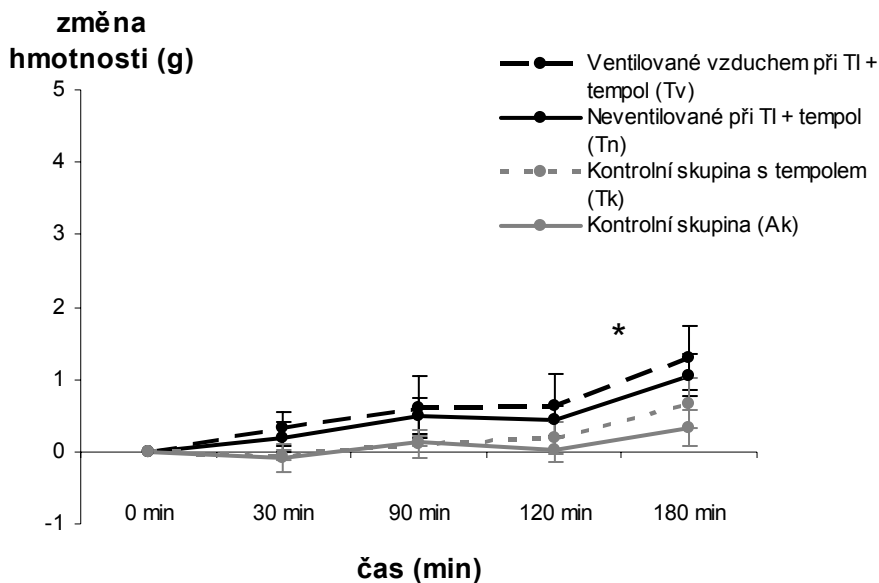
**Obr. 2.2.3. Podání heparinu před navozením srdeční zástavy částečně brání poklesu transportní schopnosti plic pro kyslík; \*  $p < 0,05$ .**

### ***Vliv podání tempolu na funkční vlastnosti plic***

Mezi kontrolní skupinou (Ak) a kontrolní skupinou s tempolem (Tk) jsme nezaznamenali žádné rozdíly ve sledovaných hodnotách.

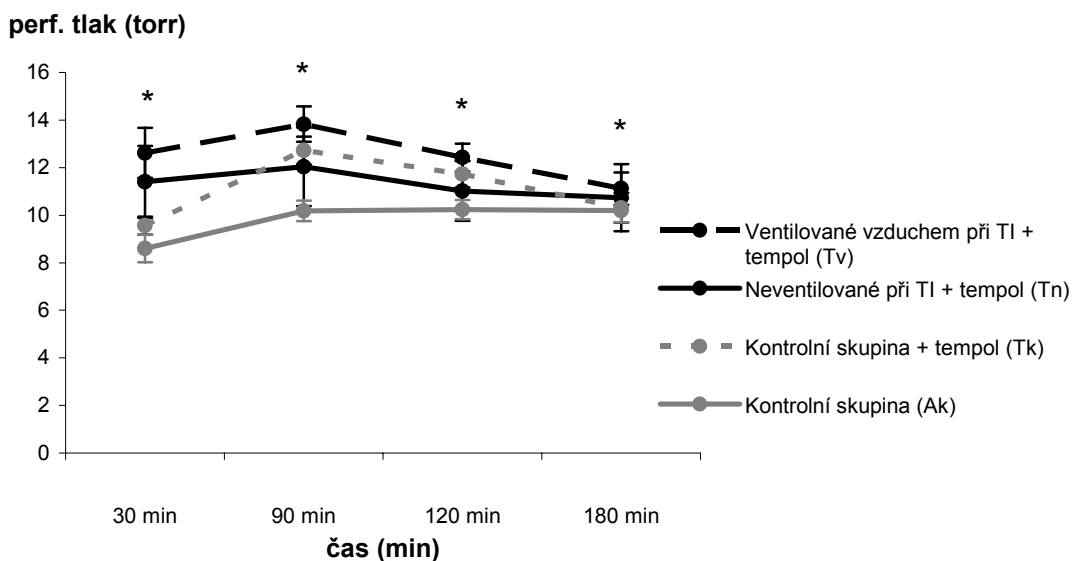
Podání tempolu zabránilo tvorbě plicního edému u preparátů ze zvířat, která byla v průběhu teplé ischemie ventilována vzduchem. Změna hmotnosti preparátu se u neventilované (Tn), stejně jako u ventilované skupiny s tempolem (Tv) signifikantně nelišila od skupiny kontrolní (Ak), ani od skupiny kontrolní s tempolem (Tk, Obr.2.2.4.).





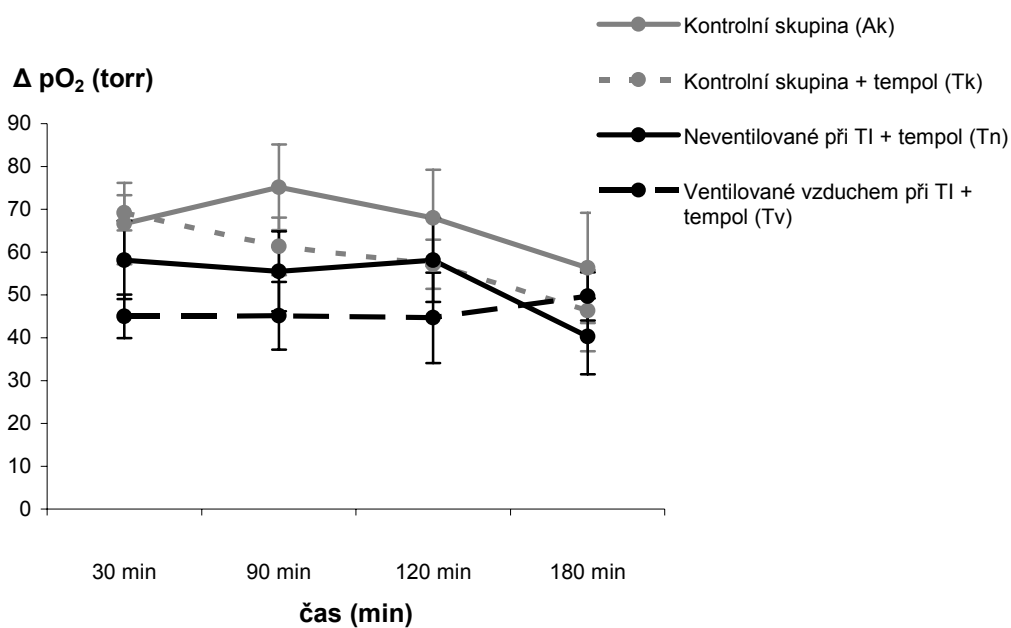
**Obr. 2.2.4. Podání tempolu před srdeční zástavou zabránilo vzniku plicního edému po reperfúzi** U všech skupin bylo po 120 minutách perfúze pozorováno zvýšení hmotnosti; \*  $p < 0,001$ .

Pozorovali jsme pouze mírný nárůst perfúzního tlaku u ventilované skupiny (Tv) ve srovnání s kontrolami (Ak,  $p < 0,05$ ), mezi ostatními skupinami žádné rozdíly v perfúzním tlaku nebyly (Obr. 2.2.5).



**Obr. 2.2.5. Vliv podání tempolu na velikost perfúzního tlaku**

Rovněž v hodnotě  $\Delta pO_2$  jsme nezaznamenali žádné rozdíly mezi skupinami s tempolem (Tk, Tn, Tv), narozdíl od signifikantně horší transportní schopnosti pro kyslík, pozorované u neventilovaných skupin bez tempolu (An, Hn) ve srovnání s kontrolami (Obr. 2.2.6.).



**Obr. 2.2.6.** Podání tempolu zabránilo poklesu transportní schopnosti plic pro kyslík, pozorované u skupin bez tempolu (Experiment A, B).

#### 2.2.4. Shrnutí výsledků a dílčí závěr

Klíčové výsledky popsaného experimentu je možné shrnout do těchto bodů:

1. Preventivní podání heparinu před navozením srdeční zástavy a následným vystavením plic jedné hodině teplé ischemie brání zvýšení prefúzního tlaku a zlepšuje transportní schopnost plic pro kyslík po obnovení perfúze preparátem.

2. Ventilace plic atmosférickým vzduchem po dobu trvání teplé ischémie vedla k rozvoji masivního plicního edému bezprostředně po reperfúzi.
3. Preventivní podání scavengeru volných kyslíkových radikálů, tempolu, zabránilo poškození plic ventilací v průběhu teplé ischémie. Tempol rovněž zlepšuje transport kyslíku v plicích získaných od dárce s nebijícím srdcem.

Výsledky této studie tedy podporují představu o významné úloze volných kyslíkových radikálů při ischemickém poškození plic. Předpokládáme tedy, že časné podání heparinu a scavengeru volných kyslíkových radikálů se schopností prostupovat buněčnými membránami, tedy například tempolu, může napomoci ke zlepšení protokolu odběru a uchování plic získaných od dárců s nebijícím srdcem. V našem experimentu zvolené podání heparinu a tempolu před navozením srdeční zástavy by bylo možné převést do klinické praxe například intrakardiální aplikací dané látky po neúspěšné kardiopulmonální resuscitaci s následnou distribucí do plicního cévního řečiště nepřímou srdeční masáží. Tento postup také pro podání heparinu zvolil Steen v protokolu první klinicky úspěšné transplantace plic získaných od dárce s nebijícím srdcem (70). Podrobná diskuse výsledků je předmětem přiložené publikace (Příloha 1, (38)).

## **2.3. VLIV PODÁNÍ TEMPOLU V PRŮBĚHU REPERFÚZE PLIC, TESTOVÁNÍ PROTEKTIVNÍHO ÚČINKU NA ISCHÉMICKO REPERFÚZNÍ POŠKOZENÍ**

### **2.3.1. Cíle studie**

V tomto navazujícím experimentu jsme se zaměřili na období obnovení průtoku orgánem po předchozí expozici teplé ischemii. V této klinicky velmi významné fázi dochází často k ischemicko-reperfúznímu poškození.

Zjistili jsme, že u námi používaného scavengeru volných kyslíkových radikálů, tempolu, popisuje celá řada autorů pozitivní efekt na ischemicko – reperfúzní poškození (IRI). Existují studie referující o protektivním účinku této látky podané při obnovení perfúze v myokardu (56), ledvinou (41), kličkou tenkého střeva (73, 77) a mozkovou tkání (18, 65). Zatím jsme se však nesetkali s prací popisující efekt tempolu na ischemicko-reperfúzní poškození při transplantaci plic.

Cílem tohoto experimentu bylo tedy ověřit hypotézu, že podání tempolu v průběhu reperfúze ovlivní ischemicko-reperfúzní poškození plic (39).

### **2.3.2. Materiál a popis metodiky**

Experimentální protokol odběru plic i následného hodnocení funkčních vlastností plic byl ustaven obdobně jako v předchozím experimentu (kap. 2.2.2.). Laboratorní potkani kmene Wistar byli anestezováni, heparinizováni a následně usmrceni předávkováním thiopentalu sodného. Poté byli po dobu 60 minut ponecháni intaktní (teplá ischemie). Vzhledem k výsledkům předchozích experimentů tedy zvířata při teplé ischemii nebyla ventilována. Poté byl ustaven preparát izolovaných perfundovaných a ventilovaných plic laboratorního potkana a při zachování stejného experimentálního protokolu jsme testovali vliv tempolu podaného do perfuzátu před obnovením průtoku. Tempol byl tedy podán přímo do nádobky perfuzátu v dávce 0,5mg/1ml perfuzátu.

Byly tedy ustanoveny tři skupiny laboratorních potkanů:

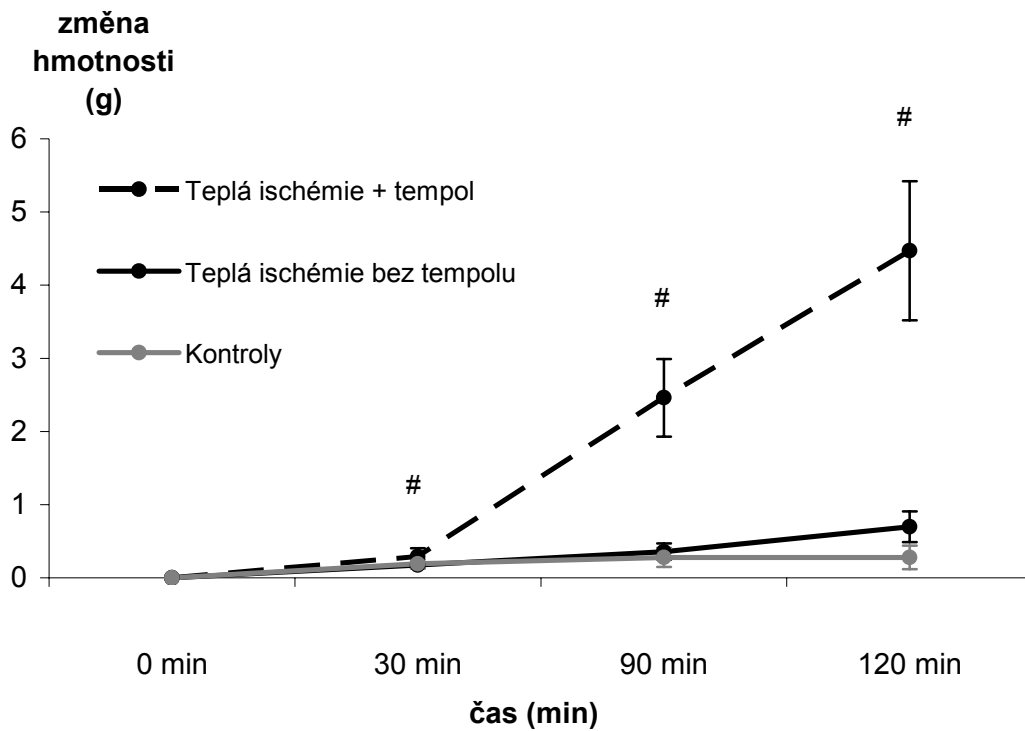
1. Zvířata vystavená teplé ischemii po dobu 1 hodinu, při zahájení reperfúze byl do perfuzátu přidán tempol v popsané dávce – ***teplá ischemie + tempol***.

2. Zvířata vystavená teplé ischemii po dobu 1 hodinu, reperfúze s následným hodnocením plicních funkcí provedena perfúzním roztokem bez tempolu - ***teplá ischemie bez tempolu***.

3. ***Kontrolní skupina*** – izolace orgánového bloku srdce-plíce byla provedena bezprostředně po navození anestézie, tedy bez periody teplé ischemie.

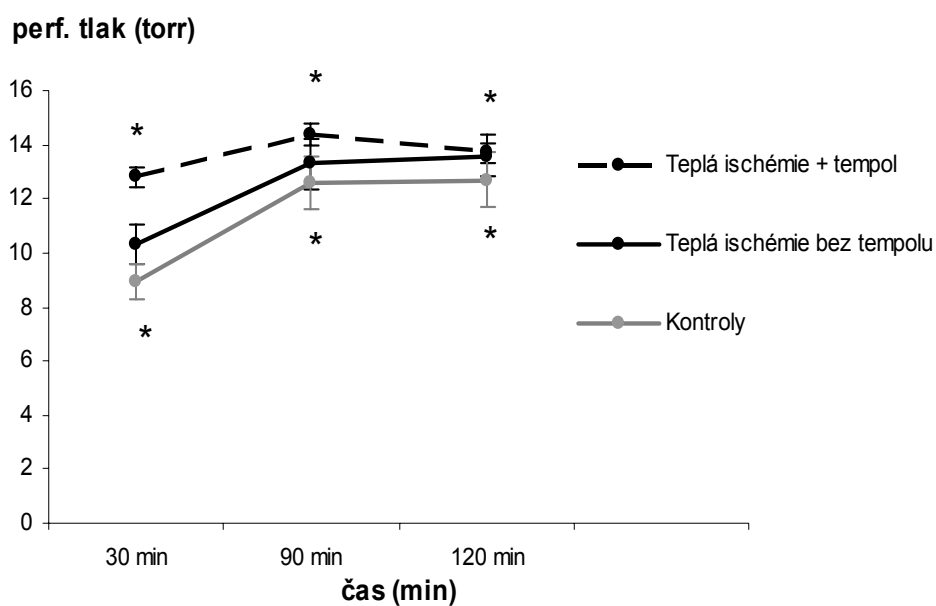
### 2.3.3. Výsledky

Při hodnocení rozvoje plicního edému na základě měření změny hmotnosti preparátu jsme zjistili, že u skupiny kontrol, stejně jako u skupiny, která prodělala teplou ischemii bez tempolu, nedošlo v průběhu hodnocení k signifikantní změně hmotnosti. Oproti tomu u skupiny, která po jedné hodině teplé ischemie byla perfundována roztokem s tempolem došlo k postupnému, nicméně významnému rozvoji plicního edému. Tento rozdíl byl statisticky signifikantní oproti skupině bez tempolu i kontrolní skupině (Obr. 2.3.1.)



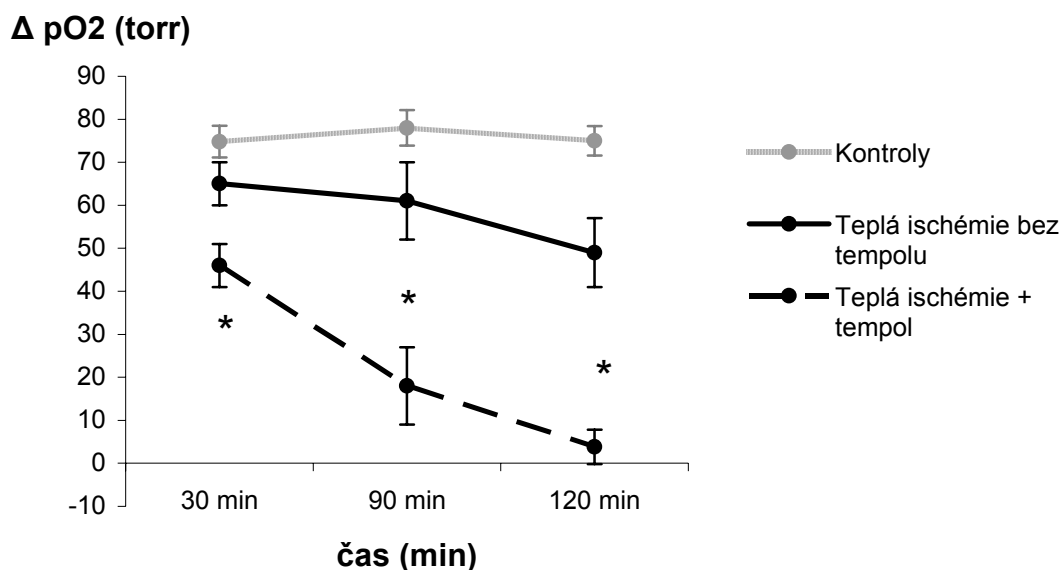
**Obr. 2.3.1. Podání tempolu v průběhu reperfuze vedlo ke vzniku plicního edému; (#  $p < 0,005$ )**

Hodnoty perfúzního tlaku u skupiny perfundované roztokem s tempolem byly statisticky signifikantně vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou. Takovéto zvýšení perfúzního tlaku jsme nezaznamenali u skupiny bez tempolu při srovnání s kontrolní skupinou (Obr. 2.3.2.)



**Obr. 2.3.2. Podání tempolu v průběhu reperfuze způsobilo mírné zvýšení perfúzního tlaku ve srovnání s kontrolní skupinou (\*  $p < 0,05$ )**

Transportní schopnost plic pro kyslík, měřená jako arterio-venózní diference parciálního tlaku kyslíku v perfuzátu, byla signifikantně zhoršená u tempolem perfundované skupiny, a to ve srovnání jak s kontrolami, tak se skupinou bez tempolu (Obr. 2.3.3.).



**Obr. 2.3.3** Podání tempolu v průběhu reperfuze vedlo k výraznému zhoršení transportní schopnosti plic pro kyslík ve srovnání s kontrolní skupinou i skupinou bez tempolu (\*  $p < 0,05$ )

#### 2.3.4. Shrnutí výsledků a dílčí závěr

Zjistili jsme tedy, že podání tempolu do perfúzního roztoku vede k výraznému zhoršení plicních funkcí a k signifikantnímu vzestupu hmotnosti plic vlivem rozvíjejícího se plicního edému. Rovněž perfúzní tlak byl vyšší a transportní schopnost takto edematózních plic byla signifikantně zhoršená ve srovnání s experimentální skupinou bez tempolu a kontrolní skupinou.

Tento závěr negativního efektu tempolu je ve zdánlivém rozporu s výsledky předchozí studie. My si tyto výsledky vysvětlujeme na základě potenciálně protektivního účinku hypoxické plicní vazokonstrikce na optimalizaci poměru ventilace/perfuze v plicích. Po jedné hodině teplé ischemie je s velkou pravděpodobností v plicích značné množství atelektatických oblastí, které zůstanou neventilované i po znovuoobnovení umělé ventilace a perfuze. V takovémto případě může hypoxická plicní vazokonstrikce vést k redistribuci průtoku do lépe ventilovaných



oblastí plic. Z předchozích experimentů víme, že tempol inhibuje hypoxickou plicní vazokonstrikci (40). Tato inhibice může tedy vést k přetrvávající perfúzi atelektatických oblastí s následným vznikem plicního edému a z toho rezultujícím zhoršení transportní schopnosti plic pro kyslík.

Výsledky této studie lze tedy shrnout tak, že podání tempolu před obnovením průtoku ischemickými plícemi vede k tvorbě plicního edému a zhoršení transportní schopnosti plic pro kyslík. Narozdíl od jiných orgánů tedy v plících tempol nepůsobí protektivně na ischemicko–reperfúzní poškození.

## 2.4 INHIBICE HYPOXICKÉ PLICNÍ VAZOKONSTRIKCE VYVOLANÁ TEMPOLEM

### 2.4.1. Úvod, cíle studie

Jednou z možných interpretací výsledků předchozí série experimentů je inhibice HPV v průběhu reperfúze tempolem. V této sérii pokusů jsme se rozhodli ozřejmit úlohu volných kyslíkových radikálů při hypoxické plicní vazokonstrikci a zejména zkoumat vliv tempolu, tedy látky se superoxid dismutázovým účinkem, na velikost HPV.

Hypoxická plicní vazokonstrikce (HPV) je mechanismus, který umožňuje efektivní redistribuci krve do lépe ventilovaných oblastí plicních cévního řečiště. Optimalizuje tak poměr ventilace/perfúze a tedy zvyšuje parciální tlak kyslíku v plicních žilách. Jedná se o lokální regulační mechanismus, který se vyznačuje rychlým nástupem účinku a při reoxygenaci hůře perfundovaných oblastí je plně reverzibilní.

Samotná přítomnost a intenzita hypoxické plicní vazokonstrikce je významně ovlivňována produkcí a následnými interakcemi mezi volnými kyslíkovými radikály a oxidem dusnatým. Bylo opakovaně experimentálně prokázáno, že akutní ventilační hypoxie vede k změnám v produkci superoxidu v mitochondriálním řetězci transportu elektronů či vyšší aktivitou NADPH oxidázy (51, 55). Podání superoxid dismutázy či neselektivního inhibitoru NADPH oxidázy, diphenyleneiodonia, signifikantně snižuje intenzitu HPV (50, 74). Hypoxie stimuluje nárůst produkce NO v plicích a je známo, že inhibitory NO synthasy zvyšují HPV (34). V přítomnosti NO superoxid velmi rychle reaguje za tvorby peroxynitritu, který má rovněž vazokonstrikční účinky a tato reakce je téměř desetkrát rychlejší než dismutace superoxidu prostřednictvím SOD (7). Z toho vyplývá, že vychytávání superoxidu cestou SOD může vést k relativní nadprodukci NO a zároveň inhibovat tvorbu peroxynitritu. Důsledkem obou těchto jevů je oslabení HPV. Druhou možností však zůstává přímé ovlivnění HPV snížením koncentrace superoxidu s vazokonstrikčním efektem.

Cílem této studie tedy bylo ověřit hypotézu, zda je inhibice HPV tempolem způsobena přímo snížením koncentrace superoxidu, či relativní nadprodukcí NO.

Jelikož víme, že intenzita vazokonstrikční odpovědi na hypoxickou stimulaci je závislá také na předchozí stimulaci (3, 57), v druhé části této studie jsme se zabývali ovlivněním účinku tempolu na HPV změnou bazálního vaskulárního tonu.

Výsledky této studie byly zveřejněny v publikaci (40), která tvoří součást této disertační práce (Příloha 2).

#### **2.4.2. Materiál a popis metodiky**

Experimenty této studie byly provedeny na preparátu izolovaných perfundovaných plic laboratorních potkanů kmene Wistar. V anestezii thiopentalem sodným byl výše popsaným způsobem vytvořen preparát izolovaných plic (viz. kap.2.2.2.). V průběhu experimentu jsme kontinuálně monitorovali perfúzní tlak, který, vzhledem ke konstantnímu průtoku perfuzátu plicemi, odpovídá plicní vaskulární rezistenci. Studii jsme realizovali ve dvou navazujících experimentech.

##### ***2.4.2.1. Experiment A – vliv inhibice produkce NO a snížení koncentrace superoxidu tempolem na velikost hypoxické plicní vazokonstrikce***

Plíce byly po vypreparování, napojení na recirkulační okruh a obnovení umělé ventilace normoxickou směsí plynů (21% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> + 74% N<sub>2</sub>) ponechány 15 minut ke stabilizaci. Poté byla testována reaktivita na akutní ventilační hypoxii (0% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> + 95% N<sub>2</sub>) a angiotenzin II.

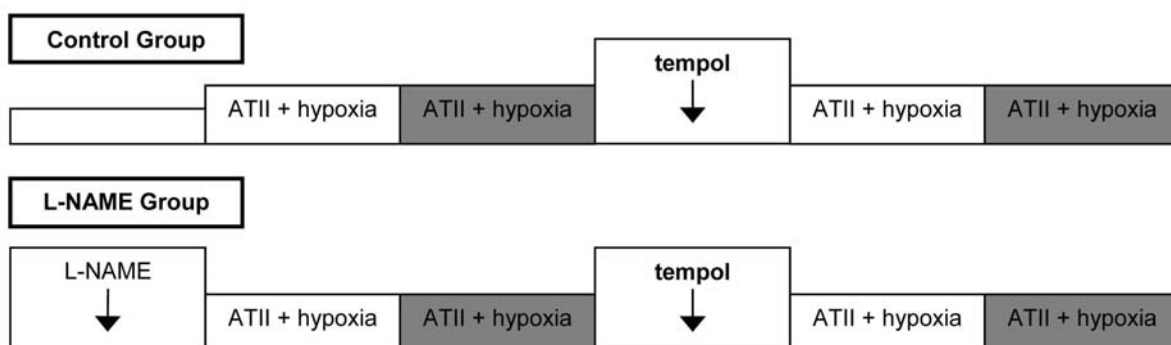
Bolus angiotenzinu II (AT II, 0.2 µg) byl aplikován do vtokové kanyly umístěné v plícnici a vedl k přechodnému vzestupu perfúzního tlaku (obvykle méně než 2 minuty). Po osmi minutách od aplikace ATII byla provedena šest minut trvající ventilace plic hypoxickou směsí plynů. Tento cyklus ATII-hypoxie byl opakován celkem dvakrát. Postup s opakováním stimulace byl zvolen vzhledem ke známé skutečnosti, izolované plíce perfundované solným roztokem s albuminem jsou ve srovnání s krevní perfúzí relativně hyporeaktivní. Pro vyvolání srovnatelné vazokonstrikční odpovědi, která je v čase stabilní, se tak běžně užívají dvě navazující stimulační (28, 35, 57). Deset minut po druhé stimulaci hypoxickou směsí plynů byl do

nádobky perfuzátu podán tempol v dávce 0,5mg/ml. Dávku tempolu jsme zvolili na základě předchozích experimentů, kdy jsme právě při této koncentraci pozorovali 81% inhibici odpovědi na ATII a 67% inhibici vazokonstrikce vyvolané ventilační hypoxií. Tato dávka rovněž odpovídá v literatuře doporučovaným hodnotám (73). Po deseti minutách jsme opakovali dva cykly stimulace plic ATII a akutní ventilační hypoxií.

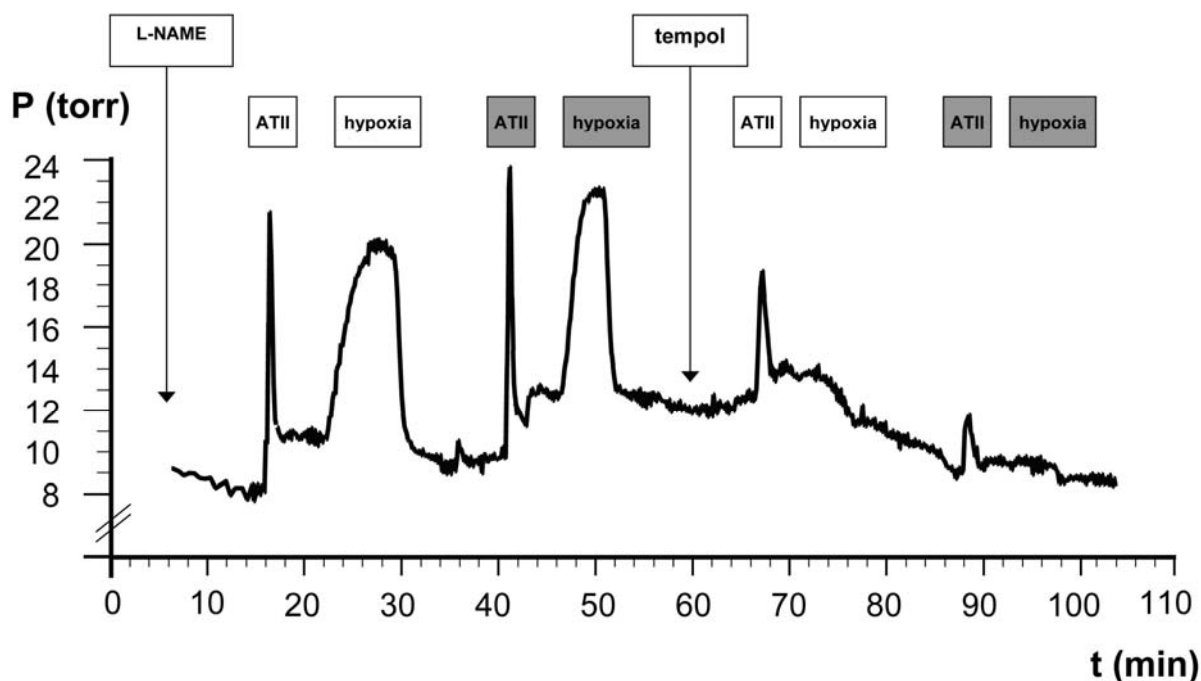
Pro experiment jsme vytvořili dvě skupiny zvířat:

1. Kontrolní skupina (6 zvířat) – postup dle výše popsaného protokolu
2. Skupina s L-NAME (6 zvířat) – produkce NO byla inhibována podáním neselektivního blokátoru NO synthetasy L-NAME v dávce  $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$  do perfuzátu na počátku experimentu v průběhu ekvilibrace.

Následně byly srovnávány změny v perfúzním tlaku vyvolané v průběhu 2. a 4. cyklu stimulace ATII a ventilační hypoxií (schématické znázornění – Obr. 2.4.1., 2.4.2.).



**Obr. 2.4.1. Protokol experimentu A**



Obr. 2.4.2. Záznam měření experimentu A;  $P(\text{torr})$  znázorňuje perfúzní tlak.

#### 2.4.2.2. Experiment B – vliv změny bazálního perfúzního tlaku na tempolem vyvolanou inhibici hypoxické plicní vazokonstrikce

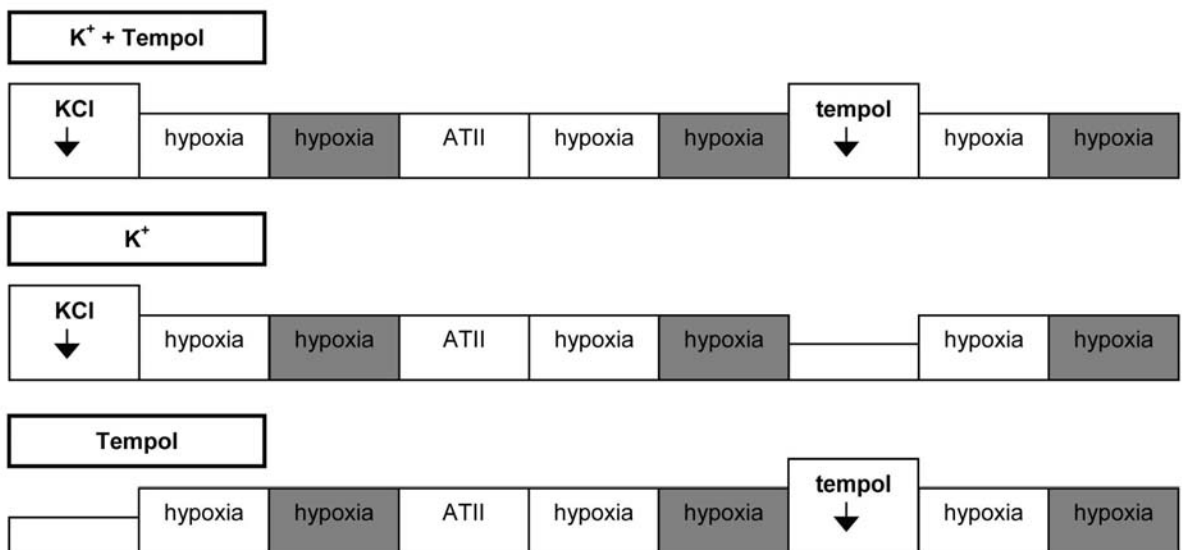
Jelikož víme, že vazokonstrikční odpověď plicního cévního řečiště na ventilační hypoxii je závislá na velikosti bazálního tlaku (28, 57), rozhodli jsme se ověřit, zda také tempolem vyvolaná inhibice závisí na velikosti bazálního tlaku v plicním cévním řečišti. Zvýšení bazálního tlaku jsme dosáhli depolarizací hladké svaloviny cév zvýšením koncentrace draslíkových iontů v perfuzátu o 15mmol/l (výsledná koncentrace  $K^+$  byla 19,7 mmol/l).

V experimentu jsme vytvořili tři skupiny laboratorních zvířat (Obr. 2.4.3.):

1. **Skupina  $K^+$  + tempol** (5 zvířat). Na počátku perfúze zvýšen bazální tonus přidáním KCl do perfuzátu, poté 15 min. ekvilibrace, dvě následné stimulece ventilací hypoxickou směsí plynů ( $0\% O_2 + 5\% CO_2 + 95\% N_2$ ), bolusové podání ATII, opět dvě stimulece hypoxií. Poté byl do perfuzátu přidán tempol (0,5mg/ml) a plice vystaveny dalším dvěma ventilačním hypoxiím.

2. **Skupina  $K^+$**  (5 zvířat) – identický experimentální protokol, pouze po čtvrté hypoxii nebyl do perfuzátu přidán tempol.
3. **Skupina tempol** (5 zvířat) – skupina s uměle nezvýšeným bazálním tonem (bez KCl), další postup byl identický jako u skupiny 1.

Při hodnocení jsme se tedy zaměřili na změnu perfúzního tlaku způsobenou 2. hypoxickou stimulací (vliv zvýšení bazálního tonu), 4. hypoxickou stimulací (vliv aplikace ATII) a 6. stimulací (vliv tempolu). Schématické znázornění experimentálního protokolu – viz. Obr.2.4.3.

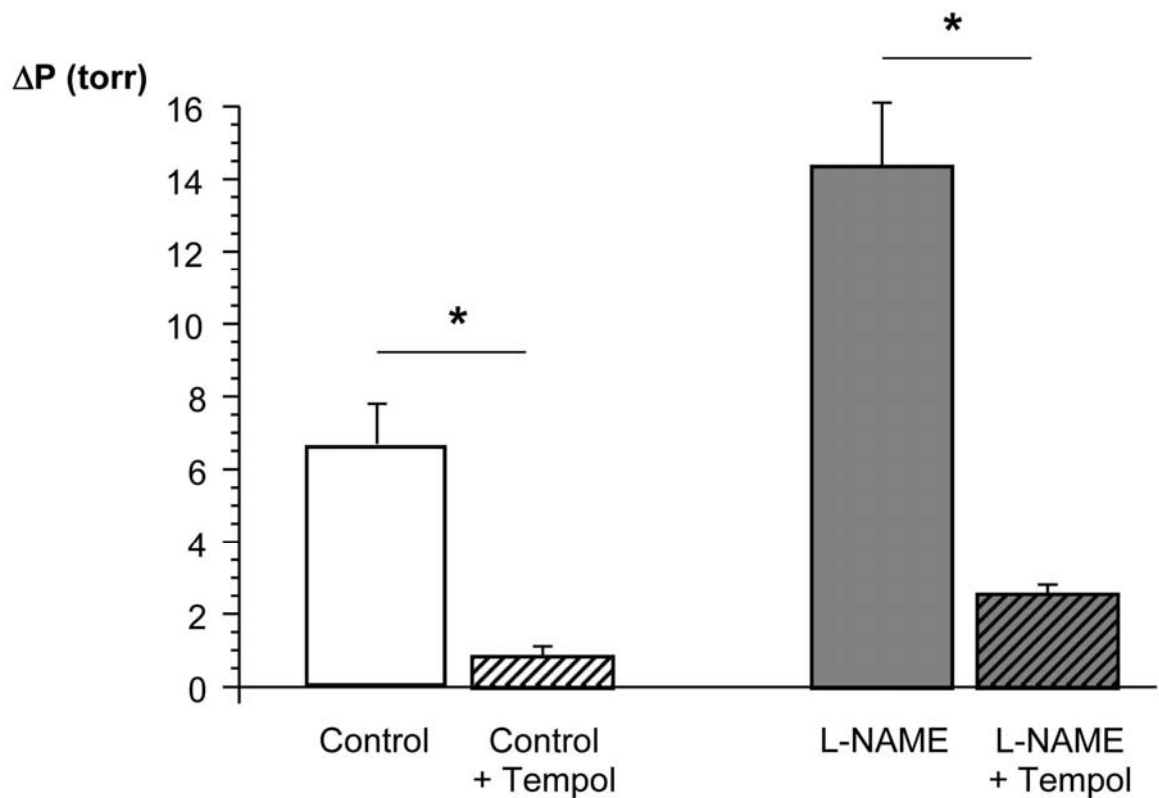


**Obr. 2.4.3. Protokol experimentu B**

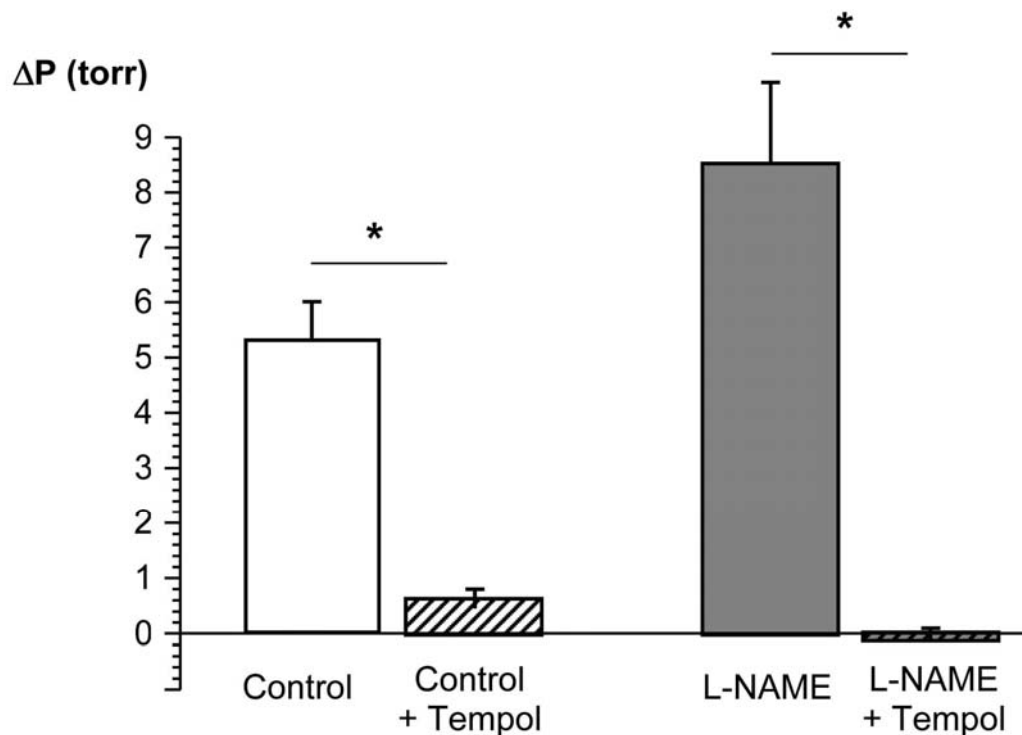
### 2.4.3. Výsledky

#### 2.4.3.1. Experiment A

Po podání tempolu jsme pozorovali u obou skupin zvířat signifikantní inhibici vazokonstrikční odpovědi vyvolanou ATII a akutní ventilační hypoxií (Obr. 2.4.4., 2.4.5.). Při srovnání změny vazokonstrikční odpovědi vyvolané tempolem u kontrol a skupiny s L-NAME jsme nepozorovali žádný signifikantní rozdíl. Lze tedy říci, že inhibice HPV vyvolaná podáním tempolu není závislá na koncentraci NO.



**Obr. 2.4.4.** Vliv podání tempolu a L-NAME na plicní vazokonstrikci způsobenou bolusovým podáním ATII; \* $p < 0.005$

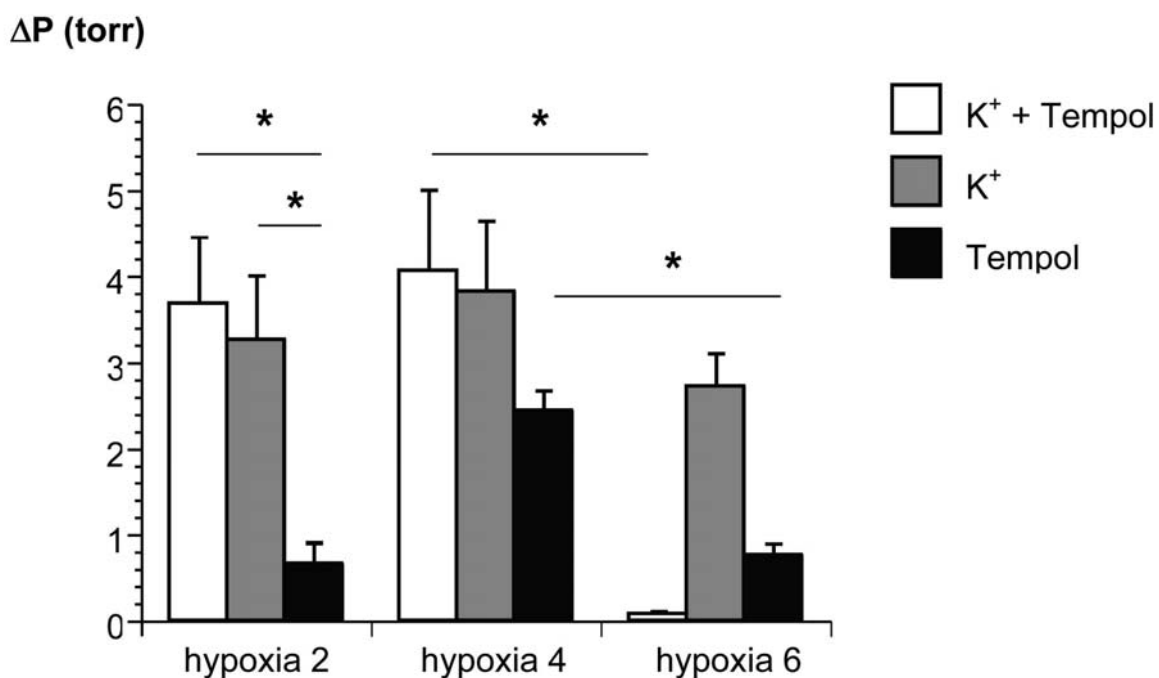


**Obr. 2.4.5.** Vliv podání tempolu a L-NAME na hypoxickou plicní vazokonstrikci; \* $p < 0.005$

#### 2.4.3.2. Experiment B

Přidání KCl do perfuzátu vedlo k očekávanému signifikantnímu zvýšení bazálního perfúzního tlaku u obou skupin bez rozdílu. Toto zvýšení bazálního tonu vedlo k signifikantně vyšší HPV u skupiny  $K^+$  + tempol a  $K^+$  ve srovnání se skupinou tempol (Obr. 2.4.6.) Tyto rozdíly mezi skupinami již nebyly patrné po podání ATII (porovnání HPV při 4. hypoxii). Následné podání tempolu signifikantně snížilo HPV (6. hypoxie) jak u skupiny se zvýšeným bazálním tonem ( $K^+$  + tempol), tak u skupiny bez stimulace draslíkem (tempol). Oproti tomu intenzita HPV zůstala nezměněná u skupiny, které tempol podán nebyl ( $K^+$ ), což svědčí o dobré viabilitě preparátu po celou dobu trvání experimentu (Obr. 2.4.6.).





Obr. 2.4.6. Vliv zvýšení bazálního tonu na inhibici HPV vyvolanou tempolem; \* $p < 0.05$

#### 2.4.4. Shrnutí výsledků a dílčí závěr

Hlavními výstupy z popsané studie jsou tato zjištění:

1. Produkce a tkáňová koncentrace superoxidu hraje důležitou roli v mechanismu hypoxické plicní vazokonstrikce. Dismutace superoxidu na peroxid vodíku způsobená tempolem významně snížila vazokonstrikční odpověď plicního cévního řečiště na akutní ventilační hypoxii.
2. Inhibiční efekt dismutace superoxidu na HPV je pravděpodobně důsledkem přímo snížení koncentrace superoxidu nebo zvýšení koncentrace peroxidu vodíku. Dle výsledků pokusů s inhibitorem NO syntetasy, L-NAME, tento efekt není zprostředkován relativní nadprodukcí vazodilatačně účinkujícího NO.
3. Inhibice HPV tempolem není závislá na velikosti bazálního tonu v plicním cévním řečišti.

Podrobná diskuze výsledků této série experimentů je předmětem publikace (40), která tvoří přílohu této disertační práce (Příloha 2).

## 2.5. CELKOVÉ SHRnutí VÝSLEDKŮ, ZÁVĚR

V experimentální části této disertační práce jsme se zabývali radikálovým poškozením plic, které vzniká v průběhu teplé ischémie a při následném obnovení perfúze orgánem. Tuto problematiku jsme konkrétně zkoumali na experimentálním modelu odběru plic od dárce po srdeční zástavě, kdy jsou plíce v období mezi ukončením perfúze v dárcovském těle a znovuoobením perfúze v těle příjemce (nebo artificiální perfúzi v experimentálních podmínkách) vystaveny jedné hodině teplé ischémie.

V první části práce jsme se zaměřili na zkoumání možností, jak zlepšit funkční vlastnosti takto získaného preparátu zásahy v období teplé ischémie. Zjistili jsme, že:

- **Ventilace vzduchem v průběhu teplé ischémie zhoršuje funkční vlastnosti plic a vede ke vzniku plicního edému.**
- **Preventivní podání heparinu vede ke snížení perfúzního tlaku a zlepšuje transportní schopnost plic pro kyslík.**
- **Preventivní podání tempolu zabrání vzniku plicního edému způsobeného ventilací v průběhu teplé ischémie a zlepšuje transportní schopnost plic pro kyslík.**

Tyto závěry tedy ukazují na významnou úlohu volných kyslíkových radikálů v poškození plic v průběhu teplé ischémie. Zároveň naznačují, že podání scavengeru radikálů před navozením teplé ischémie může napomoci k ochraně plic před ischemickým poškozením.

Ve druhé části práce jsme se na základě poznatků o pozitivním efektu námi používaného tempolu na ischemicko – reperfuční poškození v různých orgánech rozhodli testovat hypotézu o potenciálně protektivním efektu podání této látky na poškození vyvolané obnovením průtoku po předchozí teplé ischemii. Zde jsme zjistili, že:

- **Podání tempolu před obnovením průtoku ischemickými plícemi vede k tvorbě plicního edému a zhoršení transportní schopnosti**

**plic pro kyslík. Narozdíl od jiných orgánů tedy v plicích tempol nepůsobí protektivně na ischemicko–reperfúzní poškození.**

Možné vysvětlené těchto výsledků vidíme v úloze hypoxické plicní vazokonstrikce v redistribuci krve do lépe ventilovaných oblastí plicního cévního řečiště a tedy v optimalizaci poměrů ventilace/perfúze. Pokud jsou plice vystaveny jedné hodině teplé ischemie bez artificiální ventilace, velmi pravděpodobně v nízkotlakém plicním cévním řečišti vznikne značné množství atelektatických oblastí. Tyto oblasti poté zůstávají neventilované přinejmenším v počátečních fázích reperfúze. Hypoxická plicní vazokonstrikce v tomto případě může hrát významnou úlohu při redistribuci průtoku mimo tyto atelektatické oblasti. Pokud HPV inhibujeme v průběhu reperfúze tempolem, odstraníme tento protektivní mechanismus a výsledkem může být námi pozorovaný plicní edém.

V závěrečné části experimentální sekce práce se zabýváme mechanismem, kterým scavenger ROS, tempol, inhibuje HPV. Zaměřili jsme se na význam možné relativní nadprodukce NO v situaci, kdy je přirozený substrát pro tvorbu peroxynitritu právě z NO dismutován tempolem. Dále jsme zkoumali vliv bazálního tonu v plicním cévním řečišti na tempolem vyvolanou HPV. Zjistili jsme, že:

- **Produkce a tkáňová koncentrace superoxidu hraje důležitou roli v mechanismu hypoxické plicní vazokonstrikce.**
- **SOD mimetikum tempol inhibuje hypoxickou plicní vazokonstrikci nezávisle na aktuální koncentraci NO a na bazálním tonu plicních cév.**

Celkově je tedy možné hlavní poznatky z předkládané práce shrnout tak, že volné kyslíkové radikály se patrně významně podílí na poškození plic v průběhu teplé ischemie a jejich inhibice může významně napomoci ke zlepšení funkčních vlastností plic. ROS však zároveň hrají klíčovou roli v mechanismu hypoxické plicní vazokonstrikce, který se může ve fázi reperfúze uplatňovat protektivně. Snížení produkce ROS v této fázi pak vede ke vzniku plicního edému.

V souladu s recentními pracemi, zabývajícími se problematikou transplantace plic získaných od dárců s nebijícím srdcem, naše studie na experimentálním modelu

potvrzují dobrou viabilitu a klinickou použitelnost plic získaných od dárce po srdeční zástavě a následně vystavených jedné hodině teplé ischemie. Pro minimalizaci poškození takto získaných plic před samotnou transplantací se zdá být klíčová ochrana před radikálním poškozením v průběhu teplé ischemie a následná prevence ischemicko-reperfúzního poškození. Pokud se podaří tyto zásadní problémy vyřešit, může se technika transplantace plic od nebijících dárců stát světově etablovanou tranplantační metodou, která výrazně napomůže vyřešit problém s nedostatkem vhodných orgánových dárců k transplantaci plic.

## REFERENCE

1. **Albert RK, Lamm WJ, and Luchtel DL.** Effect of lung inflation on fluid flux in zone 1 lungs. *J Appl Physiol* 64: 285-290, 1988.
2. **Alessandrini F, D'Armini AM, Roberts CS, Reddick RL, and Egan TM.** When does the lung die? II. Ultrastructural evidence of pulmonary viability after "death". *J Heart Lung Transplant* 13: 748-757, 1994.
3. **Archer SL, Nelson DP, and Weir EK.** Simultaneous measurement of O<sub>2</sub> radicals and pulmonary vascular reactivity in rat lung. *J Appl Physiol* 67: 1903-1911, 1989.
4. **Archer SL, Tolins JP, Raij L, and Weir EK.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction is enhanced by inhibition of the synthesis of an endothelium derived relaxing factor. *Biochem Biophys Res Commun* 164: 1198-1205, 1989.
5. **Archer SL, Will JA, and Weir EK.** Redox status in the control of pulmonary vascular tone. *Herz* 11: 127-141, 1986.
6. **Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, and Freeman BA.** Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1620-1624, 1990.
7. **Belik J, Jankov RP, Pan J, and Tanswell AK.** Peroxynitrite inhibits relaxation and induces pulmonary artery muscle contraction in the newborn rat. *Free Radic Biol Med* 37: 1384-1392, 2004.
8. **Binns OA, DeLima NF, Buchanan SA, Nichols GE, Cope JT, King RC, Marek CA, Tribble CG, and Kron IL.** Impaired bronchial healing after lung donation from non-heart-beating donors. *J Heart Lung Transplant* 15: 1084-1092, 1996.
9. **Block ER, and Fisher AB.** Depression of serotonin clearance by rat lungs during oxygen exposure. *J Appl Physiol* 42: 33-38, 1977.
10. **Boglione MM, Morandini MA, Barrenechea ME, Rubio RA, and Aguilar D.** Pre-arrest heparinization and ventilation during warm ischemia preserves lung function in non-heart-beating donors. *J Pediatr Surg* 34: 1805-1809, 1999.

11. **Bowden DH, Adamson IY, and Wyatt JP.** Reaction of the lung cells to a high concentration of oxygen. *Arch Pathol* 86: 671-675, 1968.
12. **Buchanan SA, DeLima NF, Binns OA, Mauney MC, Cope JT, Langenburg SE, Shockey KS, Bianchi JD, Parekh VI, Tribble CG, and et al.** Pulmonary function after non-heart-beating lung donation in a survival model. *Ann Thorac Surg* 60: 38-44; discussion 44-36, 1995.
13. **Cook DR, Howell RE, and Gillis CN.** Xanthine oxidase-induced lung injury inhibits removal of 5-hydroxytryptamine from the pulmonary circulation. *Anesth Analg* 61: 666-670, 1982.
14. **Cooper JD, and Vreim CE.** NHLBI workshop summary. Biology of lung preservation for transplantation. *Am Rev Respir Dis* 146: 803-807, 1992.
15. **Crapo JD, Barry BE, Foscue HA, and Shelburne J.** Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to lethal and adaptive doses of oxygen. *Am Rev Respir Dis* 122: 123-143, 1980.
16. **Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, and Harman D.** Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 107: 526-545, 1987.
17. **Curfman GD.** Hypothermia to protect the brain. *N Engl J Med* 346: 546, 2002.
18. **Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, Siriwardena D, Costantino G, Fulia F, Cucinotta G, Gitto E, Cordaro S, Barberi I, De Sarro A, Caputi AP, and Thiemermann C.** Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a gerbil model of brain injury. *Brain Res* 875: 96-106, 2000.
19. **D'Armini AM, Roberts CS, Griffith PK, Lemasters JJ, and Egan TM.** When does the lung die? I. Histochemical evidence of pulmonary viability after "death". *J Heart Lung Transplant* 13: 741-747, 1994.
20. **D'Armini AM, Tom EJ, Roberts CS, Henke DC, Lemasters JJ, and Egan TM.** When does the lung die? Time course of high energy phosphate depletion and relationship to lung viability after "death". *J Surg Res* 59: 468-474, 1995.
21. **de Gasparo M.** Angiotensin II and nitric oxide interaction. *Heart Fail Rev* 7: 347-358, 2002.

22. **De Leyn PR, Lerut TE, Schreinemakers HH, Van Raemdonck DE, Mubagwa K, and Flameng W.** Effect of inflation on adenosine triphosphate catabolism and lactate production during normothermic lung ischemia. *Ann Thorac Surg* 55: 1073-1078; discussion 1079, 1993.
23. **de Perrot M, Liu M, Waddell TK, and Keshavjee S.** Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 490-511, 2003.
24. **Egan TM, Lambert CJ, Jr., Reddick R, Ulicny KS, Jr., Keagy BA, and Wilcox BR.** A strategy to increase the donor pool: use of cadaver lungs for transplantation. *Ann Thorac Surg* 52: 1113-1120; discussion 1120-1111, 1991.
25. **Egan TM, Trulock EP, Boychuk J, Ochoa L, and Cooper JD.** Analysis of referrals for lung transplantation. The Washington University Lung Transplantation Group. *Chest* 99: 867-870, 1991.
26. **Egan TM, Westerman J, Mill MR, and Wilcox BR.** Lung transplantation at UNC. The first year. *NC Med J* 52: 325-329, 1991.
27. **Estenne M, and Kotloff RM.** Update in transplantation 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 593-598, 2006.
28. **Fishman AP.** Hypoxia on the pulmonary circulation. How and where it acts. *Circ Res* 38: 221-231, 1976.
29. **Greco R, Cordovilla G, Sanz E, Benito J, Criado A, Gonzalez M, and De Miguel E.** Warm ischemic time tolerance after ventilated non-heart-beating lung donation in piglets. *Eur J Cardiothorac Surg* 14: 319-325, 1998.
30. **Gupte SA, Kaminski PM, Floyd B, Agarwal R, Ali N, Ahmad M, Edwards J, and Wolin MS.** Cytosolic NADPH may regulate differences in basal Nox oxidase-derived superoxide generation in bovine coronary and pulmonary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H13-21, 2005.
31. **Halliwell B.** Oxidants and human disease: some new concepts. *Faseb J* 1: 358-364, 1987.
32. **Halliwell B, and Gutteridge JM.** The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med* 8: 89-193, 1985.



33. **Hampl V, and Herget J.** Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia. *Am Rev Respir Dis* 142: 619-624, 1990.
34. **Hampl V, and Herget J.** Role of Nitric Oxide in the Pathogenesis of Chronic Pulmonary Hypertension. *Physiol Rev* 80: 1337-1372, 2000.
35. **Herget J, Frydrychova M, Kawikova I, and McMurtry IF.** Thyroxine treatment increases the hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated lungs from thyroidectomized rats. *Bull Eur Physiopathol Respir* 23: 217-221, 1987.
36. **Herget J, and McMurtry IF.** Effects of ouabain, low K<sup>+</sup>, and aldosterone on hypoxic pressor reactivity of rat lungs. *Am J Physiol* 248: H55-60, 1985.
37. **Hertz MI, Boucek MM, Edwards LB, Keck BM, Rowe AW, Taylor DO, Trulock EP, and Waltz DA.** The ISHLT transplant registry: moving forward. *J Heart Lung Transplant* 25: 1179-1185, 2006.
38. **Hodyc D, Hnilickova o, Hampl V, and Herget J.** Pre-arrest Administration of the Cell-permeable Free Radical Scavenger Tempol Reduces Warm Ischemic Damage of Lung Function in Non-Heart-beating Donors. *J Heart Lung Transplant* 27: 890-897, 2008.
39. **Hodyc D, Hnilickova O, Volek J, Hampl V, and Herget J.** Tempol Reduces Warm Ischemic Damage of Lung Functions In Non-Heart-Beating Donors if Added Pre-arrestly but Doesn't Have any Protective Effect on Ischemia - Reperfusion Injury. *FASEB J* 20: A399-a-, 2006.
40. **Hodyc D, Snorek M, Brtnicky T, and Herget J.** Superoxide dismutase mimetic tempol inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats independently of nitric oxide production. *Exp Physiol* 92: 945-951, 2007.
41. **Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Brown PA, Zacharowski K, Stewart KN, Mota-Filipe H, and Thiemermann C.** Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int* 58: 658-673, 2000.
42. **Kamiike W, Watanabe F, Hashimoto T, Tagawa K, Ikeda Y, Nakao K, and Kawashima Y.** Changes in cellular levels of ATP and its catabolites in ischemic rat liver. *J Biochem (Tokyo)* 91: 1349-1356, 1982.

43. **Kapanci Y, Weibel ER, Kaplan HP, and Robinson FR.** Pathogenesis and reversibility of the pulmonary lesions of oxygen toxicity in monkeys. II. Ultrastructural and morphometric studies. *Lab Invest* 20: 101-118, 1969.
44. **Kawaguchi AT, Mizuta T, Shirai M, Ishibashi-Ueda H, Machida H, and Kawashima Y.** Right lung transplantation followed by left pneumonectomy in the rat. *Eur J Cardiothorac Surg* 10: 1011-1014, 1996.
45. **Kiser AC, Ciriaco P, Hoffmann SC, and Egan TM.** Lung retrieval from non-heart beating cadavers with the use of a rat lung transplant model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 122: 18-23, 2001.
46. **Kolocassides KG, Galinanes M, and Hearse DJ.** Preconditioning accelerates contracture and ATP depletion in blood-perfused rat hearts. *Am J Physiol* 269: H1415-1420, 1995.
47. **Koyama I, Toung TJ, Rogers MC, Gurtner GH, and Traystman RJ.** O<sub>2</sub> radicals mediate reperfusion lung injury in ischemic O<sub>2</sub>-ventilated canine pulmonary lobe. *J Appl Physiol* 63: 111-115, 1987.
48. **Kubisa B, Schmid RA, and Grodzki T.** Model of single left rat lung transplantation. Relation between surgical experience and outcomes. *Rocz Akad Med Bialymst* 48: 70-73, 2003.
49. **Lilley E, and Gibson A.** Antioxidant protection of NO-induced relaxations of the mouse anococcygeus against inhibition by superoxide anions, hydroquinone and carboxy-PTIO. *Br J Pharmacol* 119: 432-438, 1996.
50. **Liu JQ, Sham JS, Shimoda LA, Kuppusamy P, and Sylvester JT.** Hypoxic constriction and reactive oxygen species in porcine distal pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L322-333, 2003.
51. **Liu JQ, Zelko IN, Erbynn EM, Sham JS, and Folz RJ.** Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L2-10, 2006.
52. **Loehe F, Mueller C, Anneck T, Minor T, Bittmann I, Krombach F, and Messmer K.** Tissue damage of non-heart-beating donor lungs after long-term preservation: evaluation of histologic alteration, bronchoalveolar lavage, and energy metabolism. *Shock* 17: 502-507, 2002.

53. **Loeche F, Mueller C, Annecke T, Siebel A, Bittmann I, Messmer KF, and Schildberg FW.** Pulmonary graft function after long-term preservation of non-heart-beating donor lungs. *Ann Thorac Surg* 69: 1556-1562, 2000.
54. **Lum H, Schwartz LW, Dungworth DL, and Tyler WS.** A comparative study of cell renewal after exposure to ozone or oxygen. Response of terminal bronchiolar epithelium in the rat. *Am Rev Respir Dis* 118: 335-345, 1978.
55. **Marshall C, Mamary AJ, Verhoeven AJ, and Marshall BE.** Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 633-644, 1996.
56. **McDonald MC, Zacharowski K, Bowes J, Cuzzocrea S, and Thiemermann C.** Tempol reduces infarct size in rodent models of regional myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* 27: 493-503, 1999.
57. **McMurtry IF.** Angiotensin is not required for hypoxic constriction in salt solution-perfused rat lungs. *J Appl Physiol* 56: 375-380, 1984.
58. **Miyoshi S, Mochizuki Y, Nagai S, Kobayashi S, and Seki N.** Physiologic aspects in human lung transplantation. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 11: 73-79, 2005.
59. **Mizobuchi T, Sekine Y, Yasufuku K, Fujisawa T, and Wilkes DS.** Comparison of surgical procedures for vascular and airway anastomoses that utilize a modified non-suture external cuff technique for experimental lung transplantation in rats. *J Heart Lung Transplant* 23: 889-893, 2004.
60. **Moudgil R, Michelakis ED, and Archer SL.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* 98: 390-403, 2005.
61. **Newman JH, Loyd JE, English DK, Ogletree ML, Fulkerson WJ, and Brigham KL.** Effects of 100% oxygen on lung vascular function in awake sheep. *J Appl Physiol* 54: 1379-1386, 1983.
62. **Orens JB, Estenne M, Arcasoy S, Conte JV, Corris P, Egan JJ, Egan T, Keshavjee S, Knoop C, Kotloff R, Martinez FJ, Nathan S, Palmer S, Patterson A, Singer L, Snell G, Studer S, Vachiery JL, and Glanville AR.** International guidelines for the selection of lung transplant candidates: 2006 update--a consensus report from the Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 25: 745-755, 2006.

63. **Patterson GA.** [Lung transplantation]. *Rev Pneumol Clin* 44: 221-223, 1988.
64. **Raffin TA, Simon LM, Braun D, Theodore J, and Robin ED.** Impairment of phagocytosis by moderate hyperoxia (40 to 60 per cent oxygen) in lung macrophages. *Lab Invest* 42: 622-626, 1980.
65. **Rak R, Chao DL, Pluta RM, Mitchell JB, Oldfield EH, and Watson JC.** Neuroprotection by the stable nitroxide Tempol during reperfusion in a rat model of transient focal ischemia. *J Neurosurg* 92: 646-651, 2000.
66. **Rega FR, Jannis NC, Verleden GM, Flameng WJ, Lerut TE, and Van Raemdonck DE.** Should we ventilate or cool the pulmonary graft inside the non-heart-beating donor? *J Heart Lung Transplant* 22: 1226-1233, 2003.
67. **Rega FR, Neyrinck AP, Verleden GM, Lerut TE, and Van Raemdonck DE.** How long can we preserve the pulmonary graft inside the nonheart-beating donor? *Ann Thorac Surg* 77: 438-444; discussion 444, 2004.
68. **Shimada K, Kondo T, Handa M, Okada Y, Ohura H, Hirose M, Horikoshi A, Sado T, Sugita M, and Fujimura S.** The possibility of lung transplantation from non-heart-beating donors: experimental study in a canine model. *Transplant Proc* 26: 880-881, 1994.
69. **Steen S, Liao Q, Wierup PN, Bolys R, Pierre L, and Sjoberg T.** Transplantation of lungs from non-heart-beating donors after functional assessment ex vivo. *Ann Thorac Surg* 76: 244-252; discussion 252, 2003.
70. **Steen S, Sjoberg T, Pierre L, Liao Q, Eriksson L, and Algotsson L.** Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet* 357: 825-829, 2001.
71. **Steinberg H, Greenwald RA, Moak SA, and Das DK.** The effect of oxygen adaptation on oxyradical injury to pulmonary endothelium. *Am Rev Respir Dis* 128: 94-97, 1983.
72. **Steinberg H, Greenwald RA, Sciubba J, and Das DK.** The effect of oxygen-derived free radicals on pulmonary endothelial cell function in the isolated perfused rat lung. *Exp Lung Res* 3: 163-173, 1982.
73. **Thiemermann C.** Membrane-permeable radical scavengers (tempol) for shock, ischemia-reperfusion injury, and inflammation. *Crit Care Med* 31: S76-84, 2003.

74. **Thompson JS, Jones RD, Rogers TK, Hancock J, and Morice AH.** Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated rat pulmonary arteries by diphenyleneiodonium (DPI). *Pulm Pharmacol Ther* 11: 71-75, 1998.
75. **Toomes H, and Swoboda L.** [Unilateral lung transplantation--an initial report of experiences]. *Pneumologie* 44 Suppl 1: 661-662, 1990.
76. **Trulock EP, Edwards LB, Taylor DO, Boucek MM, Keck BM, and Hertz MI.** Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-second official adult lung and heart-lung transplant report--2005. *J Heart Lung Transplant* 24: 956-967, 2005.
77. **Udassin R, Haskel Y, and Samuni A.** Nitroxide radical attenuates ischaemia/reperfusion injury to the rat small intestine. *Gut* 42: 623-627, 1998.
78. **Ulicny KS, Jr., Egan TM, Lambert CJ, Jr., Reddick RL, and Wilcox BR.** Cadaver lung donors: effect of preharvest ventilation on graft function. *Ann Thorac Surg* 55: 1185-1191, 1993.
79. **Van Raemdonck DE, Jannis NC, De Leyn PR, Flameng WJ, and Lerut TE.** Warm ischemic tolerance in collapsed pulmonary grafts is limited to 1 hour. *Ann Surg* 228: 788-796, 1998.
80. **Van Raemdonck DE, Jannis NC, Rega FR, De Leyn PR, Flameng WJ, and Lerut TE.** Extended preservation of ischemic pulmonary graft by postmortem alveolar expansion. *Ann Thorac Surg* 64: 801-808, 1997.
81. **Waypa GB, Chandel NS, and Schumacker PT.** Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res* 88: 1259-1266, 2001.
82. **Waypa GB, and Schumacker PT.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. *J Appl Physiol* 98: 404-414, 2005.
83. **Wittwer T, Franke UF, Fehrenbach A, Ochs M, Sandhaus T, Dreyer N, Richter J, and Wahlers T.** Innovative pulmonary preservation of non-heart-beating donor grafts in experimental lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg* 26: 144-150, 2004.

## SEZNAM PŘÍLOH - PUBLIKACE

### **Příloha 1:**

**Hodyc D, Hnilickova o, Hampl V, and Herget J.** Pre-arrest Administration of the Cell-permeable Free Radical Scavenger Tempol Reduces Warm Ischemic Damage of Lung Function in Non-Heart-beating Donors. *J Heart Lung Transplant* 27: 890-897, 2008.

### **Příloha 2:**

**Hodyc D, Snorek M, Brtnicky T, and Herget J.** Superoxide dismutase mimetic tempol inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats independently of nitric oxide production. *Exp Physiol* 92: 945-951, 2007.

## Pre-arrest Administration of the Cell-permeable Free Radical Scavenger Tempol Reduces Warm Ischemic Damage of Lung Function in Non-Heart-beating Donors

Daniel Hodyc, MD, Olga Hnilickova, Vaclav Hampl, MD, PhD, and Jan Herget, MD, PhD

**Background:** Lungs retrieved from non-heart-beating donors (NHBDs) may alleviate the shortage of suitable organs for transplantation. The critical point is the preservation of lungs during warm ischemia, when severe damage is caused by free radicals. We investigated the effect of ventilation, pre-arrest administration of heparin, and the cell-permeable free radical scavenger, tempol, on the function of NHBD grafts.

**Methods:** Six experimental and two control groups ( $n = 6$  per group) were established. All experimental groups underwent a protocol of NHBD lung harvesting, which included 1 hour of warm ischemia after pentobarbital euthanasia followed by 90 minutes of cold ischemia. The groups were constructed as follows: Group An—non-ventilated during warm ischemia, no heparin; Group Av—room-air ventilated during warm ischemia, no heparin; Group Hn—non-ventilated, heparin added pre-arrest; Group Hv—ventilated, heparin; Group Tn—non-ventilated, heparin and tempol added pre-arrest; Group Tv—ventilated, tempol, heparin; Group Ac—control group, no warm and cold ischemia, lungs harvested immediately after euthanasia; and Group Tc—controls with tempol added pre-arrest. The lungs were then perfused *ex vivo* and the perfusion pressure, lung weight and arteriovenous difference in oxygen partial pressure were measured.

**Results:** We found that room-air ventilation during warm ischemia caused severe pulmonary edema during reperfusion. Heparinization prevented an increase in perfusion pressure and ameliorated the oxygen transport ability. Pre-arrest administration of tempol prevented edema formation after ventilation during warm ischemia and had a positive effect on the oxygen transport ability of the lungs.

**Conclusions:** The free radical scavenger tempol, which has a very good ability to permeate biologic membranes, contributes to better preservation of lungs retrieved from NHBDs. *J Heart Lung Transplant* 2008;27:890-7. Copyright © 2008 by the International Society for Heart and Lung Transplantation.

Utilization of lungs retrieved from non-heart-beating donors (NHBDs) appears to be a promising way to increase the pool of suitable lung donors. The crucial difference between the routinely used transplantation technique, when the lungs are harvested from brain-dead, heart-beating donors (HBDs), and the NHBD transplantation process takes place during the warm

ischemia period. Warm ischemia occurs after circulatory arrest when the organ, left at room temperature, is not perfused. Whereas for HBDs organ perfusion is maintained until the harvesting itself, NHBD lungs are retrieved after cessation of circulation, and with a significant period of warm ischemia.

An major advantage when utilizing lung tissue is the possibility of maintaining oxygen extraction from the alveoli, even after cessation of circulation, which allows ongoing aerobic metabolism.<sup>1</sup> It has been experimentally proven that lungs retrieved from donors after cardiac arrest or after myocardial infarction can survive for at least 1 hour.<sup>2-4</sup> Also, it is possible that there is a protective effect of ventilation during warm ischemia. However, artificial ventilation of non-perfused lungs creates a potential risk of tissue damage by reactive oxygen species (ROS).

The aim of this study was to assess the effect of ventilation during warm ischemia and, considering the controversy regarding the need for heparin administration,<sup>5,6</sup> to verify the putative benefit of pre-arrest hep-

From the Department of Physiology, Second Medical School, Charles University of Prague, Prague, Czech Republic.

Submitted November 23, 2007; revised May 9, 2008; accepted May 19, 2008.

Supported by the Grant Agency of Charles University (74/2007), Cardiovascular Research Centre (MSMT 1M 0510) and Czech Science Foundation (305/05/0672).

Reprint requests: Daniel Hodyc, MD, Department of Physiology, Second Medical School, Charles University of Prague, Plzenska 221/130, Prague 14700, Czech Republic. Telephone: +420-257-296-218. Fax: +420-257-296-203. E-mail: [daniel.hodyc@lfmotol.cuni.cz](mailto:daniel.hodyc@lfmotol.cuni.cz)

Copyright © 2008 by the International Society for Heart and Lung Transplantation. 1053-2498/08/\$—see front matter. doi:10.1016/j.healun.2008.05.019

**Table 1.** Experimental Groups

	Group	Warm ischemia	Heparin	Ventilation	Tempol	No. of rats
Experiment A: Effect of ventilation	Ac, controls	–	+	–	–	6
	An	+	–	–	–	6
	Av	+	–	Room air	–	6
Experiment B: Effect of heparin	Hn	+	+	–	–	6
	Hv	+	+	Room air	–	6
Experiment C: Effect of tempol	Tc, controls	–	+	–	+	6
	Tn	+	+	–	+	6
	Tv	+	+	Room air	+	6

arinization. Because we had found that pressure-controlled ventilation deteriorates pulmonary function, we tested the protective effect of pre-arrest administration of tempol, an intracellular ROS scavenger.

## METHODS

### Study Design

The study was performed using adult male rats (AnLab, Czech Republic) in three separate experiments (Table 1). In Experiment A we investigated the effect of room-air ventilation during warm ischemia; in Experiment B the effect of pre-arrest heparinization on lung function was assessed; and in Experiment C we studied the possible protective effect of pre-arrest administration of tempol.

All experiments were performed in accordance with the European Community and NIH guidelines for use of experimental animals and approved by the animal studies committee at our institution. All drugs and chemicals were from Sigma (Prague, Czech Republic) unless stated otherwise.

### Experiment A: Effect of Ventilation During Warm Ischemia

Two experimental groups (Groups An and Av; Table 1) underwent the protocol of lung harvesting from NHBDs. Rats were anesthetized with by intraperitoneal administration of sodium thiopental (50 mg/kg), and a tracheal cannula was introduced into the trachea. All animals were then euthanized by overdose with sodium thiopental (250 mg/kg).<sup>7,8</sup> The animals were kept at room temperature for another 60 minutes (warm ischemia). During warm ischemia, animals in Group Av were ventilated (Model 683 Harvard Rodent Ventilator, Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA) with room air at 50 breaths/min, with peak inspiratory pressure 10 cm H<sub>2</sub>O, whereas rats from the other experimental group (Group An) were left untouched. Ventilation (in the ventilated groups) was then stopped and two cannulas were introduced into the thoracic cavity. The animals were placed into a cold thermostatic chamber and in situ topical cooling of the lungs was started with cold saline solution (12°C) that contained 4% Ficoll.

After 90 minutes, the lungs were isolated and perfused as described previously.<sup>9,10</sup> The tracheal cannula was

reconnected to the ventilator and the lungs were ventilated with a gas mixture containing 21% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> + 74% N<sub>2</sub>. In the opened chest, the main pulmonary artery and the left atrium were cannulated. Using a peristaltic pump, the lungs were perfused in a constant flow mode (4 ml per 100 g body weight per minute) with a saline solution containing 4% Ficoll and meclofenamate (17 × 10<sup>-6</sup> mol/liter). The lungs were suspended by the trachea in a heated (38°C) humidified chamber and allowed to stabilize for 15 minutes before measurement of lung function (see later). The outflow from the left atrial cannula was recirculated into the perfusate reservoir, and the outflow pressure was set to –2 mm Hg.

*Control group.* Control animals (Group Ac) were anesthetized and isolation of the heart–lung block was performed in the same manner as described previously. Perfusion of the lungs started immediately after isolation, and therefore the lungs did not undergo warm and cold ischemia.

### Experiment B: Effect of Pre-arrest Heparinization

Under thiopental anesthesia, the rats in Groups Hv and Hn (Table 1) were given 600 IU of heparin intratracheally.<sup>7</sup> A tracheal cannula was introduced and, 30 minutes after administration of heparin, the animals were euthanized by overdose of sodium thiopental (250 mg/kg). The lungs then underwent warm and cold lung ischemia in the same way as in Experiment A. During warm ischemia, the animals of Group Hn were left untouched, whereas Group Hv animals were ventilated with room air. The control group for Experiment B was identical to the control group for Experiment A (Group Ac).

### Experiment C: Effect of Pre-arrest Administration of Tempol

Tempol (4-hydroxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxyl) freely permeates biologic membranes and, as an intracellular scavenger of superoxide anions and hydroxyl radicals, it has a protective effect with regard to ischemia-reperfusion injury, inflammation and multiple-organ failure.<sup>11–14</sup>



Tempol (50 mg/kg) was administered intraperitoneally immediately after the start of thiopental anesthesia. The rats in Groups Tv and Tn (Table 1) in Experiment C were given heparin as in Experiment B. A tracheal cannula was introduced and, after thiopental euthanasia, the lungs underwent a further 60 minutes of warm ischemia as in both previous experiments. Considering the results of Experiment B (see later), and because there was no assumption of either potentiation or inhibition of the effect of the combination of heparin plus tempol, we used heparin pre-arrest in all the experimental groups. To elucidate the effect of ROS production during artificial ventilation, Group Tv rats were ventilated as in Experiment A, whereas Group Tn animals were left untouched during this period. After 90 minutes of cold ischemia the heart-lung block was prepared as described earlier and lung function measurement was performed.

The controls were identical to the control group in Experiment A. To investigate the effect of tempol on pulmonary function we established Group Tc, a tempol-treated control group. The rats in this group were anesthetized and treated with tempol and heparin in the same way as in the experimental groups. Preparation of the heart-lung block started immediately after thiopental euthanasia, and therefore, similar to the control group, warm or cold ischemia was not performed.

### Measurement of Lung Function

We assessed pulmonary function for 180 minutes from the beginning of perfusion of the isolated lungs. The pulmonary perfusion pressure was monitored via a transducer connected to the inflow cannula (PowerLab, ADI Instruments) and the lung weight gain was measured continually via a force transducer. After a 20-minute equilibration period, the first measurement of oxygen transport ability was performed. We took two samples of perfusion solution: an arterial sample from the inflow and a venous sample from the outflow cannula. Analysis of oxygen partial pressure was performed immediately after sampling (ABL 5, Radiometer Medical A/S, Copenhagen, Denmark). Because we used isolated lungs, it was necessary to desaturate the perfusate in the inflow artificially by bubbling the perfusate in the reservoir with 5% CO<sub>2</sub> + 95% N<sub>2</sub> for 5 minutes. Thus, the increase in oxygen partial pressure between the inflow and outflow cannula ( $\Delta P_{O_2}$ ) was a measure of the ability of the lung to transport oxygen from the alveoli into the perfusate.

After a 10-minute recovery period, the reactivity to angiotensin II (0.4  $\mu$ g) and to acute hypoxia (0% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> + 74% N<sub>2</sub>) was tested in two cycles. At 30, 90,

120 and 180 minutes after start of perfusion, the lung transport ability for oxygen was measured in the same way as described earlier and, during these time intervals, the values of perfusion pressure and lung weight gain were taken.

### Statistical Analysis

For statistical evaluation we used repeated-measures analysis of variance (ANOVA), Fisher's PLSD test and the Games/Howell post hoc test, as appropriate. Values are presented as mean  $\pm$  SEM in the figures.

## RESULTS

### Analysis of Lung Survival

All lungs that were not ventilated during warm ischemia (Groups An and Hn) and all control lungs (Group Ac) survived until the end of the functional assessment. This means that all measured pulmonary functions were not altered and pulmonary edema was not present. The lungs also displayed significant vasoconstrictor responses to angiotensin II and acute ventilatory hypoxia. However, almost all (i.e., 5 of 6) lungs that were ventilated during warm ischemia, both with (Group Hv) and without (Group Av) pre-arrest heparin addition, did not survive for more than 30 minutes due to massive edema formation that started immediately after the beginning of reperfusion (Figure 1).

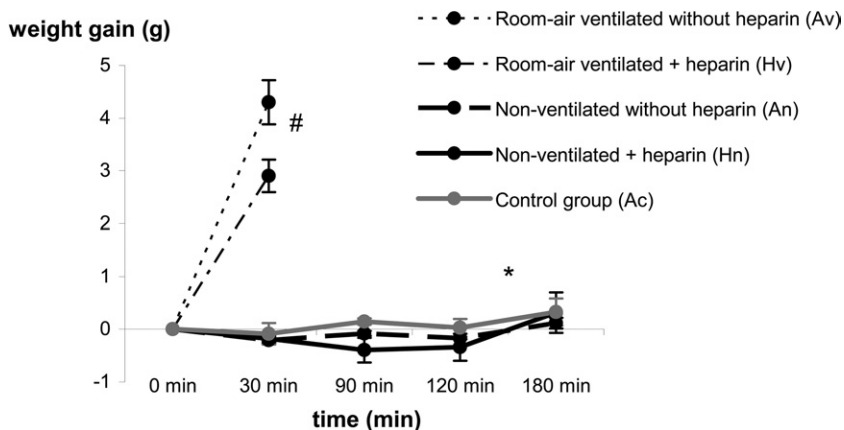
In contrast to room-air-ventilated groups in Experiments A and B, in Experiment C all lungs from both the experimental (Groups Tv and Tn) and the control group (Group Tc) survived until the end of the functional assessment after pre-arrest tempol administration, regardless of ventilation.

### Functional Assessment

*Effect of ventilation and heparinization (Experiments A and B).* There was no difference in lung weight gain among both the non-ventilated (Groups An and Hn) and control (Group Ac) groups.

Because of massive pulmonary edema in both groups that were ventilated with room air during warm ischemia, the perfusion pressure and the oxygen transport ability was assessed only in the non-ventilated groups (Groups An and Hn) and in the control group (Group Ac). The perfusion pressure of the non-ventilated group without heparin (Group An) was significantly higher compared with both the non-ventilated heparinized group (Group Hn) and controls (Group Ac) (Figure 2).

The best oxygen transport ability was observed in the controls (Group Ac).  $\Delta P_{O_2}$  was significantly higher in the control group (Group Ac) compared with the



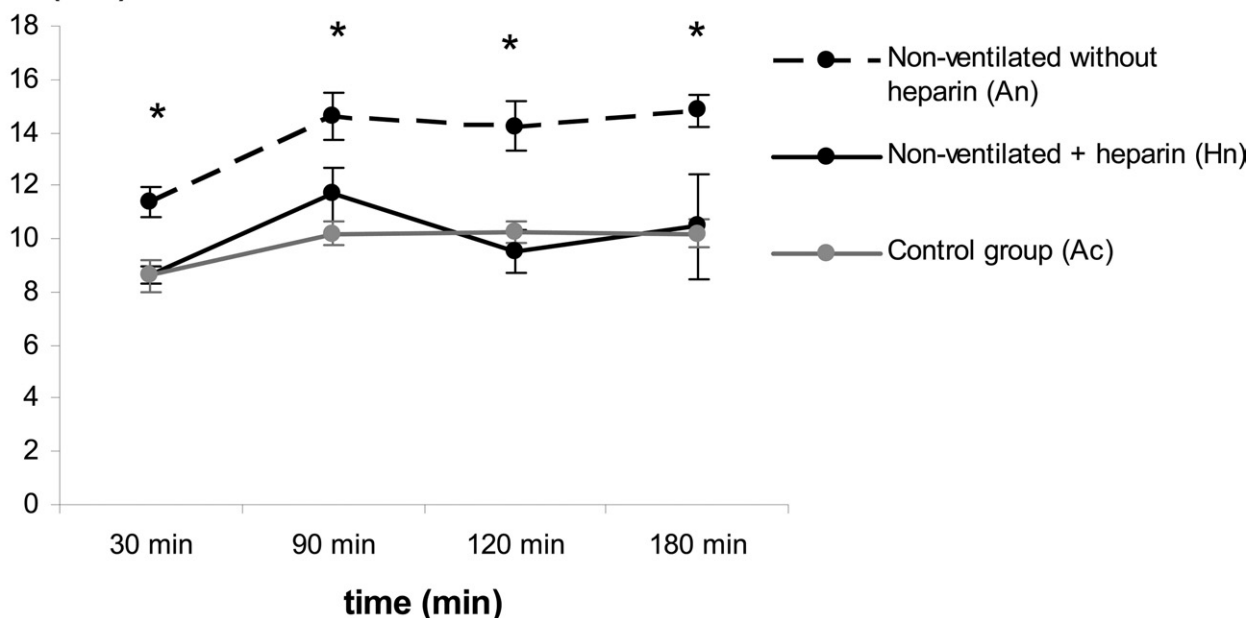
**Figure 1.** Ventilation with room air caused pulmonary edema. #A significant increase in lung weight gain indicating pulmonary edema in groups ventilated during warm ischemia with room-air. \*In the last 60 minutes there was a significant increase in lung weight gain in the non-ventilated and control groups ( $p < 0.001$ ).

non-ventilated groups (Groups An and Hn). The difference in oxygen transport ability was much more significant in the non-ventilated group without heparin (Group An) compared with controls (Group Ac) ( $p < 0.005$ ) than the difference between controls and the heparin-treated group (Group Hn) ( $p < 0.05$ ). When comparing non-ventilated groups, we observed significantly higher values of  $\Delta P_{O_2}$ , indicating better oxygen transport ability, in the lungs obtained from heparinized animals (Group Hn) (Figure 3).

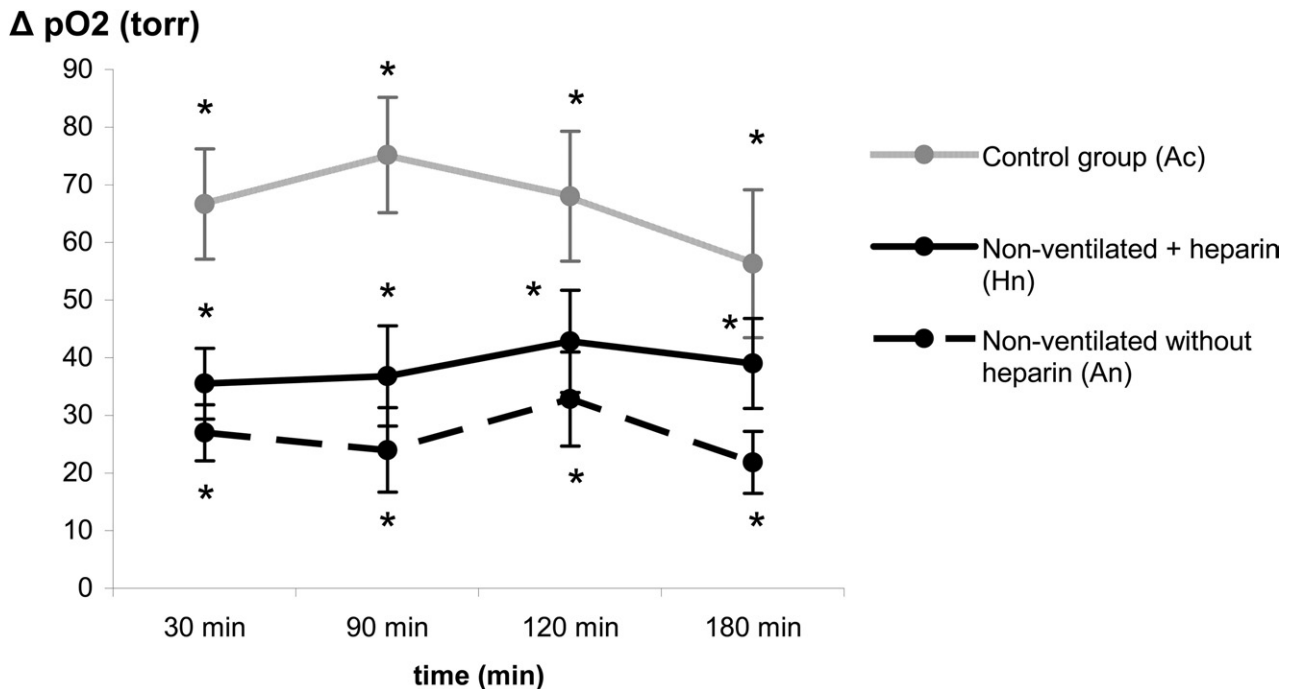
*Effect of pre-arrest administration of tempol (Experiment C).* We did not observe any significant differences between the control group (Group Ac) and the tempol-treated control group (Group Tc).

Tempol prevented edema formation after room-air ventilation during warm ischemia. With regard to lung weight gain, tempol-treated non-ventilated (Group Tn) or room-air-ventilated (Group Tv) groups did not differ compared with either controls (Group Ac) or tempol-treated controls (Group Tc) (Figure 4).

**perf. pressure (torr)**



**Figure 2.** Heparinization prevented the increase of perfusion pressure. We observed a significant increase in perfusion pressure in the non-ventilated group without heparin (Group An) compared with both the heparinized (Group Hn) and control (Group Ac) groups ( $*p < 0.005$ ).



**Figure 3.** Pre-arrest administration of heparin partially prevented the decrease of oxygen transport ability in the lungs harvested from non-ventilated rats.

We found only a slightly higher perfusion pressure in the room-air-ventilated group (Group Tv) compared with controls (Group Ac) ( $p < 0.05$ ); no differences were observed among other groups (Figure 5).

We also did not find any differences in  $\Delta\text{PO}_2$  among tempol-treated groups (Groups Tc, Tv and Tn) (Figure 6). This was in contrast to the significantly worse oxygen transport ability of the non-ventilated groups without tempol (Groups An and Hn) compared with controls (Group Ac), as described earlier.

## DISCUSSION

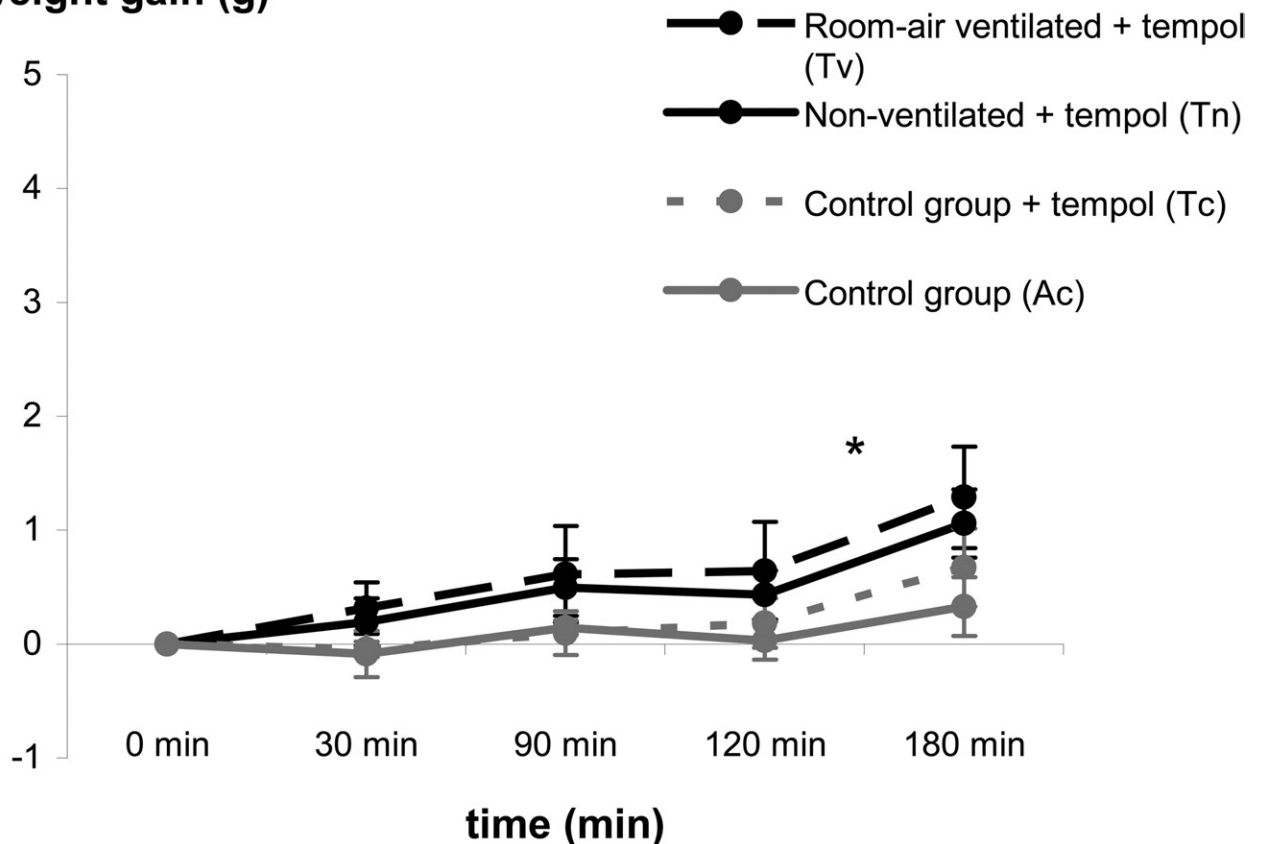
We showed that heparinization before 1 hour of warm ischemia prevents an increase in perfusion pressure and improves oxygen transport ability after lung reperfusion. Our findings are in agreement with Boglione et al<sup>6</sup> and others,<sup>7,15</sup> who described the protective effect of pre-arrest heparinization on lung function in NHBDs. In the first successful clinical transplantation from an NHBD, by Steen and co-workers, heparin was administered via a central venous catheter and chest compressions were used for its distribution.<sup>16</sup> Wittwer et al<sup>17</sup> observed a continuous elimination of blood clots via the pulmonary artery in lungs from NHBDs treated using retrograde preservation with Perfadex solution, suggesting that coagulation during warm ischemia is a very active process. Some investigators, however, still question the need for heparinization.<sup>4,5</sup>

Another frequently discussed point, covered in our study, is the effect of ventilation during warm ischemia.

Van Raemdonck et al described good graft function in deflated lungs after 1 hour of warm ischemia.<sup>18</sup> Further, Steen et al used no ventilation during warm ischemia in their study using a pig model<sup>19</sup> nor in their clinical case study of a lung transplant from an NHBD.<sup>16</sup> Rega et al<sup>5</sup> showed that animals ventilated and administered 3 hours ( $\text{FIO}_2 = 0.5$ ) of warm ischemia had a significantly higher pulmonary vascular resistance and wet to dry ratio compared with HBDs (where pulmonary function was measured immediately after death of animals). In contrast, there were no significant differences observed between HBD controls and NHBDs topically cooled for 3 hours. All these findings correlate well with our observation that pressure-controlled room-air ventilation of lungs during 1 hour of warm ischemia had a negative effect on pulmonary function and led to pulmonary edema.

Other studies have indicated a protective effect of short-term ventilation. Boglione et al concluded that ventilation with room air during warm ischemia works as a protective mechanism.<sup>6</sup> Loehe et al<sup>20,21</sup> described good graft function during 5 hours of in situ reperfusion when lungs were inflated with oxygen in a single action before warm ischemia. We assume that interpretation of their results may be based on the protective effect of the initial distension of alveoli rather than on the benefit of oxygen supply. Albert et al showed that, at higher vascular pressure, lung inflation reduces filtration and edema formation.<sup>22</sup> This opinion was also supported by Ulicny et al,<sup>23</sup> who proposed that mechanical ventila-

## weight gain (g)



**Figure 4.** Tempol prevented edema formation. After pre-arrest administration of tempol we did not observe any differences between the experimental (warm ischemia) and control (no warm ischemia) groups. The pulmonary edema presented in room-air-ventilated rats without tempol (Experiments A and B; see Figure 1) was not observed here. After 120 minutes of reperfusion, lung weight increased in all groups (\* $p < 0.001$ ).

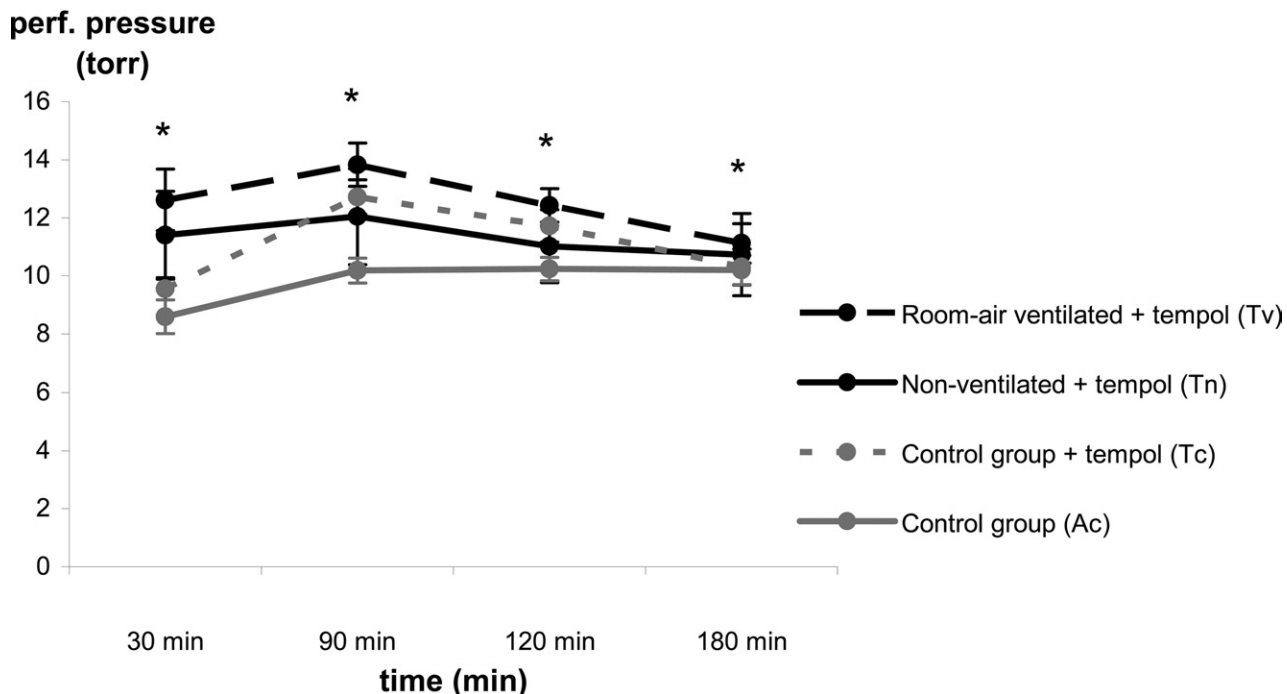
tion itself reduces edema formation by maintaining alveoli distended, and this mechanism is independent of a continual supply of oxygen. Van Raemdonck also suggested that the critical factor in protecting lungs from warm ischemia damage might be the prevention of alveolar collapse rather than the actual oxygen delivery caused by ventilation.<sup>8</sup>

In contrast to our study and those of others,<sup>4,18</sup> Wittwer et al<sup>17</sup> found that ventilation in a pressure-controlled mode with  $FiO_2 = 0.5$  for up to 300 minutes during warm ischemia had no harmful effect on pulmonary function. We have no explanation for this discrepancy.

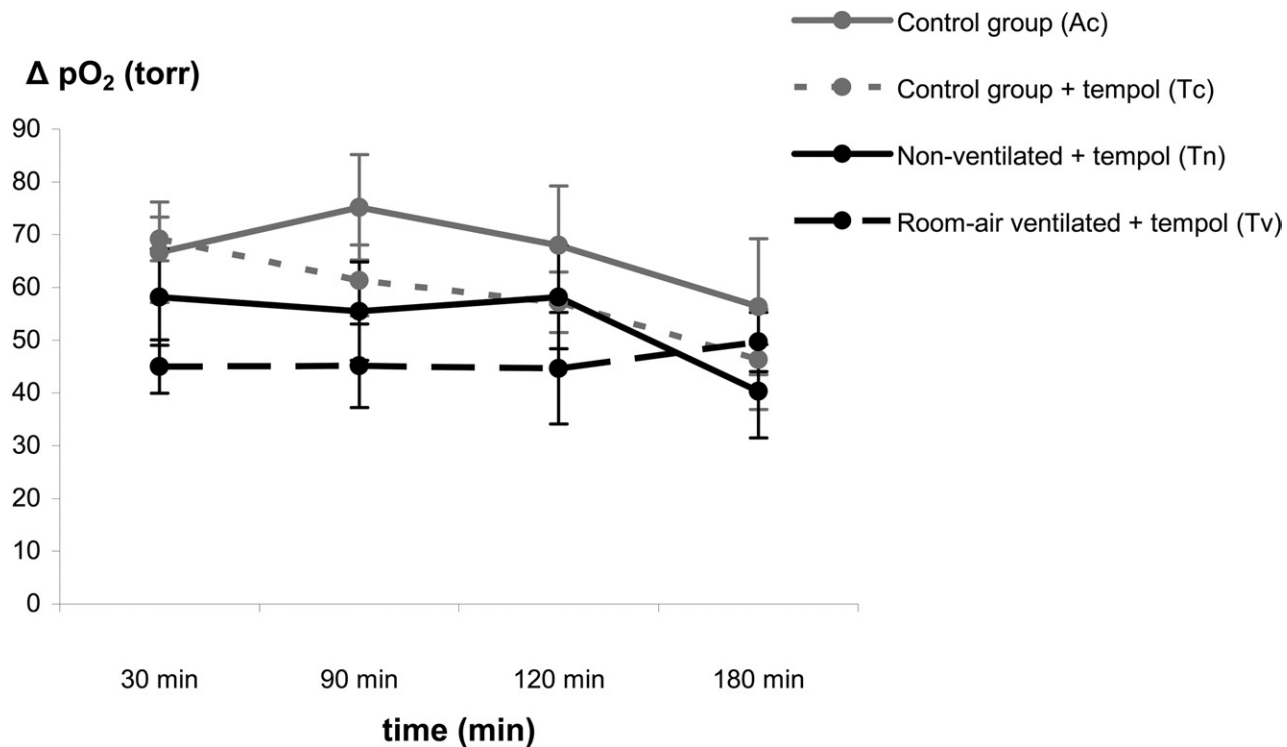
Based on our results, we expected the pressure-controlled ventilation with room air to play a key role in ROS-mediated damage of lung function. In the absence of circulation, the lung tissue is exposed to a higher partial pressure of oxygen. Therefore, large amounts of ROS are produced, even under ischemic conditions during ventilation with an oxygen-containing gas mixture. When blood flow is re-established, a burst of free radicals occurs, leading to the parenchymal damage. This was described by Koyoma et al,<sup>24</sup> who also re-

ported a beneficial effect of superoxide dismutase on protection against pulmonary edema formation. Also, administration of the scavenger and inhibitor of hydroxyl radicals, MCI-186, had a significant protective effect on pulmonary ischemia-reperfusion injury by inhibiting lipid peroxidation.<sup>25</sup>

We observed a clear and significant positive effect of tempol administration. When added before cardiac arrest, tempol showed a protective effect against pulmonary edema development in lungs ventilated with room air during warm ischemia. Furthermore, tempol prevented the impairment of oxygen transport ability that was observed in the first two experimental phases. It is important to point out that we did not observe any effect of tempol on the control groups. Tempol was administered before cardiac arrest, which allowed its distribution into the pulmonary vascular bed and a good effect during warm ischemia. In our recent study<sup>26</sup> we did not find any effect of tempol given at the beginning of reperfusion in an attempt to prevent ischemia-reperfusion injury. Therefore, the beneficial effect of tempol is restricted to pre-arrest administration only. In view of this, tempol reduced the harmful effect of warm ischemia,



**Figure 5.** The effect of pre-arrest administration of tempol on perfusion pressure. Perfusion pressure in the group ventilated during warm ischemia with room air was slightly elevated ( $*p < 0.05$ , by repeated-measures ANOVA). No differences were observed among the other groups.



**Figure 6.** Tempol prevented the decrease of oxygen partial pressure in lungs harvested after warm ischemia. No differences were found in oxygen transport ability among tempol-treated groups.

which was manifested even more in the presence of ventilation with an oxygen-containing gas mixture.

There are several complementary effects of tempol-mediated reduction of ROS damage. Tempol attenuates the harmful effect of superoxide anions *in vitro*<sup>27,28</sup> and also reduces the formation of hydroxyl radicals generated in the Fenton reaction by reducing the intracellular levels of ferrous iron.<sup>29</sup> Although tempol probably does not scavenge H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, it is likely that it diminishes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injury by preventing the effects of hydroxyl radicals.<sup>14</sup>

The principal findings of this study are as follows: (1) heparin caused lower perfusion pressure and better oxygen transport ability in lungs retrieved from non-heart-beating rats; (2) room-air ventilation during warm ischemia resulted into massive pulmonary edema after reperfusion; and (3) pre-arrest administration of tempol protected the lungs from the damage caused by room-air ventilation. Tempol also prevented the deterioration of  $\Delta P_{O_2}$  in lungs harvested after warm ischemia.

The results of this study support the crucial importance of ROS in warm ischemia damage. We propose that the radical scavenger tempol, which has an excellent ability to permeate biologic membranes, can contribute to better preservation of lungs retrieved from NHBDs. Our findings further indicate that early administration of heparin and tempol, as well as avoidance of ventilation during warm ischemia, may be recommended for NHBD lung transplantation.

## REFERENCES

1. Binns OA, DeLima NF, Buchanan SA, et al. Impaired bronchial healing after lung donation from non-heart-beating donors. *J Heart Lung Transplant* 1996;1084-92.
2. Homatas J, Bryant L, Eiseman B. Time limits of cadaver lung viability. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1968;56:132-40.
3. Egan TM. Non-heart-beating donors in thoracic transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2004;23:3-10.
4. Rega FR, Neyrinck AP, Verleden GM, Lerut TE, Van Raemdonck DE. How long can we preserve the pulmonary graft inside the nonheart-beating donor? *Ann Thorac Surg* 2004;77:438-44.
5. Rega FR, Jannis NC, Verleden GM, et al. Should we ventilate or cool the pulmonary graft inside the non-heart-beating donor? *J Heart Lung Transplant* 2003;22:1226-33.
6. Boggione MM, Morandini MA, Barrenechea ME, Rubio RA, Aguilar D. Pre-arrest heparinization and ventilation during warm ischemia preserves lung function in non-heart-beating donors. *J Pediatr Surg* 1999;34:1805-9.
7. Kiser AC, Ciriaco P, Hoffmann SC, Egan TM. Lung retrieval from non-heart beating cadavers with the use of a rat lung transplant model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:18-23.
8. Van Raemdonck DE, Jannis NC, Rega FR, et al. Extended preservation of ischemic pulmonary graft by postmortem alveolar expansion. *Ann Thorac Surg* 1997;64:801-8.
9. Hampl V, Herget J. Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:619-24.
10. Herget J, McMurtry IF. Effects of ouabain, low K<sup>+</sup>, and aldosterone on hypoxic pressor reactivity of rat lungs. *Am J Physiol* 1985;248:H55-60.
11. Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, et al. Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, on the multiple organ failure induced by zymosan in the rat. *Crit Care Med* 2001;29:102-11.
12. Cuzzocrea S, McDonald MC, Mota-Filipe H, et al. Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:320-8.
13. McDonald MC, Zacharowski K, Bowes J, Cuzzocrea S, Thiemeermann C. Tempol reduces infarct size in rodent models of regional myocardial ischemia and reperfusion. *Free Rad Biol Med* 1999;27:493-503.
14. Thiemeermann C. Membrane-permeable radical scavengers (tempol) for shock, ischemia-reperfusion injury, and inflammation. *Crit Care Med* 2003;31(suppl):S76-84.
15. Egan TM, Hoffmann SC, Sevala M, Sadoff JD, Schlidt SA. Nitroglycerin reperfusion reduces ischemia-reperfusion injury in non-heart-beating donor lungs. *J Heart Lung Transplant* 2006;25:110-9.
16. Steen S, Sjoberg T, Pierre L, Liao Q, Eriksson L, Algotsson L. Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet* 2001;357:825-9.
17. Wittwer T, Franke UF, Fehrenbach A, et al. Innovative pulmonary preservation of non-heart-beating donor grafts in experimental lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;26:144-50.
18. Van Raemdonck DE, Jannis NC, De Leyn PR, Flameng WJ, Lerut TE. Warm ischemic tolerance in collapsed pulmonary grafts is limited to 1 hour. *Ann Surg* 1998;228:788-96.
19. Steen S, Liao Q, Wierup PN, Bolys R, Pierre L, Sjoberg T. Transplantation of lungs from non-heart-beating donors after functional assessment *ex vivo*. *Ann Thorac Surg* 2003;76:244-52.
20. Loehe F, Mueller C, Annecke T, et al. Tissue damage of non-heart-beating donor lungs after long-term preservation: evaluation of histologic alteration, bronchoalveolar lavage, and energy metabolism. *Shock* 2002;17:502-7.
21. Loehe F, Mueller C, Annecke T, et al. Pulmonary graft function after long-term preservation of non-heart-beating donor lungs. *Ann Thorac Surg* 2000;69:56-62.
22. Albert RK, Lamm WJ, Luchtel DL. Effect of lung inflation on fluid flux in zone 1 lungs. *J Appl Physiol* 1988;64:285-90.
23. Ulicny KS Jr, Egan TM, Lambert CJ Jr, Reddick RL, Wilcox BR. Cadaver lung donors: effect of preharvest ventilation on graft function. *Ann Thorac Surg* 1993;55:1185-91.
24. Koyama I, Toung TJ, Rogers MC, Gurtner GH, Traystman RJ. O<sub>2</sub> radicals mediate reperfusion lung injury in ischemic O<sub>2</sub>-ventilated canine pulmonary lobe. *J Appl Physiol* 1987;63:111-5.
25. Akao T, Takeyoshi I, Totsuka O, et al. Effect of the free radical scavenger MCI-186 on pulmonary ischemia-reperfusion injury in dogs. *J Heart Lung Transplant* 2006;25:965-71.
26. Hodyc D, Hnilickova O, Volek J, Hampl V, Herget J. Tempol reduces warm ischemic damage of lung functions in non-heart-beating donors if added pre-arrestly but doesn't have any protective effect on ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 2006;20:A399.
27. Laight DW, Kaw AV, Carrier MJ, Anggard EE. Interaction between superoxide anion and nitric oxide in the regulation of vascular endothelial function. *Br J Pharmacol* 1998;124:238-44.
28. Reddan J, Sevilla M, Giblin F, et al. Tempol and deferoxamine protect cultured rabbit lens epithelial cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> insult: insight into the mechanism of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury. *Lens Eye Toxic Res* 1992;9:385-93.
29. Mitchell JB, Samuni A, Krishna MC, et al. Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics. *Biochemistry* 1990;29:2802-7.

## Experimental Physiology

# Superoxide dismutase mimetic tempol inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats independently of nitric oxide production

Daniel Hodyc, Michal Šnorek, Tomáš Brtnický and Jan Herget

Department of Physiology, Charles University in Prague, Second Medical School, Prague, Czech Republic

Hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV), an important physiological mechanism, is regulated by changes in the production of and interactions among reactive oxygen species (ROS). There is controversy, however, over whether HPV is mediated by an increase or a decrease in ROS production. Also, the role of NO in HPV remains unclear. The aim of this study was to investigate whether the inhibition of HPV by the antioxidant tempol was dependent on the concentration of NO, and how its effect was influenced by increased basal pulmonary vascular tone. In isolated rat lungs, we measured vasoconstrictor responses to acute ventilatory hypoxia before and after administration of tempol during perfusion with or without L-NAME. We found that tempol abolished HPV independently of NO production. When we increased basal vascular tone by K<sup>+</sup>-induced depolarization, we also found that tempol completely inhibited HPV. Our results indicate that inhibition of HPV by the superoxide dismutase mimetic tempol does not depend on either NO production or a decrease in basal vascular tone.

(Received 25 January 2007; accepted after revision 8 May 2007; first published online 11 May 2007)

**Corresponding author** D. Hodyc: Department of Physiology, Charles University, Second Medical School, Plzenska 130/221, 150 00 Prague 5, Czech Republic. Email: daniel.hodyc@lfmotol.cuni.cz

Hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) reduces blood flow to poorly ventilated areas of the lung in favour of perfusion of better ventilated regions. It optimizes lung ventilation/perfusion ratio and consequently also the oxygenation of arterial blood. As a local regulatory mechanism, HPV is fast in onset and readily reversible upon reoxygenation.

The presence and intensity of HPV depends on interactions between reactive oxygen species (ROS) and NO produced in pulmonary arteries. It has been demonstrated that acute ventilatory hypoxia causes changes in production of superoxide via mitochondrial electron transport chain or NADPH oxidase activity (Marshall *et al.* 1996; Liu *et al.* 2006). Administration of superoxide dismutase (SOD) or of a non-selective NADPH oxidase inhibitor, diphenyleneiodonium, significantly attenuated HPV (Thompson *et al.* 1998; Liu *et al.* 2003). Lung hypoxia stimulates NO production, and inhibitors of NO synthesis potentiate HPV (for review see Hampf & Herget, 2000). In the presence of NO, superoxide anion rapidly forms peroxynitrite, which also causes pulmonary vasoconstriction (Belik *et al.* 2004). This reaction is almost 10 times faster than the removal of superoxide anion by

SOD. As a result of this, superoxide has a direct effect on NO concentration. Therefore, scavenging superoxide may enhance NO activity and prevent peroxynitrite formation, leading to inhibition of HPV. In contrast, superoxide scavenging might have a direct effect on HPV by reducing the concentration of a mediator reactive oxygen species.

Thus, the purpose of this study was to test, in isolated, physiological saline-perfused lungs, whether HPV is modulated mainly by superoxide production, independently of NO synthesis, or by a product of superoxide–NO interaction. For this purpose, we used the intracellularly acting ROS scavenger tempol (4-hydroxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxyl) and the NO synthesis inhibitor L-NAME.

The vasoconstrictor response to acute ventilatory hypoxia is dependent on previous stimulation. In lungs repeatedly challenged with a particular hypoxic gas mixture, the hypoxic pressor response tends to increase (Archer *et al.* 1989a). Higher vasoconstrictor responses can also be achieved by prior increase in basal vascular tone (McMurtry, 1984). In the second part of this study, we tested whether the inhibitory effect of tempol was dependent on basal pulmonary vascular tone.

## Methods

Experiments were performed on 27 adult male rats (age 7–8 weeks, average weight  $240 \pm 15$  g) in accordance with the European Community and US National Institutes of Health guidelines for using experimental animals. All procedures were approved by the Animal Studies Committee in the authors' institution.

### Isolated lungs

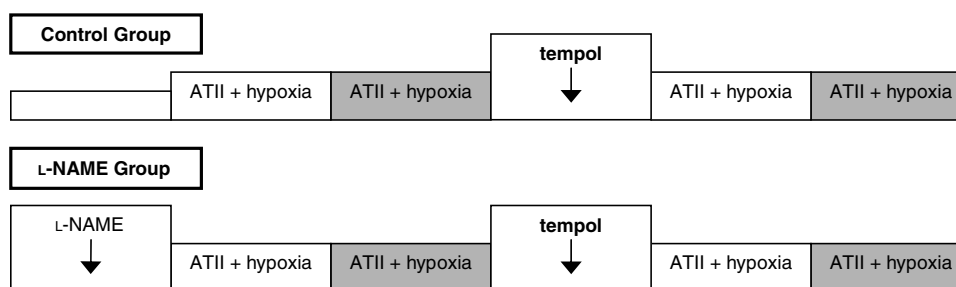
Isolated, physiological saline-perfused lungs were prepared as previously described (Herget *et al.* 1987; Hampl & Herget, 1990; Hampl *et al.* 1993). The rats were anaesthetized with an intraperitoneal injection of sodium thiopentone ( $40 \text{ mg (kg body weight)}^{-1}$ ) and ventilated with air through a tracheal cannula ( $50 \text{ breaths min}^{-1}$ ; peak inspiratory pressure  $10 \text{ cmH}_2\text{O}$ , positive end-expiratory pressure  $2 \text{ cmH}_2\text{O}$ ). The chest was then opened and the main pulmonary artery and left atrium were cannulated. Using a peristaltic pump, the lungs were perfused with physiological salt solution with albumin ( $4 \text{ g (100 ml)}^{-1}$ ; Herget & McMurtry, 1985) and meclofenamate ( $1.7 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) at a constant flow rate ( $4 \text{ ml min}^{-1} (100 \text{ g})^{-1}$ ). While being ventilated with normoxic gas mixture ( $21\% \text{ O}_2$ – $5\% \text{ CO}_2$ – $74\% \text{ N}_2$ ), the heart–lung block was excised from the body and suspended by the trachea in a heated ( $38^\circ\text{C}$ ) humidified chamber. The outflow cannula from the left atrium was connected into the circuit via the perfusate reservoir after the outflow was free of blood. The outflow pressure was set to  $-2 \text{ mmHg}$ . The pulmonary perfusion pressure was measured via a transducer connected to the inflow cannula (PowerLab, AD Instruments, Spechbach, Germany). Owing to the constant-flow perfusion mode, the values of measured perfusion pressure corresponded to pulmonary vascular resistance.

### Experimental protocol

**Experiment A: effect of ROS and NO inhibition on HPV.** The isolated lung was allowed to stabilize for 15 min before the vascular reactivity in response to

angiotensin II (ATII;  $0.2 \mu\text{g}$ ) and to acute hypoxia ( $0\% \text{ O}_2$ – $5\% \text{ CO}_2$ – $95\% \text{ N}_2$ ) was tested. The bolus of ATII injected into the inflow line caused a short (less than 2 min) transient rise in perfusion pressure. Six minutes of acute hypoxia was started 8 min after the ATII injection. This ATII–hypoxia cycle was performed twice, with 10 min intervals between cycles. Physiological saline-perfused lungs are hyporeactive relative to preparations perfused with blood or plasma, so two ATII–hypoxia challenges are usually used to induce comparable pressor reactivity (Fishman, 1976; McMurtry, 1984; Herget & McMurtry, 1987). Ten minutes after the second hypoxic challenge, tempol was added to the perfusate at a dose of  $0.5 \text{ mg (ml perfusate)}^{-1}$ . In our preliminary experiments, after this dose we observed 81% inhibition of response to ATII and 67% inhibition of response to acute hypoxia. This dose also corresponds to the recommended dose of  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  of tempol (Thiemermann, 2003). After 10 min of equilibration, two ATII–hypoxia cycles were performed (control group,  $n=6$ ). In the second experimental group (L-NAME group,  $n=6$ ), the production of NO was inhibited by addition of the non-selective inhibitor of all NO synthases, L-NAME ( $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ), to the perfusate at the start of perfusion. We then repeated the same experimental protocol as described for the control group. Changes in perfusion pressure caused by the second and fourth ATII–hypoxia cycles were compared (Figs 1 and 2).

**Experiment B: effect of increase of basal vascular tone on tempol-induced inhibition of HPV.** Since we know that the vasoconstrictor response to acute ventilatory hypoxia is dependent on previous stimulation, as well as on the level of basal vascular tone (Fishman, 1976; McMurtry, 1984), we decided to investigate whether the tempol-induced inhibition of HPV is also dependent on basal vascular tone. To increase basal vascular tone in the perfused lungs, we evoked smooth muscle depolarization by increasing the potassium ion concentration in the perfusate by  $15 \text{ mmol l}^{-1}$  (final  $\text{K}^+$  concentration of  $19.7 \text{ mmol l}^{-1}$ ).



**Figure 1. Experimental protocol of experiment A: effect of inhibition of ROS and NO production on HPV** 'Hypoxia' represents a 6 min ventilation with a gas mixture of  $0\% \text{ O}_2$ – $5\% \text{ CO}_2$ – $95\% \text{ N}_2$ . 'ATII' represents a bolus intra-arterial injection of angiotensin II ( $0.2 \mu\text{g}$ ). We compared the second and fourth response to ATII and hypoxia (shaded areas).



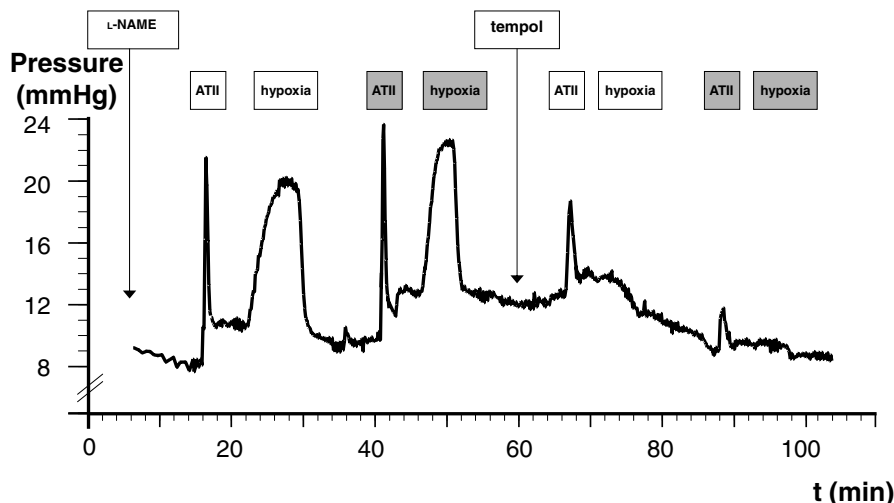


Figure 2. Original record of the measurement of perfusion pressure in experiment A

At the start of perfusion in the  $K^+$  + tempol group ( $n = 5$ ) and the  $K^+$  group ( $n = 5$ ), we added KCl into the perfusate to increase  $K^+$  concentration by  $15 \text{ mmol l}^{-1}$ . After 15 min of equilibration, the lungs were exposed to two successive hypoxic challenges and then stimulated by bolus injection of ATII followed by two additional hypoxic challenges. Then in the tempol group ( $n = 5$ ) and the  $K^+$  + tempol group, tempol was administered into the perfusate at a dose of  $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$ . Thereafter we performed two further hypoxic challenges. We compared the changes in perfusion pressure caused by second, fourth and sixth challenge of acute ventilatory hypoxia (Fig. 3).

**Statistical analyses**

The results are presented as means  $\pm$  s.e.m. They were statistically evaluated by Student’s paired  $t$  test comparison

or ANOVA and Fisher’s PLSD test, as appropriate. The statistical analyses were performed using the statistical software StatView 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

**Results**

**Experiment A**

In both the control and L-NAME groups, we found significant inhibition of vasoconstrictor responses to both ATII and hypoxia after administration of tempol. Tempol inhibited 86% of the vasoconstrictor response to ATII in the control and 83% in the L-NAME group. Hypoxia-induced vasoconstriction was 89% less in the control and 100% less in the L-NAME group.

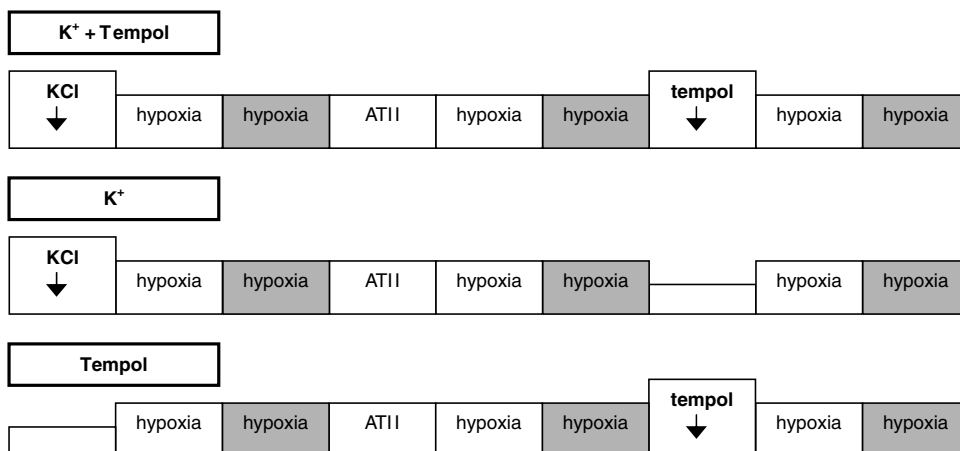


Figure 3. Experimental protocol of experiment B: effect of increase in basal vascular tone on tempol-mediated inhibition of HPV

‘Hypoxia’ represents 6 min ventilation with a gas mixture of 0%  $O_2$ –5%  $CO_2$ –95%  $N_2$ . ‘ATII’ represents a bolus intra-arterial injection of angiotensin II ( $0.2 \mu\text{g}$ ). ‘ $K^+$ ’ represents  $15 \text{ mmol l}^{-1} K^+$  ions added to the perfusate. The magnitudes of the second, fourth and sixth hypoxic challenges were compared (shaded areas).

Tempol-mediated inhibition of hypoxic vasoconstriction did not differ when comparing the two hypoxic challenges after administration of tempol (third and fourth hypoxia: control group  $0.4 \pm 0.1$  versus  $0.6 \pm 0.2$  mmHg,  $P = 0.33$ ; L-NAME group  $0.5 \pm 0.2$  versus  $-0.1 \pm 0.2$  mmHg, n.s.). Comparison of tempol-induced inhibition of vascular responses to acute hypoxic challenge in control and L-NAME groups (control group + tempol versus L-NAME group + tempol) did not reveal any significant difference. This suggests that NO production does not mediate the tempol-induced inhibition of HPV (Figs 4 and 5).

### Experiment B

Addition of KCl into the perfusate and the subsequent increase in  $K^+$  concentration in the  $K^+$  + tempol group and  $K^+$  group increased basal perfusion pressure ( $K^+$  + tempol group from  $9.8 \pm 0.8$  to  $12.5 \pm 1.6$  mmHg,  $P = 0.024$ ;  $K^+$  group: from  $10.5 \pm 0.6$  to  $13.5 \pm 1.1$  mmHg,  $P = 0.008$ ). There was no difference in the increased pressure between these two groups. Vascular responses to ventilatory hypoxia (second response in Fig. 3) were higher when the concentration of  $K^+$  ions in the perfusate was increased. We observed significantly higher ( $P < 0.05$ ) hypoxic pulmonary vasoconstriction in the  $K^+$  + tempol group and the  $K^+$  group compared with HPV in the tempol group. Looking at hypoxic responses after ATII administration (fourth

response in Fig. 3), we did not find any differences between the groups.

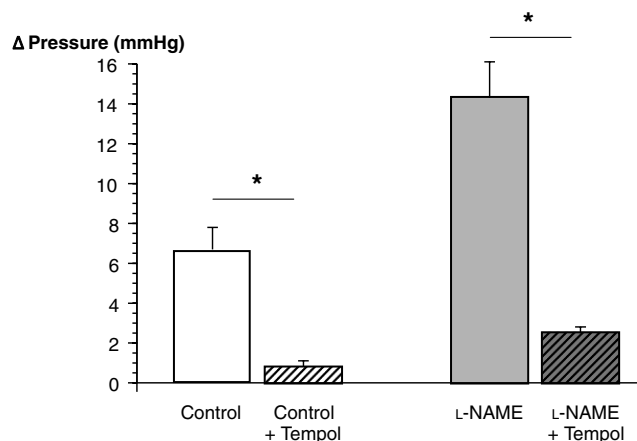
Administration of tempol ( $K^+$  + tempol group and tempol group) significantly decreased hypoxic pulmonary vasoconstriction in both the  $K^+$ -treated (96% less) and in  $K^+$ -untreated group (68% less), and the vasoconstrictor response did not differ significantly between these groups. In contrast, the intensity of HPV in the tempol-untreated group ( $K^+$  group) was constant, attesting to the viability of the preparation over the duration of the protocol (Fig. 6). When comparing the two hypoxic challenges after tempol administration (fifth and sixth period of hypoxia), we did not find statistical differences in any of the groups ( $K^+$  + tempol group  $0.2 \pm 0.0$  versus  $0.1 \pm 0.0$  mmHg, n.s.;  $K^+$  group  $2.8 \pm 0.5$  versus  $2.7 \pm 0.4$  mmHg, n.s.; tempol group  $0.8 \pm 0.2$  versus  $0.8 \pm 0.1$  mmHg, n.s.).

### Discussion

The main findings of this study are as follows.

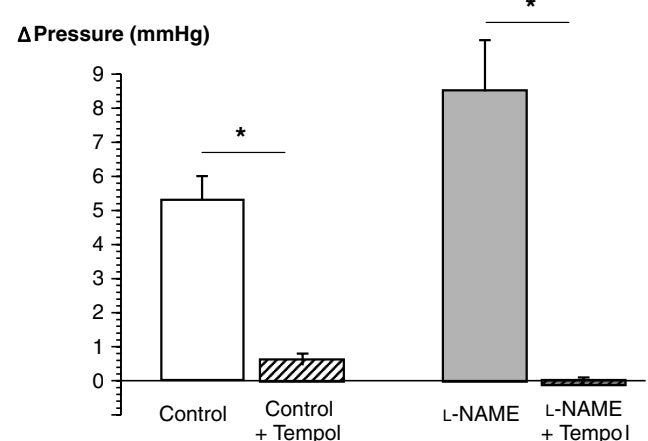
(1) Superoxide production plays a role in HPV. Its dismutation into hydrogen peroxide by the superoxide dismutase mimetic tempol significantly attenuates vasoconstrictor responses to acute ventilatory hypoxia.

(2) The effect of superoxide dismutation is directly related to a decrease in superoxide or increase in hydrogen peroxide concentration. It is not caused by overproduction of NO.



**Figure 4. Effect of tempol and tempol + L-NAME on ATII-induced vasoconstriction**

The figure shows the difference in the response to ATII before (open and shaded columns) and after administration of tempol (hatched and shaded hatched columns). After tempol administration, we found a significant decrease of ATII-induced vasoconstriction in both the control and the L-NAME group. There was no difference in this respect between the groups.  $\Delta P$  represents the change in vascular tone induced by administration of ATII;  $*P < 0.005$ . Columns show data for the control and L-NAME groups before (second ATII-hypoxia cycle) and after administration of tempol (fourth ATII-hypoxia cycle).



**Figure 5. Effect of tempol and tempol + L-NAME on HPV**

The figure shows the difference in the response to hypoxia before (open and shaded columns) and after administration of tempol (hatched and shaded hatched columns). After tempol administration, we found a significant decrease of HPV in both the control and the L-NAME group. Just as after angiotensin administration, in HPV we did not find any difference between the control and L-NAME group.  $\Delta P$  represents the change in vascular tone induced by acute hypoxia;  $*P < 0.005$ . Columns show data for the control and L-NAME groups before (second ATII-hypoxia cycle) and after administration of tempol (fourth ATII-hypoxia cycle).

(3) The reduction of HPV in the presence of tempol does not depend on the basal tone of the pulmonary vessels.

Although there is considerable evidence that ROS play an important role in the regulation of pulmonary vascular tone during acute and chronic ventilatory hypoxia, the mechanism, source and reaction pathways involved in the regulation remain unclear. In addition to the controversy over whether the source of ROS is in the mitochondrial electron transport chain (Waypa *et al.* 2001) or in NADH oxidase (Gupte *et al.* 2005), another important debate concerns the character of ROS concentration change during hypoxia.

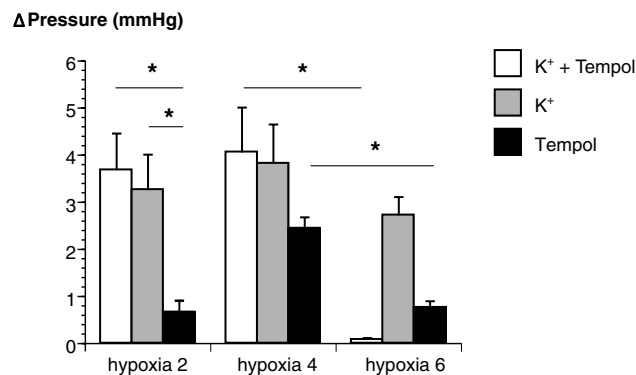
One group of investigators presents the view that HPV is evoked by sudden decrease in ROS production. The redox theory of HPV, developed by Archer *et al.* (1986), is based on the assumption of continual, tonic production of ROS during normoxia. They observed rapid inhibition of radical production both in isolated perfused lungs and in isolated pulmonary artery rings during acute hypoxia. In the proposed mechanism, the electron transport chain is altered by hypoxia, and ROS production decreases. Reduction or oxidation of cysteine and methionine groups by a redox mediator, such as ROS, can cause conformational changes in the  $K_V$  channels. This  $K_V$  channel inhibition depolarizes the membrane and activates  $Ca^{2+}$  entry via L-type  $Ca^{2+}$  channels (Moudgil *et al.* 2005). According to this theory, there is definitely a physiological role for continual ROS production. Superoxide is produced at very low levels during normoxia, and antioxidant enzymes such as SOD reduce superoxide to  $H_2O_2$ , which is subsequently reduced by catalase to  $H_2O$  and  $O_2$ . This mechanism serves both in cellular protection against the potentially damaging effects of superoxide and for continual regulatory production of  $H_2O_2$ . A fall in  $H_2O_2$  concentration leads to HPV. Although Wolin's group believe that NADH oxidase, instead of the mitochondrial electron transport chain, is the relevant source of ROS, they have also found that a decrease of  $H_2O_2$  production elicits HPV (Gupte *et al.* 2005).

In contrast, Liu *et al.* (2003) measured ROS production using dichlorofluorescein fluorescence, lucigenin-derived chemiluminescence (LDCL) and electron paramagnetic resonance (EPR) spin adduct spectra in small distal porcine pulmonary arteries. They found that radical production was increased during hypoxia. The same conclusions result from observations made by Schumacker's group, who also found an increase of ROS production evoked by acute hypoxia (Waypa *et al.* 2001; Waypa & Schumacker, 2005).

In our study, we have used tempol to decrease the superoxide concentration. Tempol permeates biological membranes and works intracellularly (Thiemermann, 2003). It has been reported that the protective effects of tempol result from its ability to scavenge superoxide anions

and hydroxyl radicals (Thiemermann, 2003; Sainz *et al.* 2005). In activated neutrophils, tempol does not decrease  $H_2O_2$  and the protective effect cannot be attributed to catalase-like activity (Hahn *et al.* 1997). Since we have observed that tempol inhibits HPV, we assume that superoxide is reduced to  $H_2O_2$  in the presence of tempol. As a result, there is a smaller decrease in the intracellular concentration of hydrogen peroxide during hypoxia. Considering the theory that HPV is evoked by a sudden fall in  $H_2O_2$  concentration, this could be one explanation of tempol-induced inhibition of HPV. The alternative explanation, arising from the possibility that the intracellular increase of ROS is an attribute of HPV, seems to be more likely, however. In tempol-induced potentiation of superoxide dismutation, the excess of  $H_2O_2$  may be readily metabolized by catalase, and inhibition of HPV results from the deficient increase in ROS concentration. The intermediate for hypoxic pulmonary vasoconstriction could also be the superoxide molecule. Owing to its reactivity, however, it seems more likely that superoxide is rapidly converted to diffusible and significantly more stable hydrogen peroxide within the mitochondria (Burke & Wolin, 1987; Moudgil *et al.* 2005). Another potential mediator in HPV could be the hydroxyl radical produced in the Fenton reaction. Increased perfusion pressure was found in the presence of the hydroxyl radical, and this effect was subsequently inhibited by dimethylthiourea (an hydroxyl radical scavenger; Tate *et al.* 1982). However, the particular effect of the hydroxyl radical in hypoxic pulmonary vasoconstriction remains unclear.

Angiotensin II used in our experimental protocol served primarily for prestimulation of pulmonary vessels. We observed a significant decrease in ATII-induced vasoconstriction after administration of tempol. This finding may reflect an essential role of either superoxide or hydrogen peroxide in the vasoconstrictive response



**Figure 6. Effect of  $K^+$  concentration on tempol-mediated inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction**

The bar graph shows the increase in perfusion pressure induced by acute ventilatory hypoxia ( $\Delta P$ ); \* $P < 0.05$ .

to ATII. Via activation of NADPH oxidase, ATII stimulates superoxide production in endothelial cells (de Gasparo, 2002; Lassegue & Clempus, 2003). Scavenging of superoxide by tempol then inhibits ATII-mediated vasoconstriction. In chronic experiments, the effects of ATII on renal vasculature are inhibited by tempol (Welch *et al.* 2005). It is not certain, however, that a similar mechanism can be ascribed to the fast vasoconstriction induced by bolus injection of ATII in lung vessels. Grimminger and co-workers blocked, in isolated rabbit lungs, the hypoxic pulmonary vasoconstriction induced by the NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium, whereas the vasoconstrictor response to ATII was not altered (Grimminger *et al.* 1995).

Aside from SOD-mediated reduction of superoxide into H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superoxide reacts rapidly with NO, creating peroxynitrite. Although the exact role of NO production during HPV is not completely understood, many authors have observed that NO synthase inhibitors, such as N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine or L-NAME, significantly potentiate the vasoconstrictor responses of isolated rat lungs to hypoxia (Archer *et al.* 1989b; Barer *et al.* 1993; Hampl & Herget, 2000). Scavenging the superoxide using SOD or tempol prevents the peroxynitrite formation from NO, which consequently contributes to a higher concentration of available NO. Beckman *et al.* (1990) proposed that at least a part of the SOD protective effect may result from a decrease in the decomposition of NO. Lilley & Gibson (1996) also found that the role of antioxidants, such as superoxide dismutase, ascorbate or reduced glutathione, is in the protection of NO against superoxide anions. Since we found that tempol abolished vasoconstrictor responses in the same manner with or without pretreatment with L-NAME, its inhibition of HPV does not appear to result from a higher concentration of NO.

In the pathway of HPV, K<sub>V</sub> channels are described as likely effectors (Reeve *et al.* 2001). Some of the K<sub>V</sub> channels are sensitive to changes in redox potential. A decrease of superoxide radical or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during hypoxia causes conformational changes in these channels by reduction or oxidation of cysteine and methionine groups (Rettig *et al.* 1994). The resulting inhibition of K<sup>+</sup> current causes membrane depolarization, leading to the activation of Ca<sup>2+</sup> entry via L-type Ca<sup>2+</sup> channels, with subsequent myocyte contraction (Moudgil *et al.* 2005). The 'high ROS in HPV' alternative is that an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> is the stimulus (Waypa *et al.* 2001). In isolated rat lungs, increasing the concentration of K<sup>+</sup> ions in the perfusate depolarizes the vascular smooth muscle and thereby increases the baseline vascular tone and potentiates the vasoconstrictor response to acute ventilatory hypoxia. When increasing K<sup>+</sup> concentration in the perfusate, we were interested in whether this could prevent the tempol-induced inhibition of HPV. Although K<sup>+</sup> administration

significantly increased HPV, tempol almost completely abolished this vasoconstrictor response. In the presence of tempol, the hypoxic response was not dependent on the K<sup>+</sup> concentration in the perfusate. This conforms to the idea that the changes in ROS concentration are crucial in the onset of HPV.

In conclusion, the present study demonstrates that reduction of superoxide concentration by tempol inhibits HPV, and that the HPV inhibitory effect does not result from protection of NO against superoxide anions.

## References

- Archer SL, Nelson DP & Weir EK (1989a). Simultaneous measurement of O<sub>2</sub> radicals and pulmonary vascular reactivity in rat lung. *J Appl Physiol* **67**, 1903–1911.
- Archer SL, Tolins JP, Raji L & Weir EK (1989b). Hypoxic pulmonary vasoconstriction is enhanced by inhibition of the synthesis of an endothelium derived relaxing factor. *Biochem Biophys Res Commun* **164**, 1198–1205.
- Archer SL, Will JA & Weir EK (1986). Redox status in the control of pulmonary vascular tone. *Herz* **11**, 127–141.
- Barer G, Emery C, Stewart A, Bee D & Howard P (1993). Endothelial control of the pulmonary circulation in normal and chronically hypoxic rats. *J Physiol* **463**, 1–16.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA & Freeman BA (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1620–1624.
- Belik J, Jankov RP, Pan J & Tanswell AK (2004). Peroxynitrite inhibits relaxation and induces pulmonary artery muscle contraction in the newborn rat. *Free Radic Biol Med* **37**, 1384–1392.
- Burke TM & Wolin MS (1987). Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **252**, H721–H732.
- de Gasparo M (2002). Angiotensin II and nitric oxide interaction. *Heart Fail Rev* **7**, 347–358.
- Fishman AP (1976). Hypoxia on the pulmonary circulation. How and where it acts. *Circ Res* **38**, 221–231.
- Grimminger F, Weissmann N, Spriestersbach R, Becker E, Rosseau S & Seeger W (1995). Effects of NADPH oxidase inhibitors on hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **268**, L747–L752.
- Gupte SA, Kaminski PM, Floyd B, Agarwal R, Ali N, Ahmad M, Edwards J & Wolin MS (2005). Cytosolic NADPH may regulate differences in basal Nox oxidase-derived superoxide generation in bovine coronary and pulmonary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H13–H21.
- Hahn SM, Mitchell JB & Shacter E (1997). Tempol inhibits neutrophil and hydrogen peroxide-mediated DNA damage. *Free Radic Biol Med* **23**, 879–884.
- Hampl V, Archer SL, Nelson DP & Weir EK (1993). Chronic EDRF inhibition and hypoxia: effects on pulmonary circulation and systemic blood pressure. *J Appl Physiol* **75**, 1748–1757.

- Hampel V & Herget J (1990). Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia. *Am Rev Respir Dis* **142**, 619–624.
- Hampel V & Herget J (2000). Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev* **80**, 1337–1372.
- Herget J, Frydrychova M, Kawikova I & McMurtry IF (1987). Thyroxine treatment increases the hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated lungs from thyroidectomized rats. *Bull Eur Physiopathol Respir* **23**, 217–221.
- Herget J & McMurtry IF (1985). Effects of ouabain, low K<sup>+</sup>, and aldosterone on hypoxic pressor reactivity of rat lungs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **248**, H55–H60.
- Herget J & McMurtry IF (1987). Dexamethasone potentiates hypoxic vasoconstriction in salt solution-perfused rat lungs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **253**, H574–H581.
- Lassegue B & Clempus RE (2003). Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**, R277–R297.
- Lilley E & Gibson A (1996). Antioxidant protection of NO-induced relaxations of the mouse anococcygeus against inhibition by superoxide anions, hydroquinone and carboxy-PTIO. *Br J Pharmacol* **119**, 432–438.
- Liu JQ, Sham JS, Shimoda LA, Kuppusamy P & Sylvester JT (2003). Hypoxic constriction and reactive oxygen species in porcine distal pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**, L322–L333.
- Liu JQ, Zelko IN, Erbynn EM, Sham JS & Folz RJ (2006). Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**, L2–L10.
- McMurtry IF (1984). Angiotensin is not required for hypoxic constriction in salt solution-perfused rat lungs. *J Appl Physiol* **56**, 375–380.
- Marshall C, Mamary AJ, Verhoeven AJ & Marshall BE (1996). Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**, 633–644.
- Moudgil R, Michelakis ED & Archer SL (2005). Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* **98**, 390–403.
- Reeve HL, Michelakis E, Nelson DP, Weir EK & Archer SL (2001). Alterations in a redox oxygen sensing mechanism in chronic hypoxia. *J Appl Physiol* **90**, 2249–2256.
- Rettig J, Heinemann SH, Wunder F, Lorra C, Parcej DN, Dolly JO & Pongs O (1994). Inactivation properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels altered by presence of  $\beta$ -subunit. *Nature* **369**, 289–294.
- Sainz J, Wangenstein R, Rodriguez Gomez I, Moreno JM, Chamorro V, Osuna A, Bueno P & Vargas F (2005). Antioxidant enzymes and effects of tempol on the development of hypertension induced by nitric oxide inhibition. *Am J Hypertens* **18**, 871–877.
- Tate RM, Vanbenthuyzen KM, Shasby DM, McMurtry IF & Repine JE (1982). Oxygen-radical-mediated permeability edema and vasoconstriction in isolated perfused rabbit lungs. *Am Rev Respir Dis* **126**, 802–806.
- Thiemermann C (2003). Membrane-permeable radical scavengers (tempol) for shock, ischemia-reperfusion injury, and inflammation. *Crit Care Med* **31**, S76–S84.
- Thompson JS, Jones RD, Rogers TK, Hancock J & Morice AH (1998). Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated rat pulmonary arteries by diphenyleneiodonium (DPI). *Pulm Pharmacol Ther* **11**, 71–75.
- Waypa GB, Chandel NS & Schumacker PT (2001). Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res* **88**, 1259–1266.
- Waypa GB & Schumacker PT (2005). Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. *J Appl Physiol* **98**, 404–414.
- Welch WJ, Blau J, Xie H, Chabrashvili T & Wilcox CS (2005). Angiotensin-induced defects in renal oxygenation: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H22–H28.

## Acknowledgements

The study was supported by GAUK 45/2005/C, Cardiovascular Research Centre MSMT 1M 0510 and GACR 305/05/0672.