

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program:

Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Ivana Vítková**

**Vliv akutního chladu a stálého světla na levou komoru srdce potkana**  
The effect of acute cold and permanent light to left ventricular of the rat heart

Diplomová práce

Vedoucí práce:

RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.

Praha, 2018

### **Prohlášení**

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

V Praze, 10. 8. 2018

.....

Bc. Ivana Vítková

## **Poděkování**

Zde bych velice ráda poděkovala především své školitelce RNDr. Jitce Žurmanové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce a za velkou pomoc během zpracování, za její velice vřelý přístup, velkou podporu a trpělivost a předání množství cenných zkušeností a znalostí. Dále bych velice ráda poděkovala RNDr. Daniele Horníkové Ph.D. za velkou pomoc a cenné rady v oblasti metodiky a za její trpělivost při práci v laboratoři. Další velké poděkování patří Mgr. Anetě Marvanové a Doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, Dsc. za přípravu exponovaného modelu. V neposlední řadě patří velký dík Mgr. Veronice Tibenské za cenné rady a pomoc s prací v laboratoři a za poskytnutí svých výsledků a dále Mgr. Davidovi Kolářovi za velkou pomoc jak v oblasti teorie tak metodiky a poskytnutí výsledků.

Velký dík též patří i všem ostatním členům naší laboratoře za příjemné pracovní prostředí a vřelý přístup.

Na závěr bych chtěla poděkovat svým nejbližším za velkou psychickou podporu a oporu, kdy ne vše vycházelo dle předpokladů.

## **ABSTRAKT**

Akutní chladová expozice zvyšuje riziko náhlých srdečních příhod, podobně expozice stálému světlu negativně působí na kardiovaskulární systém. Nicméně individuální působení těchto faktorů a vliv jejich kombinace na kardiomyocyty není dosud znám. Práce se zabývá vlivem 3 denní chladové expozice a stálého světla na expresi  $\beta$ -adrenergických receptorů a spřažených G-proteinů ve spojitosti s apoptotickými signály v levé komoře srdce potkana kmene Wistar. V rámci této práce byly stanoveny apoptotické proteiny BAX, BCL2, kaspáza 8 a významné komponenty  $\beta$ -adrenergní signalizace –  $\beta$ -adrenergní receptory  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , G-proteiny,  $G\alpha_s$ ,  $G_{i1/2}$  a  $G_{i3}$ . Relativní exprese proteinů byla analyzována pomocí metody Western blot. Výsledky potvrzují detrimentalní vliv chladové i světelné expozice. Avšak synergický účinek těchto dvou stresorů ukazuje překvapivé výsledky.

**Klíčová slova:** *chlad, světlo,  $\beta$ -adrenergní signalizace, apoptóza, oxidativní stres, vápník, mitochondrie, kardiomyocyt*

## **ABSTRACT**

Acute cold exposure increases the risk of sudden cardiac events, similarly exposure to constant light negatively affects the cardiovascular system. However, the individual effects of these factors and the effect of their combination on cardiomyocytes are not yet known. The thesis deals with the influence of a 3 day cold exposure and constant light on the expression of  $\beta$ -adrenergic receptors and associated G-proteins in association with apoptotic signals in the left ventricle of the Wistar rat heart. In this work apoptotic proteins BAX, BCL2, caspase 8 and important components of  $\beta$ -adrenergic signalization -  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, G-proteins, Gas, Gi1/2 and Gi3 were determined. The relative expression of the proteins was analyzed by Western blotting. The results confirm the detrimental effect of cold and light exposure. However, the synergistic effect of these two stressors shows surprising results.

**Key words:** *cold, light,  $\beta$ -adrenergic signalization, apoptosis, oxidative stress, calcium, mitochondria, cardiomyocyte*

## Seznam zkratek

AC	adenylátcykláza
AIF	apoptózou indukovaný faktor
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
ARC	cytoprotektivní represor apoptózy s kaspázovou regresní doménou
BAD	BCL2-associated agonist of cell death
BAK	BCL2-antagonist/killer
BAX	BCL2-associated X protein
BCL2	B-cell lymphoma 2
BCL-XL	B-cell lymphoma - extra large
BID	BH3 interacting domain death agonist
BIM	Bcl-2-like protein 11
BMF	Bcl-2-modifying factor
BSA	hovězí sérový albumin
CaMKII	kalmodulin dependentní kináza II
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CARD	caspase recruitment domains
CASP8	kaspáza 8
CREB	cAMP response element-binding protein
ERK	extracellular regulated kinase
FADD	fas-associated protein with death domain
FAO	fatty acids $\beta$ -oxidation
FAO	fatty acids $\beta$ -oxidation
GDP	guanosyldifosfát
GPCRs	G protein coupled receptors
GTP	guanosyltrifosfát
G $\alpha$ i	G-protein alpha inhibiční
G $\alpha$ s	G-protein alpha stimulační
ICER	inducible cAMP early repressor
IP3	inositoltrifosfát
mPTP	mitochondriální pór přechodné propustnosti

NAC	N-acetylcystein
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PGC-1 $\alpha$	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PKA	protein kináza A
PKB	protein kináza B
PMCA	Ca <sup>2+</sup> pumpa na sarkoplamatické membráně
PPAR $\alpha$	peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
RyR	ryanidinový receptor
SDS-PAGE	elektroforézou v polyakrylovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SERCA	Ca <sup>2+</sup> ATPázová pumpa
SOD	superoxid dismutáza
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TRADD	tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein

## OBSAH

1.	ÚVOD .....	9
2.	VLIV AKUTNÍHO CHLADU NA ORGANISMUS .....	10
2.1	Vliv akutního chladu na srdce .....	10
2.2	Vliv cirkadiálních rytmů na srdce.....	12
3.	$\beta$ -ADRENERGŇÍ SIGNALIZACE V KARDIOMYOCYTU .....	14
3.1	G-proteinová signalizace .....	15
3.1.1	Podjednotka $G\alpha$ .....	15
3.1.2	Podjednotka $G\beta\gamma$ .....	16
3.2	Role G proteinů v kardiomyocytech.....	16
3.2.1	$G\alpha$ stimulační .....	16
3.2.2	Role PKA v kardiomyocyty .....	16
3.2.3	$G\alpha$ inhibiční.....	17
4.	APOPTÓZA V SRDCI.....	19
4.1	Regulace apoptózy.....	22
5.	SRDEČNÍ POŠKOZENÍ .....	23
5.1	Apoptóza kardiomyocyty .....	23
5.2	Vápníkové přetížení.....	24
5.3	Oxidativní stres.....	24
5.4	N-acetylcystein .....	25
6.	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	26
7.	MATERIÁL A METODY .....	27
7.1	Laboratorní zvířata a jejich expozice.....	27
7.2	Odběr myokardu a jeho zpracování.....	27
7.3	Mitochondriální bobtnání .....	27
7.4	Izolace hrubé membránové frakce.....	28
7.5	Stanovení proteinů.....	29
7.6	SDS-PAGE elektorforéza .....	29
7.7	Western Blotting.....	29
7.8	Imunodetekce.....	30



7.9	Statistické vyhodnocení .....	30
8.	VÝSLEDKY .....	31
9.	DISKUZE .....	41
10.	ZÁVĚR.....	45
11.	SEZNAM LITERATURY .....	46
12.	PŘÍLOHY.....	56

## 1. ÚVOD

Kardiovaskulární poruchy jsou v současné době neustále se rozšiřujícími civilizačními chorobami. Tento fakt je často přisuzován vlivu nadměrné stresové zátěže moderní doby. Cílem výzkumu je porozumět podstatě četných kardiovaskulárních onemocnění podmíněných nadměrným stresem. Stresová zátěž může být způsobena neadekvátní teplotou okolí, narušením cirkadiálních rytmů, hypoxií, hypoglykemií a mnoha dalšími faktory. Tato práce je zaměřena na stresovou zátěž způsobenou akutním chladem a stálým světlem. Po vystavení organismu akutnímu chladu dojde k aktivaci termoregulačních mechanismů, které jsou spuštěny přes signální dráhy adrenergního systému. Tyto mechanismy mají samozřejmě vliv na kardiovaskulární systém a vedou ke zvýšení tepové frekvence a zvýšené rezistenci periferních cév, které následně vedou ke zvýšení krevního tlaku. Při dlouhodobé expozici nepřiměřenému chladu může dojít k srdeční hypertrofii a přetížení srdce, které může vyústit v buňčné poškození až k apoptóze samotného kardiomyocytu. Významným stresovým faktorem je i expozice stálému světlu, neboť dochází k narušení cirkadiálních rytmů. Tímto efektem mohou být postiženi lidé pracující na směny nebo s obdobným nepravidelným rytmem spánku a bdění. Narušení cirkadiálních rytmů může vést k desynchronizaci vegetativního nervového systému. Porozumění vlivu stresu na signální dráhy kardiomyocytu je velice důležité pro vývoj dalších terapeutických mechanismů a vyvarování se stresových faktorů působících na srdce.

## 2. VLIV AKUTNÍHO CHLADU NA ORGANISMUS

Teplokrevní živočichové mají schopnost udržovat stálou tělesnou teplotu ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) a oddělovat tak teplotu těla od teploty okolí. K udržení stálé tělesné teploty náleží složité regulační mechanismy, které jsou řízeny z hypotalamu (Kanosue et al., 2010). Receptory pro vnímání tepla a chladu jsou umístěny na volných nervových zakončeních na periferii i uvnitř těla. V případě vystavení organismu chladu dochází k aktivaci sympatického nervového systému, který aktivuje akutní odpověď organismu. Tato odpověď na jedné straně brání ztrátám tepla a na druhé straně stimuluje jeho produkci. Stimulace sympatiku zapříčiní periferní vazokonstrikci, vzpřímení ochlupení, zvýšení krevního tlaku a zrychlení srdečního tepu. Motorický nervový systém spustí svalový třes, čímž zvyšuje tvorbu tepla. Dalším mechanismem je aktivace hypothalamo-pituárně-adrenální osy (HPA osa), (Djordjevci, Cvijic, & Davidovic, 2003). Stimulace HPA osy stimuluje tvorbu glukokortikoidů, které mobilizují metabolismus a tvorbu tepla (Moriscot, et al., 1993). Dále je zvýšená tvorba arginin-vazopresinu, který brání ztrátám vody a vzrůstá i thyroïdní hormon, který reguluje metabolismus. Nemůžeme opomenout ani zvýšení aktivity renin-angiotenzin-aldosteron systému (Cassis, 1993). Tato dráha podporuje vazokonstrikci cév, uvolnění katecholaminů jak z dřeně nadledvin tak z nervových zakončení a brání ztrátám vody. Během aklimace na chlad dochází samozřejmě i k potlačení některých faktorů. Takovým faktorem se například jeví imunitní systém, který je potlačen vlivem zvýšené aktivity HPA osy, RAAS a katecholaminů (Guo-zhu et al., 2016). Vedle toho může dojít k poklesu motility žaludku a jeho vyprazdňování (Koo, Ogle, & Cho, 1985). Chlad je tedy stresor, který vyvolává vysoce komplexní odpověď organismu. Každý organismus je na chlad různě citlivý a adaptivní mechanismy se mohou i u savců lišit. To zda bude dlouhodobé vystavení chladu působit detrimentálně nebo zvýší odolnost jedince, závisí na teplotě a délce trvání expozice. Nicméně akutní vystavení chladu se u neadaptovaných jedinců vždy projevuje jako významný stresor.

### 2.1 Vliv akutního chladu na srdce

Řada studií dokládá, že vliv extrémního chladu má negativní dopad na kardiovaskulární soustavu i v případě krátkodobé a náhlé expozice, ke které běžně dochází v zimních měsících při přechodu z teplého prostředí do zimy. Statisticky bylo potvrzeno, že během zimního období dochází častěji k akutnímu infarktu myokardu (Sheth et al., 1999), vzniku atriální fibrilace (Frost et al., 2018) a výskytu srdeční hypertenze (Hirai et al., 2015). Dánská studie poukazuje

na zvýšení rizika vzniku atriální fibrilace v zimním období až o 20 % (Frost et al., 2018). Některé studie poukazují na zvýšenou hladinu rizikových markerů jako je cholesterol (Whaley et al., 1987), C-reaktivní protein,  $\alpha$ 1-antichymotripsyn a fibrinogen právě v tomto období (Woodhouse et al., 1994)

Vlivem periferní vazokonstrikce a zvýšené aktivity sympatiku dochází ke zvýšení krevního tlaku. Existují studie, které přímo potvrdily zvýšenou koncentraci noradrenalinu ve vezikulárních váčcích v nervových zakončeních u potkanů umístěných v místnosti o teplotě 3°C (Brodde et al., 1976). Následně zvýšený krevní objem krve kolující v tělním jádře samozřejmě působí i na srdce, které je tak objemově přetěžováno (Brennan et al., 1982). Zvýšený objem krve tělního jádra je kompenzován zvýšenou diurézou (Sun et al., 2003; Diplomová práce Marvanová). K objemovému přetížení jsou více náchylní muži, starší generace a pacienti se srdeční hypertenzí (Sheth et al., 1999). Bylo prokázáno, že během chladové expozice dochází ke zvýšené aktivitě  $\beta$ -adrenergních receptorů, konkrétně  $\beta$ 1 a  $\beta$ 2 (Janský et al., 2008). Oba receptory mohou působit stimulačním směrem, urychlují metabolismus a dochází tak k vyšší produkci tepla. Data naznačují, že při stimulaci agonistou  $\beta$ 1 a  $\beta$ 2 receptoru dochází ke zrychlení metabolismu u neadaptovaných jedinců i ke zvýšení srdečního tepu. Naopak u otužilých jedinců stimulací  $\beta$ 1 (Dobutamin) a  $\beta$ 2 (Bricanyl) receptorů ke zrychlení metabolismu nedochází. Studie se dále zabývá rychlostí srdečního tepu, kdy stimulací  $\beta$ 2 dochází k pozitivně chronotropnímu účinku u otužilých i neotužilých jedinců, ale u otužilců je nárůst tepové frekvence podstatně menší. Stimulace  $\beta$ 1 neměla na srdeční frekvenci vliv u obou skupin. Efekt je mírně potlačen u otužilců, kdy k pozitivní chronotropii dochází pouze z 1/2 proti neotužilým jedincům. Podávání agonisty  $\beta$ 1 vedlo ke zvýšení systolického krevního tlaku, který byl více zvýšen u neotužilých jedinců, zatímco stimulace  $\beta$ 2 neměla na změnu systolického tlaku vliv.  $\beta$ -adrenergní receptory též ovlivňují periferní vazokonstrikci. Při podávání agonisty obou receptorů byla snížena teplota kůže na prstech, která vede ke zvýšení krevního tlaku aniž by došlo ke zrychlení srdečního tepu. Tento fakt naznačuje, že může dojít k periferní vazokonstrikci a zapojení tak  $\beta$ 1 i  $\beta$ 2 receptorů v hladké svalovině cév na periférii (Janský et al., 2008). Zvýšená aktivita sympatiku a objemové přetížení může vést ke zvýšenému vzniku aterosklerózy, ruptury aterosklerotických plátů a tím i častějšímu vzniku infarktu myokardu. Tendence ke zvýšení krevního tlaku potvrzují studie, které zmíněné faktory měřily na potkanním modelu. Potkani vykazovali zvýšení systolického i diastolického tlaku při teplotě 6°C, které byli vystaveni po dobu 4 týdnů (Fregly et al., 1989). Nutno podotknout, že potkani byli chováni individuálně a bez podestýlky, aby bylo zabráněno vzájemnému zahřívání, vlhkost vzduchu se neudává. U těchto potkanů byly též poškozeny renální funkce. Další studie

poukazuje na úlohu  $\alpha 2$ -adrenergních receptorů ve změnách hemodynamiky (Lin et al. 2017). V tomto experimentu byl jedné skupině potkanů podáván Yohimibin (antagonista  $\alpha 2$ -adrenergního receptoru). Poté byli potkani umístěni do klece s vodou o teplotě 4°C a výškou hladiny 2 cm po dobu 10 min. Následně byly vyjmuti, osušeni a na 20 min umístěni do standardních klecí. Poté byly opět na 10 min umístěni do klecí s vodou. Celý cyklus se opakoval 3-krát. Během pokusu byl telemetricky monitorován srdeční tlak, tep a vaskulární oscilace. Výsledky byly porovnány s kontrolní skupinou a naznačují, že sympatická aktivace postsynaptických  $\alpha 2$ -adrenoceptorů způsobuje vazokonstrikci a zesílení myogenních vaskulárních oscilací, což může zase zvýšit průtok krve, aby se zabránilo poškození tkání při stresujícím chlazení.

## **2.2 Vliv cirkadiánních rytmů na srdce**

Srdce, stejně jako další orgány, vykazuje svůj vlastní cirkadiánní rytmus. Tento rytmus je řízen centrálními hodinami umístěnými v suprachiasmatickém jádru anteriorní části hypothalamu (Campos et al., 2014). Hlavním humorálním regulátorem cirkadiánních rytmů je melatonin. Nejvyšší výlev melatoninu je v nočních hodinách a během dne klesá (Fracp et al., 2001). Jeho vliv na srdeční činnost byl a stále je rozsáhle studován. Protektivní vliv melatoninu na srdeční činnost ukazují studie zejména v roli antioxidantu (Zhu et al., 2015). Nicméně, je všeobecně známo, že během spánkové fáze dochází k poklesu srdečního tlaku i tepu (Yamasaki et al., 1998), což může a nemusí být přímý účinek. Stejně, jako další studie, které dokládají pozitivně chronotropní, bathmotropní i inotropní efekt natupijící v dopoledních hodinách (Hu et al., 2004, (Stergiou et al., 2002)

Kardiomyocyty i pacemakerové buňky jsou pod kontrolou vlastních hodinových genů, které ovlivňují výše zmíněnou chronotropii, inotropii i tonicitu (Young et al., 2001). V souladu s tímto rytmem je i výlev katecholaminů, který má též svůj cirkadiánní rytmus. Byl prokázán úzký vztah mezi melatoninem a adrenergním i cholinergním systémem. Výlev katecholaminů stoupá v dopoledních hodinách po probuzení, odpoledne klesá a poté začne opět stoupat ve večerních hodinách (Scho et al., 1997). V této souvislosti jde tedy uvažovat o zvýšené pravděpodobnosti výskytu ichemických srdečních příhod nebo zvýšené arytmo-genzi, ke kterým může docházet častěji v dopoledních hodinách (Kono et al., 1996). Dalším humorálním regulátorem vykazující svůj cirkadiánní rytmus je výlev kortizolu. Jeho výlev má nejvyšší peak v ranních hodinách, kdy během dne postupně klesá (Debono et al., 2009). O kortizolu je dobře známo, že podporuje srdeční činnost. Projev nedostatku kortizolu se nazývá Addisonova

choroba, která je mimo jiné specifická snížením kontraktility srdečních papilárních svalů (Lefer, 1968).. Bylo zjištěno, že pod kontrolou hodinových genů jsou samozřejmě i iontové kanály ( $K^+$  kanál,  $Ca^{2+}$  kanál), konexiny mezibuněčných spojů a další signální komponenty, které též vykazují rytmicitu ve své funkci (Yamashita et al., 2003, Pfeffer et al., 2009, Young, 2018).

Vliv cirkadiálního rytmu byl též studován na úrovni mitochondrií. Stejně jako buněčný cyklus a jiné orgány, tak i mitochondrie jsou pod vlivem cirkadiálních rytmů. Bylo zjištěno, že svoji rytmicitu vykazují transkripční faktory PPAR $\alpha$  a PGC-1 $\alpha$  (Oishi et al., 2005) a při narušení jejich rytmicky, dochází k defektům mitochondriální struktury i funkce. PGC-1 $\alpha$  je hlavním regulátorem mitochondriální biogeneze (Schreiber et al., 2004). Změna exprese transkripčních faktorů vede k dysregulaci řady genů kódujících mitochondriální enzymy FAO (fatty acids  $\beta$ -oxidation), které regulují metabolismus mastných kyselin (Sack et al., 1996).

Bylo zjištěno, že v případě mutace některého z hodinových genů může dojít k narušení srdečního rytmu a dá se předpokládat, že narušení denního rytmu světla může mít též negativní dopad na srdeční funkce. Mutace hodinových genů byly studovány na myším modelu, kdy během aktivní části dne docházelo k poklesu rychlosti srdečního tepu proti kontrolní skupině (Bray et al., 2018). Dále lze předpokládat, že asynchronní působení světla na suprachiasmatické jádro v hypothalamu, může desynchronizovat i rytmus v buňkách na periférii. Efekt desynchronizace stálým světlem byl studován na lidech pracujících na směny. Účastníkům této studie byl měřen krevní tlak po dobu 24 h. Studie prokázala zvýšení systolického i diastolického tlaku u pracovníků nočních směn během spánkové fáze (Yamasaki et al., 1998), což může mít negativní dopad na kardiovaskulární systém. Snížení tlaku během spánkové fáze je považována za velmi důležité pro správnou funkci srdce a dostatečným spánkem ve vhodnou dobu můžeme předejít srdečním onemocněním (Verdecchia et al., 1989). Je známo, že narušení cirkadiálních rytmů může způsobit poškození buněk (Martino et al., 2007). Pokud je spánková fáze narušena, může docházet ke zvýšení tlaku, kontraktilní dysfunkci a k apoptóze (Sole et al., 2009). Japonská studie ukazuje, že krátkodobou světelnou stimulací ve večerních hodinách dochází ke zvýšené stimulaci autonomního nervového systému (Sakakibara et al., 2000). Tento fakt potvrzuje efekt světla na autonomní nervový systém a tak i výlev katecholaminů a jejich cirkadiální závislost na kardiovaskulární systém. Další studie se zabývá spánkovou deprivací, kdy byly potkani spánkově deprivováni po dobu 72 hodin. Během experimentu byl potkanům kontinuálně měřen krevní tlak a srdeční tep, kdy došlo k signifikantnímu zvýšení obou faktorů proti nedeprimované skupině (Yang et al., 2018). Je tedy zřejmé, že efekt spánkové deprivace přispívá k narušení cirkadiálních rytmů a zatěžuje srdce.

### 3. $\beta$ -ADRENERGNÍ SIGNALIZACE V KARDIOMYOCYTU

Vlákna sympatiku ovlivňují srdeční činnost přes  $\beta$ -adrenergní receptory. Tato signalizační dráha (viz obrázek 1) má v kardiomyocytech pozitivně chronotropní, inotropní, dromotropní i bathmotropní účinek.  $\beta$ -adrenergní receptory jsou spřažené s G-proteinovou signalizací. Jako ligandy se na receptory váží katecholaminy, které vedle toho, že podléhají cirkadiánním rytmům, tak je jejich výlev stimulován specifickým i nespecifickým stresem. V srdeční svalovině se vyskytují 3 typy receptorů –  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  a  $\beta_3$ . Nejvíce zastoupený je  $\beta_1$  – 70%, dále je přítomný  $\beta_2$  – 27% a  $\beta_3$  – 3%.

Adrenergní receptor typu  $\beta_1$  má v kardiomyocyty stimulační účinek. Nejčastěji interaguje s  $G_\alpha$  stimulační podjednotkou ( $G_{\alpha_s}$ ) a zvyšuje tak srdeční činnost přes tvorbu cyklického AMP a následnou aktivaci protein kinázy A (PKA) (Gollasch et al., 1993). Distribuce receptoru byla pozorována rovnoměrně po obvodu cytoplazmatické membrány (Wencker et al., 2003). Jiné studie naznačují vyšší expresi v kaveolách vzhledem ke kratší vzdálenosti pro aktivaci AC (Papers, 2001). Během srdečního selhání dochází k nižší expresi těchto receptorů (Kiuchi et al., 1993).

Podobně, při navázání ligandu na  $\beta_2$ -adrenergní receptor dochází opět k aktivaci  $G_{\alpha_s}$ , avšak může zde dojít i k aktivaci  $G_\alpha$  inhibiční podjednotky ( $G_{\alpha_i}$ ). Pokud dojde k aktivaci stimulační podjednotky, dochází k tvorbě cAMP s vyšší efektivitou proti vazbě na  $\beta_1$ -adrenergní receptor (Papers, 2001). U zdravého srdce je spíše aktivována  $G_{\alpha_i}$  podjednotka, která má tlumivý účinek na kontraktilitu, avšak u selhávajícího srdce dochází spíše k aktivaci  $G_{\alpha_s}$  (Heinroth-hoffmann et al., 2006). Během srdečního selhání též dochází k redistribuci receptorů, které začnou být distribuovány více v ústí T-tubulů (Dick et al 2010). Reakční kaskáda je zmíněna níže.

Adrenergní receptor typu  $\beta_3$  může aktivovat  $G_\alpha$  stimulační i inhibiční podjednotku. Na rozdíl od předešlých dvou receptorů není k jeho aktivaci nutná fosforylace (Lefkowitz, 1993). Tento receptor je nejvíce exprimován v tukové tkáni (Papers, 2001). Během srdečního selhání může dojít ke zvýšení exprese  $\beta_3$  receptoru. In vitro studie naznačují negativní chronotropní i negativně inotropní efekt, dochází zde totiž k aktivaci  $G_\alpha$  inhibiční podjednotky (Mannarino et al., 2008). In vivo studie naopak poukazují na pozitivně chronotropní i pozitivně inotropní efekt, pravděpodobně tedy může docházet též k aktivaci  $G_\alpha$  stimulační podjednotky (Gauthier

et al. 1996). Při overexpressi  $\beta_3$  receptoru u myši byla zjištěna zvýšená srdeční kontraktilita (Lindemann et al., 1983, Kohout et al., 2001). Přesnější funkci tohoto receptoru je potřeba více prozkoumat jak v in vitro, tak v in vivo podmínkách.

### 3.1 G-proteinová signalizace

Řada významných buněčných receptorů je spřažena s heterotrimerními G-proteiny, v srdci jsou významné adrenergní a cholinergní dráhy. K aktivaci malých G-proteinových molekul dochází aktivací membránových receptorů, které jsou právě s těmito G-proteiny spřaženy – GPCRs (G protein coupled receptors). Signalizační dráhy vedou například k aktivaci adenylát cyklázy, fosfolipázy C, aktivaci druhých posílů a řadě dalších buněčných drah (Hippe et al., 2013). V lidské populaci je více než 800 druhů membránových receptorů spřažených s G-proteiny, jedná se tak o největší podrodinu receptorů. Všechny tyto receptory se skládají ze sedmi transmembránových  $\alpha$ -helixů. Hlavní role receptorů spočívá v rozpoznání extracelulárních ligandů jako jsou hormony, neurotransmitery, proteiny, lipidy a další molekuly a následné přenesení signálu na intracelulární úroveň. Vazba extracelulárního ligandu probíhá na N-koncové doméně (Bjarnadóttir et al., 2006). Po vazbě ligandu dochází na intracelulární straně k vazbě trimerního G-proteinu. Slovo G protein je odvozeno od jejich GTPázové aktivity. Samotný G-protein se skládá z podjednotky  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . Při aktivaci G proteinu dojde k disociaci podjednotky  $\alpha$  od podjednotky  $\beta\gamma$ , která dále interaguje s efektorovými molekulami (Yano et al., 2017).

#### 3.1.1 Podjednotka $G\alpha$

Receptory mohou vázat především 4 hlavní typy podjednotky  $\alpha$ . Vazba konkrétního typu podjednotky se odvíjí od buněčného typu a jeho genové exprese. Právě vazba katalytické podjednotky  $\alpha$  s receptorem je kritická pro transdukcii signálu. Při aktivaci receptoru spřaženého s G-proteinem dochází na této podjednotce k výměně GDP za GTP a následnému rozdělení podjednotky  $\alpha$  od komplexu  $\beta\gamma$  (Frank et al., 2003). Podjednotka  $\alpha$  se tak může spojit s dalšími efektorovými molekulami. Hlavním typem  $\alpha$  podjednotky je  $G\alpha_s$  (stimulační). Jedná se o stimulační podjednotku, která vede k aktivaci dalších efektorových molekul. V případě  $\beta$ -adrenergní signalizace tak dochází k aktivaci AC (Yano et al., 2017). Naopak při vazbě  $G\alpha_i$  vede k inhibici signální dráhy (Eredm et al., 2010). Při aktivaci  $G\alpha_i$  podjednotky nemusí



docházet k disociaci od komplexu  $\beta\gamma$ . Celý komplex  $G\alpha\beta\gamma$  inhibiční může existovat jako heterotrimer nezávisle na jeho aktivaci (Frank et al., 2003).

### 3.1.2 Podjednotka $G\beta\gamma$

Podjednotka  $\beta$  má strukturu  $\beta$ -barelu obsahující motiv o 40 aminokyselinách, který je typický aminokyselinami aspartát a tryptofan na konci motivu. Tento  $\beta$ -barel se skládá ze sedmi skládaných listů, které interagují s podjednotkou  $\gamma$  (Sondek et al., 1996). Podjednotka  $\gamma$  se skládá ze dvou  $\alpha$ -helixů (Milligan et al., 2006). Exprese podjednotek  $\beta\gamma$  je závislá na množství a aktivitě podjednotky  $\alpha$  (Eredm et al., 2010). Samotná podjednotka  $\beta\gamma$ , může vykazovat svou vlastní aktivitu. Některé studie uvádějí, že může aktivovat  $K^+$  kanál v kardiomyocytu (Logothetis et al., 1987) nebo se účastnit na downregulaci efektorových proteinů (Clapham et al., 1993).

## 3.2 Role G proteinů v kardiomyocytech

### 3.2.1 $G\alpha$ stimulační

Po navázání katecholaminu na  $\beta_1$ -adrenergní receptor se aktivuje  $G\alpha$  stimulační podjednotka, která aktivuje adenylátcyklázu (AC) za tvorby cyklického AMP (cAMP) (Streit et al., 2016). cAMP následně aktivuje proteinkinázu A (PKA).

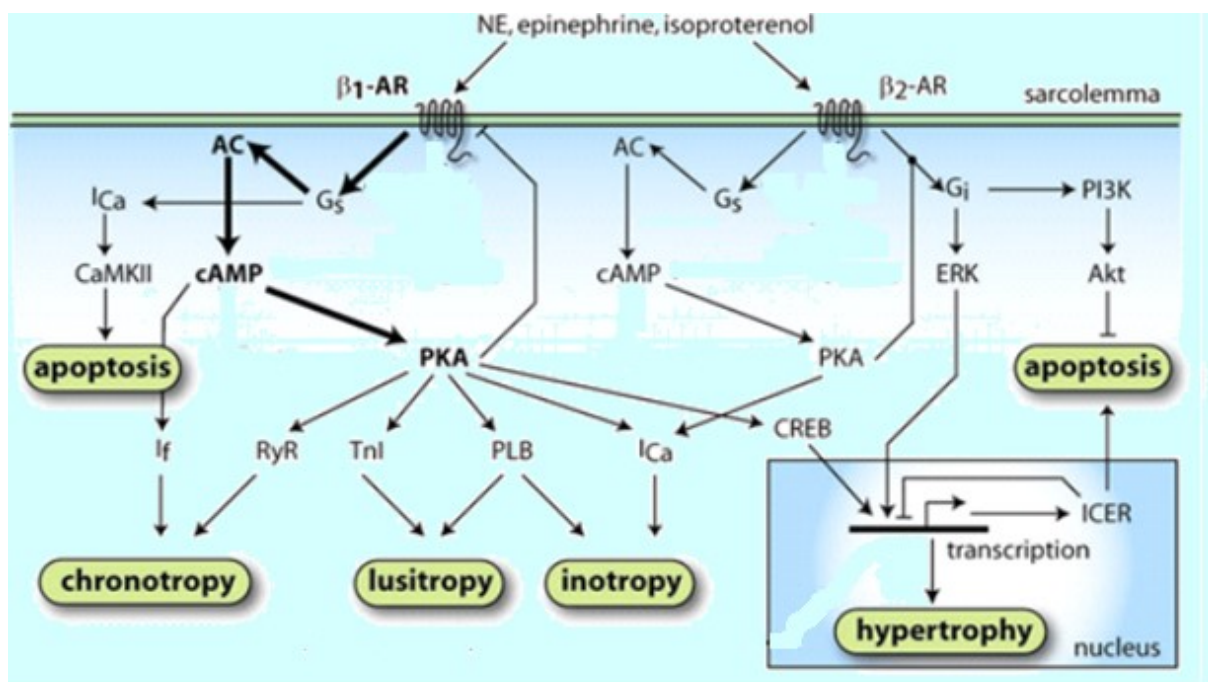
### 3.2.2 Role PKA v kardiomyocytu

Cílovou kinázou sympatiku je převážně proteinkináza aktivovaná cAMP neboli PKA. Tato kináza má v srdci několik cílů, které vedou k pozitivně chronotropním, dromotropním a bathotropním účinkům. V principu urychlují aktivaci kontrakce i její relaxaci, zasahují tedy do dynamiky  $Ca^{2+}$  iontů v srdci. Katalytické podjednotky PKA fosforylují vápníkový kanál L-typu, díky níž dochází k otevření kanálu a efluxu  $Ca^{2+}$  z extracelulárního prostoru (Gollasch et al., 1993). Dále dochází k fosforylaci ryanodinového receptoru a tak ke zvýšení výlevu  $Ca^{2+}$  ze sarkoplazmatického retikula (Manni et al., 2008). Při výlevu vápníku dochází k odblokování komplexu troponinu s myosinem interakcí  $Ca^{2+}$  s troponinem C a tak k aktivaci ATP na

myosinových hlavách a jejich kontrakci. Množství uvolněného  $\text{Ca}^{2+}$  ze sarkoplazmatického retikula se zdá být konstantní a fosforylace RyR ovlivňuje pouze jeho kinetiku. Celková cytosolová koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  je však regulována vtokem  $\text{Ca}^{2+}$  z extracelulárního prostoru (Lindegger et al., 2005). Během svalové relaxace dochází ke snížení vápníku v cytoplasmě čtyřmi mechanismy. Majoritní část  $\text{Ca}^{2+}$  je pumpována ATP pumpou na sarkoplazmatickém retikulu (SERCA). Při aktivaci adrenergní stimulační dráhy a následné fosforylaci fosfolambanu dochází ke zvýšené kapacitě tohoto přenosu (Lindemann et al., 1983) Stimulace může též probíhat na úrovni regulace  $\text{Ca}^{2+}$  ionty prostřednictvím kalmodulin dependentní kinázy II (CaMKII). Dalším mechanismem je aktivace  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výměníku (Weber et al., 2002) a aktivace  $\text{Ca}^{2+}$  pumpy (PMCA) na plazmatické membráně. Nezanedbatelná je aktivace  $\text{Ca}^{2+}$  uniporteru na mitochondriální membráně (Bassani et al., 1994). Vedle toho při nadměrné stimulaci  $\beta_1$ -adrenergního receptoru může dojít k fosforylaci cAMP response element-binding proteinu (CREB), který má úlohu v regulaci transkripce a jeho stimulací může dojít k srdeční hypertrofii (Watson et al., 2007). Tento transkripční faktor zároveň indukuje expresi „inducible cAMP early repressoru“ (ICER), který potlačuje aktivaci antitapoptického regulačního proteinu BCL2 (Tomita et al., 2003) a zasahuje tedy do řízení apoptotických procesů.

### 3.2.3 $G\alpha$ inhibiční

Podjednotka  $G\alpha_i$  působí antagonisticky s  $G\alpha_s$ . Při aktivaci inhibiční podjednotky je snížena aktivace  $\text{Ca}^{2+}$  kanálu L-typu, tím je snížen vtok  $\text{Ca}^{2+}$  a dochází tak ke snížení kontrakce. Podjednotka může být aktivována  $\beta_2$  receptorem. Jeho stimulací se zvyšuje aktivace  $G_{12}$  i  $G_{13}$  (Xiao et al., 1999).  $G\alpha_i$  též reguluje PI3K (Fosfatidylinositol-3-kinázu) a aktivuje tak Akt/PKB, která úzce souvisí s metabolismem glukózy, má antiapoptotické účinky a stimuluje „fyziologickou“ srdeční hypertrofii. Konkrétně  $G\alpha_{i2}$  stimuluje aktivaci ERK  $\frac{1}{2}$  (extracellular signal-regulated kinases), který stimuluje buněčný růst a dochází tak k srdeční hypertrofii.  $G\alpha_{i2}$  a  $G\alpha_{i3}$  mají však odlišný vliv na regulaci kanálu L-typu.  $G\alpha_{i2}$  pravděpodobně snižuje proud tímto kanálem, zatímco  $G\alpha_{i3}$  proud naopak zvyšuje (Dizayee et al., 2011). Tuto skutečnost již naznačuje Foerster et al., 2003, kdy zjistil, že u srdečního selhání dochází k vyšší expresi  $G\alpha_{i2}$ . Existují studie, které tvrdí, že  $G\alpha_{i2}$  působí negativně chronotropně i negativně inotropně - snižuje vtok  $\text{Ca}^{2+}$  L kanálem (Zuberi et al., 2010).



Obrázek 1:  $\beta$ -adrenergní signalizace –  $\beta$ -Adrenergní receptory 1 a 2 s kaskádou svých efektorových molekul (upraveno podle Saucerman a McCulloch, 2006)

Vysvětlivky:  $\beta$ 1-AR =  $\beta$ -adrenergní receptor 1,  $\beta$ 2-AR =  $\beta$ -adrenergní receptor 2,  $G_s$  = stimulační G-protein,  $G_i$  = inhibiční G-protein,  $PI3$  = inositol-tri-fosfát,  $AC$  = adenylátcykláza,  $CaMKII$  = kalmodulin dependentní kináza II,  $cAMP$  = cyklický adenosin monofosfát,  $ERK$  = extracelulární signál regulační kináza,  $Akt$  = protein kináza B,  $PKA$  = protein kináza A,  $RyR$  = Ryanidinový receptor,  $Tni$  = troponin I,  $PLB$  = fosfolipáza B,  $Ica$  = proud vápníku,  $CREB$  = cAMP response element-binding protein,  $ICER$  = inducible cAMP early repressor

#### 4. APOPTÓZA V SRDCI

Srdeční tkáň má vysoce oxidativní metabolismus a proto patří mezi nejcitlivější tkáně na nedostatek kyslíku. Zvýšený stres stimuluje adrenergní a kortikoidní systém, což může vést při chronické stimulaci k přetížení srdečního svalu. Na buněčné úrovni může dojít k zahájení degračních mechanismů  $Ca^{2+}$  přetížením, ROS, hypoxií nebo hypoglykemií.

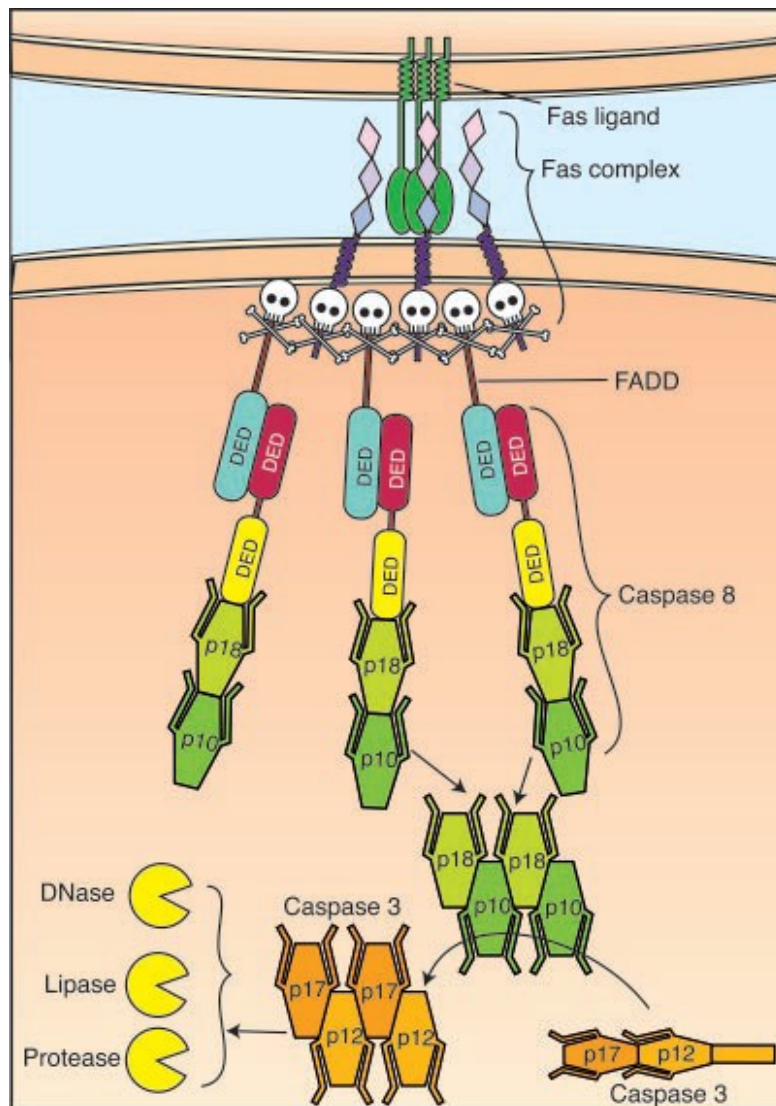
Tyto mechanismy vedoucí k smrti buněk doprovází řadu onemocnění jako je infarkt myokardu, ischemická choroba srdeční nebo srdeční selhání (Wencker et al., 2003). Společným faktorem všech těchto onemocnění je poškození energetické homeostázy kardiomyocytů. Apoptóza je přirozený děj, který vede k buněčné smrti definovanými mechanismy. Je spuštěna již během embryonálního vývoje, kdy tak napomáhá diferenciaci tkání (Kerr, Wyllie, & Currie, 1972). Na rozdíl od nekrózy vyžaduje proces apoptózy energii ve formě ATP (Li et al., 1997).

K buněčnému poškození může dojít řadou vlivů jako je oxidativní stres, hypoxické poškození, radioaktivním zářením nebo narušením cirkadiálních rytmů. Během procesu apoptózy dochází v buňce k morfologickým změnám, které začínají bobtnáním mitochondrií. Dále dochází ke kondenzaci chromatinu a rozpadu DNA i plazmatické membrány (Kerr et al., 1972).

K apoptóze může dojít dvěma hlavními mechanismy - vnějším, kdy buňka dostává signál pomocí ligandu z vnějšího prostředí a vnitřním, kdy buňka dává signál sama sobě. V případě vnější cesty (viz obrázek 2) dochází k aktivaci receptoru na plazmatické membráně (Banner et al., 1993). Tímto receptorem může být TNFR (Tumor necrosis factor receptor) nebo Fas receptor. Aktivace receptoru je spuštěna navázáním ligandu, kterým může být makrofágem uvolněný cytokin a dojde tak k aktivaci asociované adaptorové domény TRADD v případě TNFR a FADD v případě Fas receptoru (Antwerp et al., 1996). Ve většině případů se zdá, že iniciační kaspázou této signální dráhy je kaspáza 8 (21kDa), avšak v některých případech to může být též kaspáza 10 (Sprick et al., 2002). FADD doména působí na kaspázu 8 jako stabilizační lešení, která se zároveň sama rozštěpí (Muzio et al., 1998). Aktivní kaspáza 8 aktivuje další efektorové kaspázy. Dochází zde především k aktivaci kaspázy 3. Často je aktivována i kaspáza 9, ta však může být inhibována proteiny z BCL2 rodiny. Dále dochází k aktivaci kaspáz 2, 6 nebo 7 (Kreutz et al., 2012, Hirata et al., 1998, Slee et al., 1999).

Kaspázy jsou rodinou proteáz, které štěpí proteiny za aspartátovými rezidui (Kaufmann et al., 1993). Jsou exprimované v neaktivní formě jako prokaspázy ve formě dimeru. Při jejich aktivaci dochází k rozštěpení prokaspázy do její aktivní formy. Do této rodiny patří 2 podrodiny

– iniciační a efektorové. Iniciační kaspázy aktivují efektorové, které štěpí jednotlivé proteiny za tvorby apoptotických tělísek (Hawkins et al., 2000). Apoptotická tělíška jsou následně fagocytována makrofágy (Wajant, 2002).

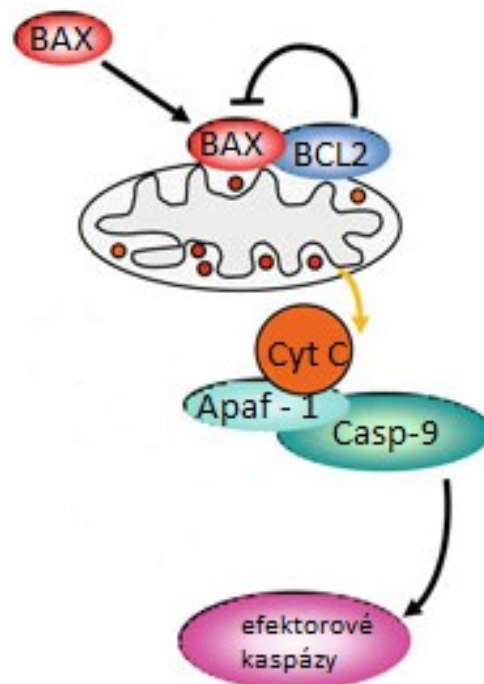


Obrázek 2: Vnější cesta apoptózy – aktivace Fas receptoru a následná kaskáda aktivací dalších proteinů (Wajant, 2002)

Během aktivace vnější cesty apoptózy může být stimulována i vnitřní cesta apoptózy – (mitochondriální). Kaspáza 8 může aktivovat kaspázu 9, která stimuluje uvolnění cytochromu C. Tento mechanismus může být zahájen i sám o sobě jako stresová odpověď na  $\text{Ca}^{2+}$  přetížení, hypoxii (Soares et al., 2005), hypoglykemií (Cardoso et al., 2013) nebo oxidativní stres.

Při porušení energetické homeostázy mitochondrie dojde k otevření mPT póru

(mitochondrial permeability transition pore) který propojí obě mitochondriální membrány. Touto zvýšenou propustností membrány dojde ke zkratu proudu oxidační fosforylace. Mitochondrie se snaží vyrovnat osmotický tlak a dojde tak k jejich bobtnání (swellingu) (Sesso et al. 2012). Mimo jiné dojde k uvolnění signální molekuly pro spuštění vnitřní cesty apoptózy - cytochromu C z intermembránového prostoru do cytosolu (González et al., 2010). O tom, zda dojde k apoptóze či nekróze rozhoduje koncentrace ATP. Pokud je zahájena apoptóza vnitřní cestou (viz obrázek 3), tak je na cytochrom C navázán dokovací protein Apaf-1 a změní tak jeho konformaci. Touto vazbou vznikne apoptozom, který spustí aktivaci kaspáz. Na apoptozom se naváže kaspáza 9 svou death doménou CARD. Tato vazba vede k rozštěpení samotné kaspázy a tak k její aktivaci. Aktivní kaspáza-9 pak štěpí a aktivuje další kaspázy (2; 3; 6; 7). Na aktivační kaspázu 9 mohou působit její regulační efektorové kaspázy, jako je tomu u kaspázy 3, která působí na kaspázu 9 pozitivní zpětnou vazbou. Na konci této aktivační kaskády kaspáza 6 aktivuje kaspázu 8 a 10 (Slee et al., 1999), které nastartují sledem reakcí fragmentaci DNA (Li et al., 1997), RNA a dalších proteinů.



Obrázek 3: Vnitřní (mitochondriální) cesta apoptózy (upraveno podle Estaquier, 2012)

## 4.1 Regulace apoptózy

Vnitřní cesta apoptóza je regulována proteiny z Bcl2 rodiny. Geny proteinů Bcl2 rodiny byli poprvé identifikováni ve folikulárních lymfomových B-buňkách (Zavala et al., 1985). Mezi členy této proteinové rodiny spadají proapoptotické i antiapoptotické proteiny.

Mezi proapoptotické proteiny patří globulární protein BAX a BAK obsahující 9  $\alpha$ -helixů (Suzuki et al., 2000, Moldoveanu et al., 2006). Molekulární velikost BAXu je 21 kDa a BAKu 23 kDa. BAK je lokalizován na vnější mitochondriální membráně, zatímco BAX je volně v cytosolu (Griffiths et al., 1999, Wolter et al., 1997). Při aktivaci apoptózy se BAX translokuje z cytosolu na vnější mitochondriální membránu a spolu s BAK přes své BH3 domény vytvoří oligomer (George et al., 2007). Během oligomerizace dochází ke konformační změně a insercí  $\alpha$ -helixu 5 a 6 jsou do vnější mitochondriální membrány tvořeny póry (Muchmore et al., 1996). Vytvořením póru dojde k uvolnění cytochromu C.

Druhou skupinou této rodiny jsou antiapoptotické proteiny integrované na vnější mitochondriální membráně. Mimo to se mohou vyskytovat na membráně endoplazmatického retikula nebo na jaderné membráně (Borner et al., 1994). Mezi ně patří BCL-2, BCL-X, MCL-1 a BCL-W. Tyto proteiny obsahují 4 BH(1-4) domény (Kvansakul et al., 2008).

BCL2 protein se skládá z 8  $\alpha$ -helixů a jeho molekulární velikost je 26 kDa. Jeho úlohou je vyvazování proapoptotických proteinů a zabraňování tak jejich oligomerizaci. Dalším antiapoptotickým mechanismem je zabránění aktivitě kaspáz (Bruey et al., 2007). BCL2 též snižuje pravděpodobnost uvolňování cytochromu C prostřednictvím mPTP vazbou na vnější mitochondriální membránu, a brání tak ztrátě membránového potenciálu (Yang et al., 2012)

Dalším významným antiapoptotickým proteinem je BCL-xl. Tento protein má podobný význam jako BCL2 – zabraňuje aktivitě kaspáz (Bruey et al., 2007) a uvolnění cytochromu C.

Poslední skupinou BCL2 rodiny jsou BH3 only proteiny, kam patří BIM, PUMA, BID, BAD, BMF a NOXA. Tyto proteiny obsahují homologní úsek v BH3 doméně s proapoptotickými proteiny. BH3 only proteiny jsou aktivovány během stresové signalizace. Zároveň mohou inhibovat antiapoptotické proteiny této rodiny a usnadnit tak proces apoptózy (Uren et al., 2007).

Dalším důležitým regulačním proteinem je Akt (PKB). Akt je na IP3 závislá kináza, která může inhibovat apoptózu několika mechanismy. Akt může fosforylovat regulační protein BAD (Datta et al., 1997), přímo kaspázu 9 (Cardone et al., 2012) nebo fosforylací FKHL1 transkripčního faktoru a tím zablokování transkripce Fas receptoru. Všechny zmíněné děje vedou k zablokování apoptózy.

## 5. SRDEČNÍ POŠKOZENÍ

### 5.1 Apoptóza kardiomyocytu

V kardiomyocytech byly prokázány obě cesty apoptózy – vnitřní i vnější. Vzhledem k tomu, že kardiomyocyty mají vysoce oxidativní metabolismus a obsahují tak velké množství mitochondrií, vnitřní cesta apoptózy je mnohem častější.

Tlakové přetížení vyvolávající srdeční hypertenzi aktivuje TNF a FAS receptory, které mohou stimulovat vnější apoptotickou dráhu (Ferrari et al., 1995). Existují klinické studie, které zkoumaly inhibitory TNF- $\alpha$ . Při chronickém srdečním selháním se prováděly klinické studie s použitím sloučenin, které poškozují cirkulující TNF- $\alpha$ . V těchto studiích je použit Etanercept, který váže a neutralizuje cirkulující TNF- $\alpha$ . Zatímco malé pilotní studie vykazují povzbudivé výsledky (Balakumar et al., 2006, Bozkurt et al., 2002), rozsáhlejší studie teorii naopak vyvracejí (Chung et al., 2003).

Další studie se zabývají kaspázami. Některé ukazují, že exprese kaspáz se snižuje s narůstajícím věkem. V dospělém srdci je jejich exprese velmi nízká (Bahi et al., 2006). Novodobá studie uvádí, že apoptóza může být indukována v srdci bez aktivace kaspáz pravděpodobně prostřednictvím faktoru indukujícího apoptózu (AIF). Obě cesty apoptózy mohou být potlačeny cytoprotektivním represorem apoptózy s kaspázovou regresní doménou (ARC) (Bae et al., 2010). ARC inhibuje vnější cestu apoptózy interakcí s kaspázou 8 a dalšími komponenty smrti jako je FADD. Inhibice vnitřní cesty je zablokováním BAX (Gustafsson et al., 2004). AIF je ukotvený svým N-koncem do vnitřní mitochondriální membrány a svým C-koncem ční do intermembránového prostoru. Tento faktor je důležitou součástí I. komplexu oxidační fosforylace. Pokud dojde ke spuštění apoptózy, AIF je rozštěpen a uvolněn do cytosolu, odkud je translokován do jádra kde napomáhá kondenzaci chromatinu a fragmentaci jádra (Daugas et al., 2000). Zároveň je hladina AIF důležitá pro srdeční funkci a jeho inaktivace je pozorována u dilatovaných kardiomyocytů (Joza et al., 2001). Daugas et al., 2000 však prokazuje zvýšenou hladinu AIF při ischemicko/reperfúzním poškození. Dalším apoptotickým proteinem v kardiomyocytu je endonukleáza G. Její lokalizace je v intermembránovém prostoru mitochondrie. Při aktivaci apoptózy je translokována do jádra, kde štěpí DNA. Její úloha byla prokázána v buňkách postižených ischemicko-reperfúzním poškozením (Bahi et al., 2006). Propojení vnější cesty apoptózy s vnitřní může být v kardiomyocytu přes kaspázu 8.



Kaspázou 8 je rozštěpen regulační protein BID, který se svým C-koncem translokuje na vnější mitochondriální membránu, kde pravděpodobně aktivuje vnitřní cestu.

## 5.2 Vápníkové přetížení

Úloha vápníku v živém organismu je velmi důležitá. Jedná se o signální molekulu v mnoha buněčných pochodech. Intracelulární koncentrace vápníku je na velmi nízkých hodnotách, která je přísně regulována. Změna intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  vyvolává buněčnou odpověď jako je kontrakce svalového vlákna, buněčný transport, otevření iontových kanálů, aktivace signálních drah a mnoha dalších. Pokud dojde k nadměrnému zvýšení vstupu vápníku přes  $\text{Ca}^{2+}$  kanály na plazmatické membráně z extracelulárního prostoru nebo přes  $\text{Ca}^{2+}$  kanály na sarkoplazmatického retikula, může dojít k buněčnému poškození. Na zvýšenou koncentraci vápníku jsou vysoce citlivé mitochondrie. Jeho následkem může dojít k narušení oxidační fosforylace a tím k tvorbě kyslíkových radikálů. Vlivem oxidativního stresu a vápníkového přetížení může dojít k otevření výše zmíněného mPT póru (Hunter et al., 1979).

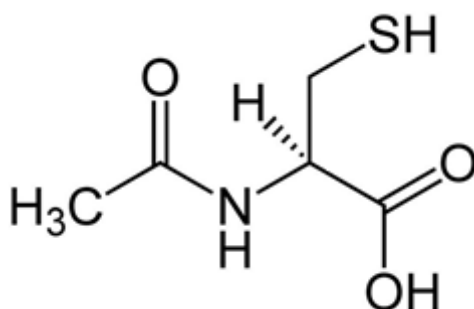
## 5.3 Oxidativní stres

Hlavním energetickým zdrojem buněk jsou mitochondrie. Nejvíce energie je získáváno oxidativní fosforylací, během které dochází k tvorbě ATP. Pokud je buňka pod vlivem stresu například z  $\text{Ca}^{2+}$  přetížení, hypoxie (Soares et al., 2005) nebo hypoglykemie (Cardoso et al., 2013) může docházet k tvorbě kyslíkových radikálů. Tyto radikály vznikají nedokonalou oxidací kyslíku a mohou buňku poškozovat. Navíc mohou reagovat s oxidem dusnatým za vzniku ještě více buňku ohrožujícího peroxinitritu. Zvýšenou koncentrací kyslíkových radikálů může dojít k otevření mPT póru, vylití cytochromu C a spuštění tak apoptózy. Na obranu může mitochondrie použít několik mechanismů. Radikály mohou být oxidovány buď neenzymaticky vitamínem A, C, E a glutathionem nebo enzymaticky superoxid dismutázou (SOD), katalázou a glutathion peroxidázou. SOD oxiduje volné radikály na kyslík a peroxid vodíku (McCord et al., 1969), kataláza dále redukuje peroxid vodíku na vodu a kyslík. Během oxidativního stresu je zvýšená aktivace ERK, která pomáhá buňce přežít (Xia et al., 1995). Oxidativní stres je součástí řady onemocnění jako je ateroskleróza, diabetes, pulmonární fibróza nebo neurodegenerativní onemocnění.

## 5.4 N-acetylcystein

Tato látka patří mezi běžně užívané léčivo ze skupiny expektorancií (viz obrázek 4). V praxi se používá při léčbě chronické obstrukční plicní nemoci, nefropatiích a HIV. Jeho význam kromě mukolytických účinků spočívá v antioxidačních účincích. N-acetylcystein je prekurzorem glutathionu, který je známé antioxidační činidlo v živém organismu (Carlsten et al.,2018). Glutathion je zodpovědný za udržování oxidativní rovnováhy v buňce. Je schopný přímo oxidovat reaktivní formy kyslíku nebo katalýzou pomocí glutathion peroxidázy přes NADH.

Příznivé účinky N-acetylcysteinu v kardiologii byly potvrzeny v několika studiích. Při použití N-acetylcysteinu v kombinaci s nitroglycerinem došlo méně často k infarktu myokardu (Horowitz et al., 1988). Další studie uvádějí příznivý účinek tohoto antioxidantu během ischemicko-reperfúzního poškození (Orhan et al., 2006).



Obrázek 4: Molekula N-acetylcysteinu

([https://www.remediahomeopathy.com/img/upload/arzneibild\\_gross/n-acetylcystein.10709.jpg](https://www.remediahomeopathy.com/img/upload/arzneibild_gross/n-acetylcystein.10709.jpg))

## **6. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Cílem diplomové práce bylo stanovit markery apoptózy a vybrané proteiny  $\beta$ -adrenergní signalizace v levé komoře potkanů vystavených akutnímu chladu (3 dny) a stálému světlu (3 dny).

## 7. MATERIÁL A METODY

### 7.1 Laboratorní zvířata a jejich expozice

K pokusu byli použiti laboratorní potkani samci kmene Wistar (300 až 350g, n=6). Experiment zahrnoval 4 skupiny:

- potkani vystaveni 12 hodin světlu a 12 hodin tmě při pokojové teplotě 25°C po dobu tří dnů - kontrolní skupina (K)
- potkani vystaveni 72 hodin světlu při pokojové teplotě 25°C (LL)
- potkani vystaveni 12 hodin světlu a 12 hodin tmě při teplotě 6°C ±1°C (C-LD)
- potkani vystaveni 72 hodin světlu při teplotě 6°C ±1°C (CH-LL)

Druhá část experimentu zahrnovala další čtyři skupiny potkanů, kde každá skupina potkanů byla vystavena stejným podmínkám jako výše zmíněné s rozdílem, že každému potkanovi byl během expozice intraperitoneálně podáván antioxidant N-acetylcystein (10 mg/100 g 1 x denně).

### 7.2 Odběr myokardu a jeho zpracování

Po tří denní adaptaci byla potkanům odebrána srdce v hluboké anestezii (10 mg/100 g), (viz příloha tabulka č. 1). Následně byl potkan otevřen přes hrudní oblast, byla odebrána srdeční tkáň a rozstříhána na levou a pravou komoru a septum. Vzorky levých komor byly zabaleny do alobalu a zamraženy v tekutém dusíku.

### 7.3 Mitochondriální bobtnání

Mitochondriální bobtnání bylo provedeno podle (Drahota et al., 2012). Metoda je založená na principu poklesu absorbance ( $\lambda = 520$  nm) mitochondrií titrované roztokem CaCl<sub>2</sub>. Levá komora srdce potkana byla homogenizována teflonovým homogenizátorem při teplotě 0 °C/na ledu jako roztok 10% homogenátu smíchaného s 0,25 M sacharózy, 10 mM Tris-HCl, 2 mM EGTA a 0,5 mg/L hovězího sérového albuminu (BSA) při pH = 7.2. Následně byla tkáň centrifugována

(800 RPM, 10 min). Po centrifugaci byl pelet dvakrát promyt v pufru Tris-sacharóza (bez EGTA a BSA, pH = 7.2) a poté opět centrifugován (8 000 RPM, 10 min, 4 °C). Nově usazený pelet byl resuspendován v 500 µL téhož pufru. Koncentrace bílkovin byla stanovena dle Bradfordovy metody (viz níže). Metoda měření mitochondriálního bobtnání je založena na základě poklesu absorbance při 520 nm měřeného ve spektrofotometru Shimadzu UV-1601 při pokojové teplotě. Do médium pro mitochondrie (viz příloha tabulka č. 2) byly přidány mitochondrie (zhruba 0,4 mg/1 ml) tak, aby bylo dosaženo absorbance o hodnotě kolem 1. Mitochondrie byly v médiu inkubovány zhruba 1 minutu a poté bylo přidáno 200 µM CaCl<sub>2</sub>. Snížení absorbance bylo sledováno kontinuálně po dobu 5 min v 0,1 s intervalech. Z 3 000 získaných hodnot každého vzorku byla vyhodnocena křivka poklesu absorbance mitochondrií a tím zhodnocení mitochondriálního bobtnání (z níž maximální míra bobtnání odpovídá nejprudšímu poklesu A v intervalu 10 sekund).

#### **7.4 Izolace hrubé membránové frakce**

Izolace hrubých membrán byla provedena podle (Novotný et al., 1999) Postup byl následující. Zmražená tkáň levé komory srdce (LV) potkana byla zvážena na analytických vahách. Následně byla tato tkáň vhozena do porcelánové misky s tekutým dusíkem, kde byla rozdrcena pomocí tloučku a převedena do předvážených zkumavek se  $\frac{3}{4}$  očekávaného výsledného objemu roztoku TMES v poměru 5 µl TMES/1 mg tkáně, tj. 20% homogenát. Poté byla tkáň intenzivně homogenizována ve skleněném homogenizátoru po dobu 1 min. Následně byl homogenát centrifugován (2 100 RPM, 10 min, 4°C, Hettich číslo 1610). Po centrifugaci byl supernatant odebrán do čisté zkumavky a byl uchován na ledu. Pelet byl následně resuspendován ve skleněném homogenizátoru 1 min v roztoku TMES (5 µl TMES /1 mg tkáně) a následně centrifugován (2100 RPM 10 min, 4°C). Vzniklý supernatant byl slit s předchozím supernatantem a převeden do centrifugačních zkumavek (Beckmann). Na přesné vyvážení zkumavek byl použit roztok TMES. Takto připravené zkumavky byly centrifugovány (23 500 RPM, 30 min, 4°C, rotor Ti 50.2, centrifuga Beckman). Cytosolová část (supernatant) byla odebrána do zkumavek a hrubá membránová frakce (pelet) byl resuspendován v roztoku TME v poměru 1:1,5 (viz příloha tabulka č. 1). Všechny vzorky membránové frakce se následně sonifikovaly (Bandelin) a byly rozpipetovány po 200 µl do předem označených mikrozkušavek eppendorf.

## 7.5 Stanovení proteinů

Proteiny byly stanoveny dle Bradfordovy metody. Byla použita 96 jamková destička a připravena kalibrační křivka z hovězího sérového albuminu (BSA) dle následující koncentrační řady připravené v deionizované vodě (0,025  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 1  $\mu\text{l}/\mu\text{g}$ ).

Do prvních šesti jamek bylo napipetováno vždy 10  $\mu\text{l}$  vody a kalibrační křivka byla napipetována z každé koncentrace po 10  $\mu\text{l}$  v tripletech. Každý vzorek cytosolové nebo membránové frakce byl vždy 30x naředěn v  $\text{H}_2\text{O}$  a napipetován opět v tripletu po 10  $\mu\text{l}$ . Nakonec bylo do všech jamek přidáno 250  $\mu\text{l}$  Bradfordova činidla a byla destička 10 minut inkubována při pokojové teplotě. Následně byly proteiny změřeny programem Gen 51.08. Změřená koncentrace byla zpětně přepočítána na koncentrace vzorků (30x vyšší, než změřená koncentrace) a zaevidovány do tabulky v excelu. Vzorky byly pro následnou analýzu uchovány v mrazicím boxu  $-80^\circ\text{C}$ .

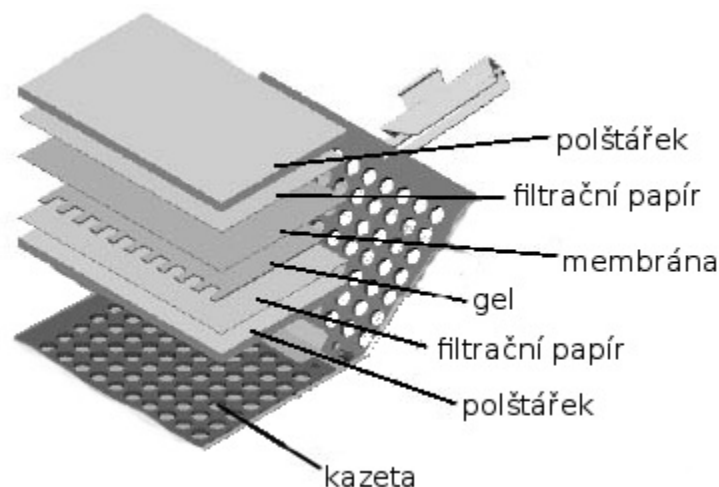
## 7.6 SDS-PAGE elektroforéza

Vzorky byly rozředěny na koncentraci 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  roztoky SLB, DTT a TME (viz příloha tabulka č. 3). Na separaci proteinů byl použit polyakrylamidový 12% separační gel (viz příloha tabulka č. 4) a 5% zaostřovací gel (viz příloha tabulka č. 4). Po sestavení aparatury pro elektroforézu a zalití gelů vnitřním elektrodoým pufrem (viz příloha tabulka č. 5), byly do gelu naneseny vzorky. Pro jednotlivá měření proteinů byly použity zvláště vzorky cytosolové a membránové frakce. Vzorky byly naneseny do gelu v množství 20  $\mu\text{g}$  v 10  $\mu\text{l}$  v případě cytosolové frakce a 15  $\mu\text{g}$  v 7,5  $\mu\text{l}$  v případě membránové dle určeného pořadí (viz příloha tabulka č. 6). Jako kontrolní vzorek byla použita směs vzorků připravených smícháním vzorků z kontrolní skupiny potkanů. Hmotnost sledovaných proteinů byla identifikována pomocí molekulového markeru Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad). Následně byly gely umístěny do nádoby pro elektroforézu a zality vnějším elektrodoým pufrem (viz příloha tabulka č. 5). Elektroforéza probíhala zpravidla za podmínek konstantního napětí 100 V prvních 45 min a následně při 150 V dalších 45 min a konstantního proudu 700 mA při pokojové teplotě.

## 7.7 Western Blotting

Po dokončení elektroforézy a vyjmutí gelů z aparatury byly gely inkubovány v pufru Towbin (viz příloha tabulka č. 7), 15 min. Následně byla sestavena aparatura pro western blotting (viz

obrázek č. 6). Pro blotování byly použity nitrocelulózkové membrány. Blotting probíhal za podmínek konstantního napětí 100 V a proudu mezi 250 a 350 mA 60 min při teplotě 4°C.



Obrázek 5: Schéma sestavení blotovací kazety.

## 7.8 Imunodetekce

Po dokončení western blottingu byly membrány inkubovány v promývacím roztoku TTBS (viz příloha, tabulka č. 8) 15 min. Proteiny na membráně byly poté zablokovány zpravidla 5 % nízkotučným sušeným mlékem rozpuštěným v TTBS 1 h při pokojové teplotě. U protilátky BAX byl použit pouze 3% blok. Poté byly membrány promyty opět v TTBS 15 min. Následně byla primární protilátka (viz příloha, tabulka č. 9) inkubována přes noc při 4°C. Druhý den byly membrány promyty v TTBS 3 x 15 min a poté byla aplikována sekundární protilátka Anti-Rabbit IgG NA934V (viz příloha tabulka č. 9). Nakonec byly membrány osušeny filtračním papírem a bylo na ně nanášeno 400 µl chemiluminiscenční detekční směsi (Thermo Scientific). Proteiny na membráně byly detekovány přístrojem LAS-4000 (Genetica, FujiFilm) a denzitometricky vyhodnoceny programem Quantity One (BioRad).

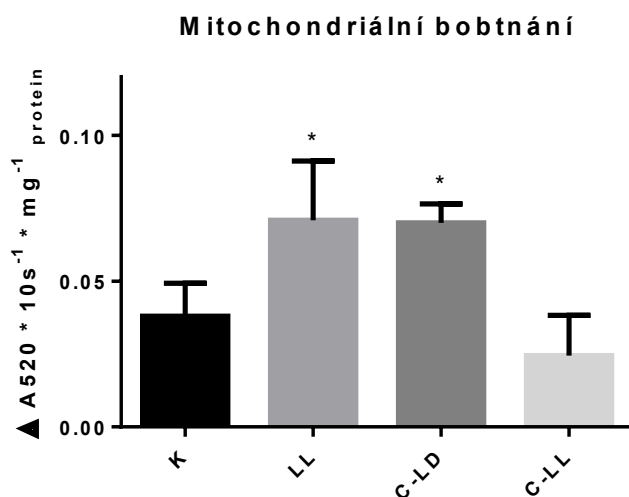
## 7.9 Statistické vyhodnocení

Naměřené hodnoty byly statisticky vyhodnoceny programem GraphPad Prism 7. Ke statistickému zhodnocení byl použit One-way ANOVA multiple comparisons test, hodnoty vyjádřeny v % kontroly (kontrola 100%), hladina významnosti  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ,  $n=5$  a  $n=6$ .

## 8. VÝSLEDKY

### 1) Mitochondriální bobtnání

Mitochondriální bobtnání testuje citlivost izolovaných mitochondrií k přetížení  $\text{Ca}^{2+}$  ionty. Měřili jsme rychlost bobtnání, která je vyjádřena jako změna absorbance za min na proteinu vzorku. Zjistili jsme signifikatně vyšší rychlost bobtnání po třech dnech na stálem světle u skupiny LL o 187% a velmi podobně po třech dnech chladu u skupiny C-LD o 184% ve srovnání s kontrolní skupinou K (viz graf 1). Naopak u u kombinace obou stresoru u skupiny C-LL došlo k návratu ke kontrolní skupině.

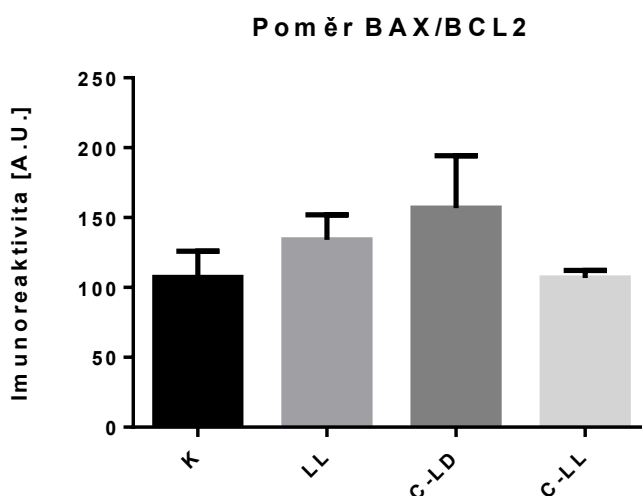


Graf 1: Mitochondriální bobtnání stanovené v levé komoře srdce při koncentraci  $200 \mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  u potkanů vystavených buď stálému světle (LL) nebo stálenému chladu (C-LD) nebo kombinaci obou stresorů (C-LL) po dobu tří dnů. Výsledky byly statisticky hodnoceny vzhledem ke s kontrole (K). \*  $p < 0,05$ . Chybové úsečky představují  $\pm$  SD,  $n = 3$

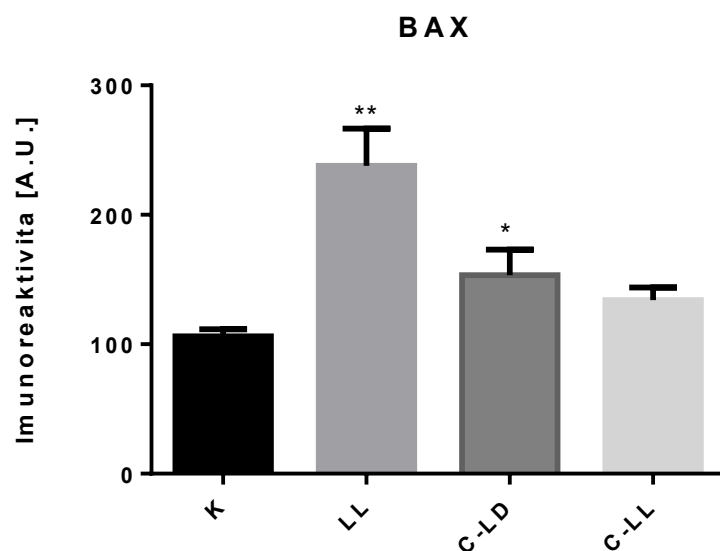


## 2) Efekt 3 denní chladové expozice a osvětlení na expresi apoptotických proteinů

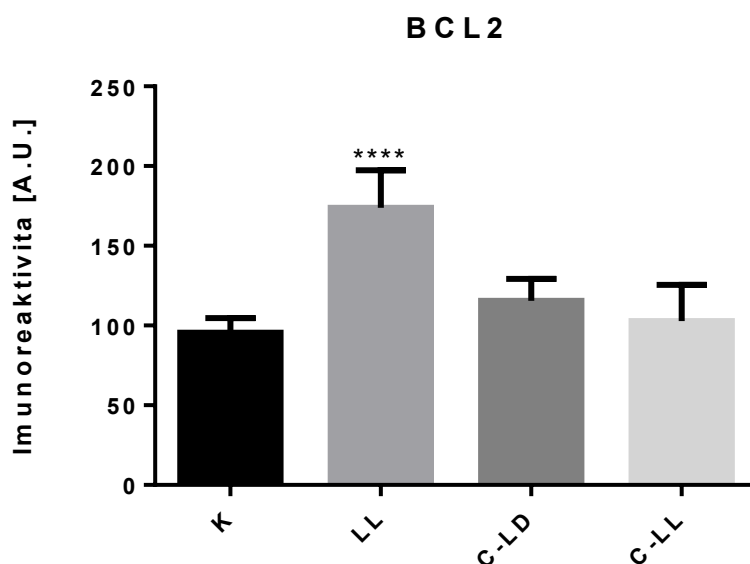
Na základě detrimentálních výsledků bobtnání jsme stanovili expresi apoptotických proteinů BAX, BCL2 a kaspázy 8. K měření byla použita SDS-PAGE elektroforéza a Western Blotting. Graf ukazující tendenci k apoptóze, tedy graf poměru exprese BAX/BCL2, nevykazuje signifikantní odchylky (viz graf 2). Exprese proteinu BAX je signifikantně zvýšena u skupiny LL a skupiny C-LD proti kontrolním skupinám (viz graf 3). U skupiny LL je zvýšení o 132% a u skupiny C-LD o 79%. Dále byl měřen antiapoptotický protein BCL2 (viz graf 4). Jeho signifikantní zvýšení se projevilo u skupiny LL a to o 78%. Podobně jako protein BAX vykazuje kaspáza 8 signifikantní zvýšení u skupiny LL, které je o 92% (viz graf 5). U ostatních skupin nejsou odchylky signifikantní.



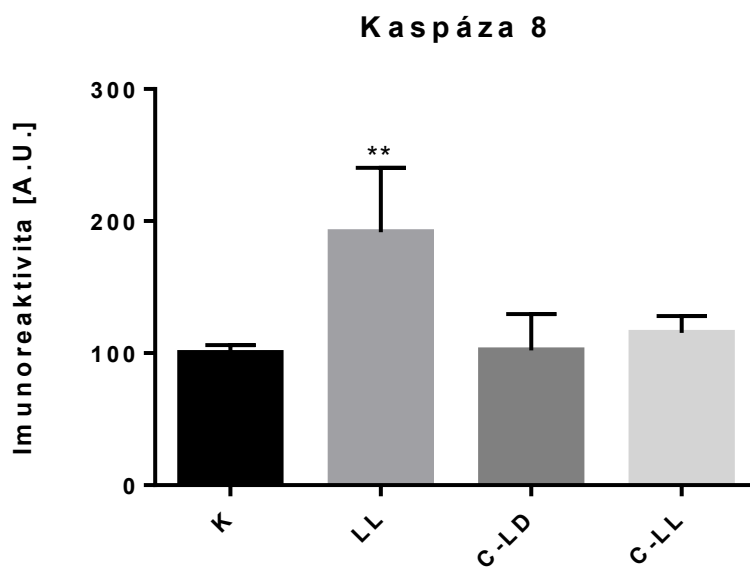
*Graf 2: Poměr exprese apoptotického proteinu BAX a antiapoptického proteinu BCL2 stanovené v levé komoře srdce byly stanoveny u potkanů vystavených buď stálému světlu (LL) nebo stálenému chladu (C-LD) nebo kombinaci obou stresorů (C-LL) po dobu tří dnů. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech kontroly (K = 100%). \*  $p < 0,05$ , chybové úsečky představují  $\pm SD$ ,  $n = 5$ .*



Graf 3: Expze apoptotického proteinu BAX stanovená v levé komoře srdce u potkanů vystavených buď stálému světlu (LL) nebo stálenému chladu (C-LD) nebo kombinaci obou stresorů (C-LL) po dobu tří dnů. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech kontroly (K = 100%). \*  $p < 0,05$ , chybové úsečky představují  $\pm SD$ ,  $n = 6$ .



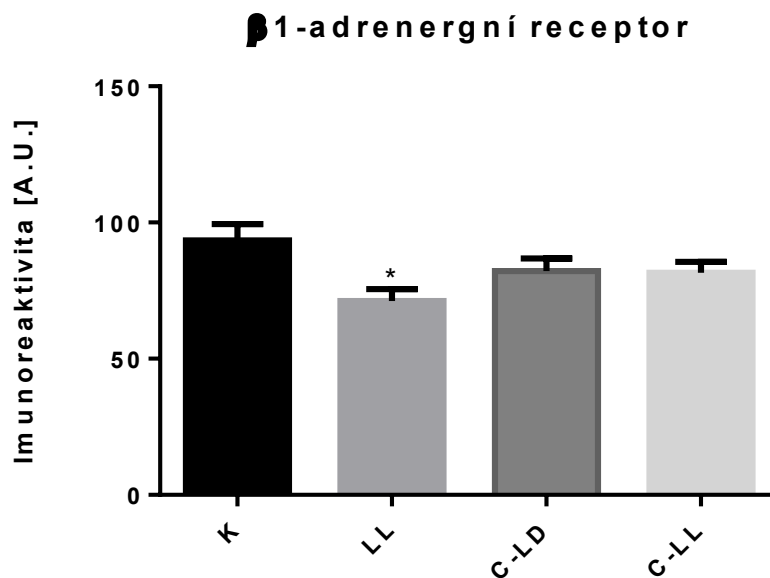
Graf 4: Expze antiapoptotického BCL2 stanovená v levé komoře srdce u potkanů vystavených buď stálému světlu (LL) nebo stálenému chladu (C-LD) nebo kombinaci obou stresorů (C-LL) po dobu tří dnů. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech kontroly (K = 100%). \*  $p < 0,05$ , chybové úsečky představují  $\pm SD$ ,  $n = 6$ .



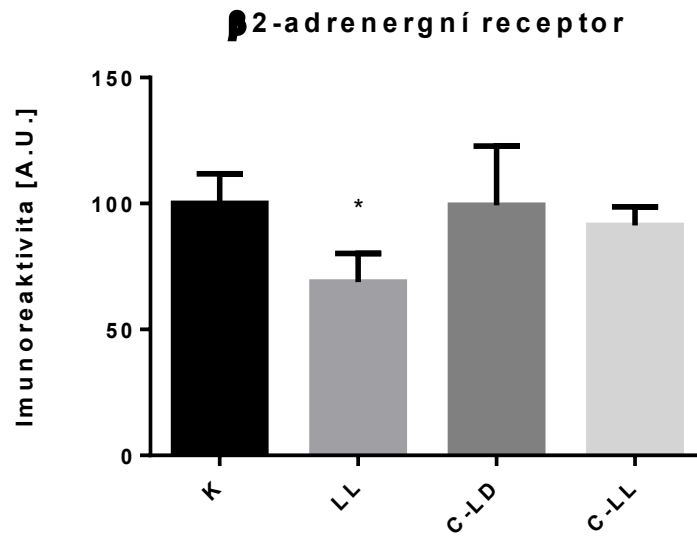
*Graf 5: Expze iniciální kaspázy 8 stanovená v levé komoře srdce u potkanů vystavených buď stálému světlu (LL) nebo stálému chladu (C-LD) nebo kombinaci obou stresorů (C-LL) po dobu tří dnů. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech kontroly (K = 100%). \*  $p < 0,05$ , chybové úsečky představují  $\pm SD$ ,  $n = 6$ .*

### 3) Efekt 3 denní chladové expozice a osvětlení na $\beta$ -adrenergní signalizaci

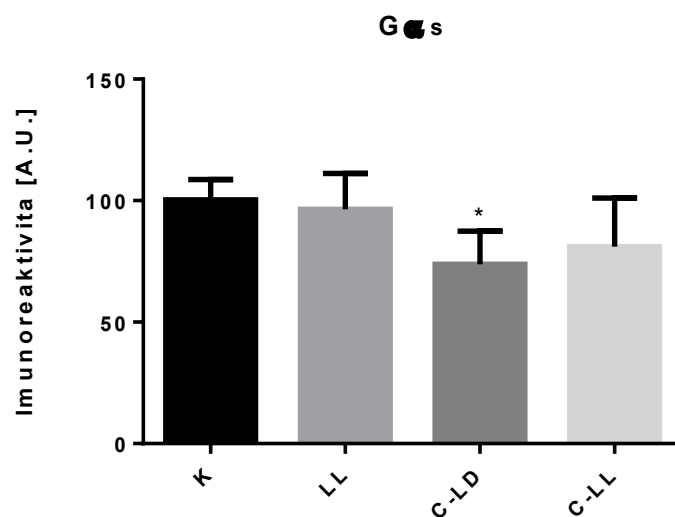
Dále byly stanoveny hladiny  $\beta$ -adrenergních receptorů  $\beta 1$  a  $\beta 2$  a G-proteinů v hrubé membránové frakci. Je zajímavé, že oba  $\beta 1$  a  $\beta 2$  jsou signifikantně sníženy u skupiny LL o 22% (viz graf 6) a o 25% (viz graf 7) v uvedeném pořadí. Expres stimulačního G-proteinu  $G\alpha_s$  je signifikantně snížena u skupiny C-LD o 26% (viz graf 8), zatímco  $G_{i1/2}$  a  $G_{i3}$  podjednotky jsou sníženy u všech exponovaných skupin téměř identicky, kdy u skupiny LL hodnoty poklesly o 44%, u skupiny C-LD o 47% a u skupiny C-LL dokonce o 68% (viz graf 9 a 10).



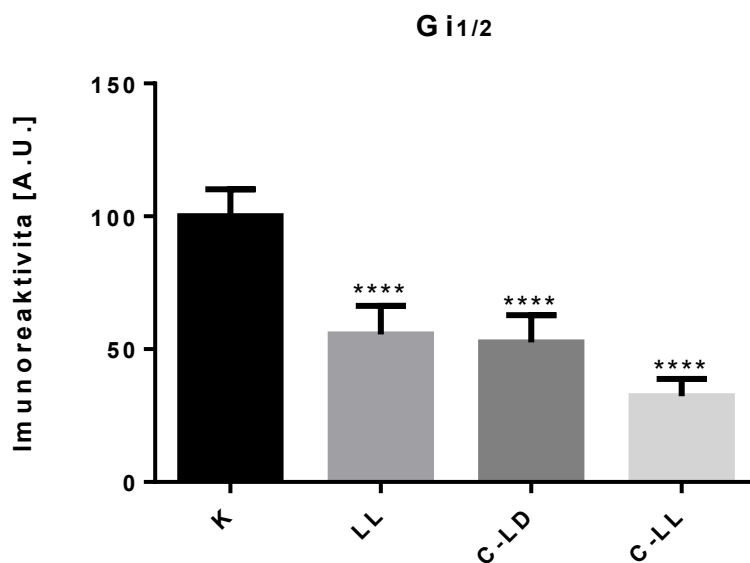
Graf 6: Expres adrenergního receptoru  $\beta 1$  byla stanovena v levé komoře srdce u potkanů vystavených buď stálému světlu (LL) nebo stálému chladu (C-LD) nebo kombinaci obou stresorů (C-LL) po dobu tří dnů. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech kontroly (K = 100%). \*  $p < 0,05$ , chybové úsečky představují  $\pm$  SD,  $n = 6$ .



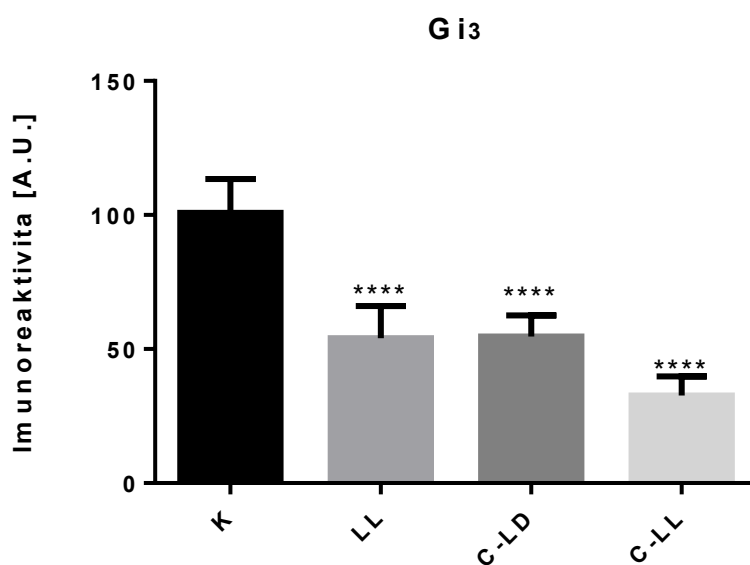
Graf 7: Expres adrenergního receptoru  $\beta_2$  byla stanovena v levé komoře srdce u potkanů vystavených buď stálému světlu (LL) nebo stálému chladu (C-LD) nebo kombinaci obou stresorů (C-LL) po dobu tří dnů. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech kontroly (K = 100%). \*  $p < 0,05$ , chybové úsečky představují  $\pm$  SD,  $n = 6$ .



Graf 8: Expres stimulační podjednotky G<sub>s</sub> byla stanovena v levé komoře u potkanů vystavených buď stálému světlu (LL) nebo stálému chladu (C-LD) nebo kombinaci obou stresorů (C-LL) po dobu tří dnů. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech kontroly (K = 100%). \*  $p < 0,05$ , chybové úsečky představují  $\pm$  SD,  $n = 6$ .



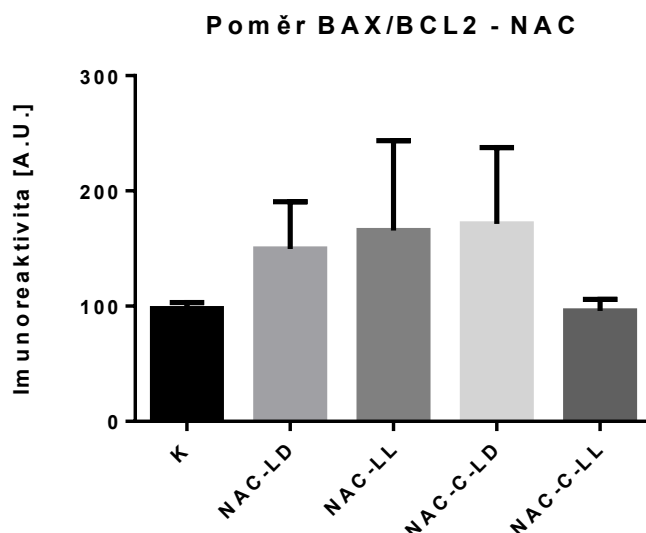
*Graf 9: Expze inhibiční podjednotky  $G_{i1/2}$  byla stanovena v levé komoře u potkanů vystavených buď stálému světlu (LL) nebo stálému chladu (C-LD) nebo kombinaci obou stresorů (C-LL) po dobu tří dnů. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech kontroly (K = 100%). \*  $p < 0,05$ , chybové úsečky představují  $\pm SD$ ,  $n = 6$ .*



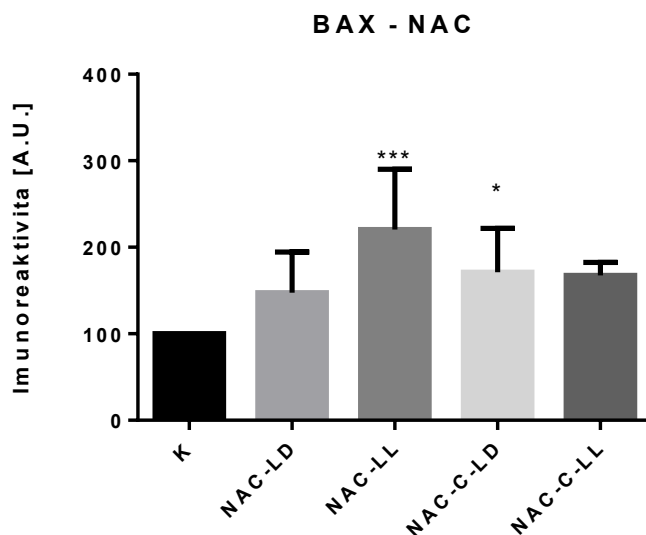
*Graf 10: Expze inhibiční podjednotky  $G_{i3}$  byla stanovena v levé komoře u potkanů vystavených buď stálému světlu (LL) nebo stálému chladu (C-LD) nebo kombinaci obou stresorů (C-LL) po dobu tří dnů. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech kontroly (K = 100%). \*  $p < 0,05$ , chybové úsečky představují  $\pm SD$ ,  $n = 6$ .*

#### **4) Efekt 3 denní chladové expozice a stálému osvětlení po podání N-acetylcysteinu na apoptotické makrery**

Po podání N-Acetylcysteinu způsobilo nesignifikantní avšak nepřehlédnutelný výkyv hodnot poměru hladin proteinů BAX/BCL2 proti intaktní skupině ve směru k proapoptickým tendencím (Graf 11). Tento výkyv a současně velký rozptyl hodnot byl dán převážně změnami v expesi BAX (Graf 12), zatímco u BCL2 byly hodnoty velmi konzistentní. Ani u chladově exponovaných zvířat a zvířat vystavených stálému světlu při podávání N-acetylcysteinu nedošlo k signifikantním změnám vzhledem k velkému rozptylu naměřených hodnot. Naproti tomu kombinace obou stresorů při podání N-acetylcysteinu vedla k návratu hodnot na úroveň intaktní skupiny a naměřené hodnoty nabyly opět velmi konzistentní rozložení. Hladiny proteinů BAX a kaspázy 8 významně vzrostly u skupiny stálého světla LL - o 120% a 64 % v uvedeném pořadí (Graf 13 a 14). Po expozici samotnému chladu zůstaly též hodnoty BAX významně zvýšeny C-LD o 91% (viz graf 12) a N-acetylcystein tedy neprokázal žádný vliv. Nicméně nelze opomněout, že podání N-acetylcysteinu značně zvýšilo rozptyl hodnot u intaktní skupiny a u skupin, které byly exponované jednomu stresoru. Je zajímavé, že antiapoptotický protein BCL2 je signifikantně zvýšen pouze u skupiny C-LL až o 73% (viz graf 13).

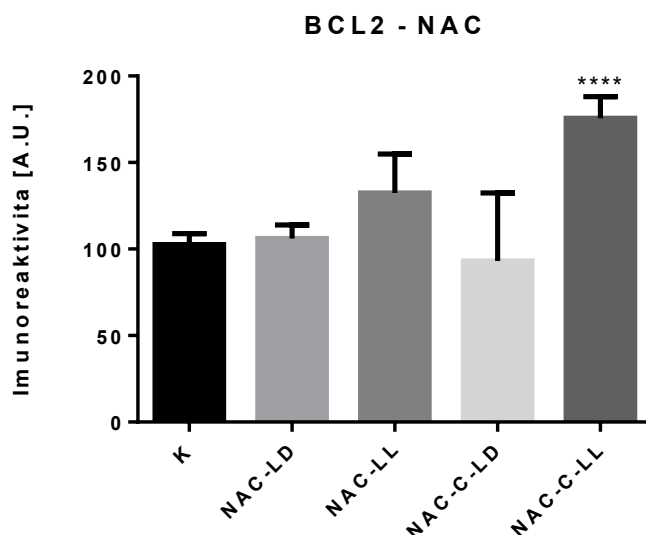


Graf 11: Poměr exprese apoptotického proteinu BAX a antiapoptického proteinu BCL2. K = kontrolní skupina, NAC-LL = osvětlená skupina ovlivněná N-acetylcysteinem, C-LD = chladová skupina ovlivněná N-acetylcysteinem, C-LL = chladová a osvětlená skupina ovlivněná N-acetylcysteinem. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech kontroly (K = 100%). \*  $p < 0,05$ , chybové úsečky představují  $\pm SD$ ,  $n = 6$ .

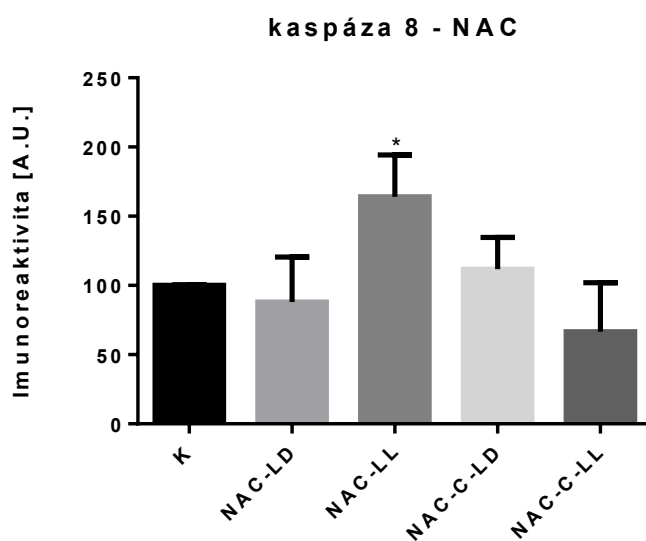


Graf 12: Expresa apoptotického proteinu BAX. K = kontrolní skupina, NAC-LL = osvětlená skupina ovlivněná N-acetylcysteinem, C-LD = chladová skupina ovlivněná N-acetylcysteinem, C-LL = chladová a osvětlená skupina ovlivněná N-acetylcysteinem. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech kontroly (K = 100%). \*  $p < 0,05$ , chybové úsečky představují  $\pm SD$ ,  $n = 6$ .





Graf 13: Expres apoptotického proteinu BAX. K = kontrolní skupina, NAC-LL = osvětlená skupina ovlivněná N-acetylcysteinem, C-LD = chladová skupina ovlivněná N-acetylcysteinem, C-LL = chladová a osvětlená skupina ovlivněná N-acetylcysteinem. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech kontroly (K = 100%). \*  $p < 0,05$ , chybové úsečky představují  $\pm$  SD,  $n = 6$ .



Graf 14: Expres iniciační kaspázy 8.. K = kontrolní skupina, NAC-LL = osvětlená skupina ovlivněná N-acetylcysteinem, C-LD = chladová skupina ovlivněná N-acetylcysteinem, C-LL = chladová a osvětlená skupina ovlivněná N-acetylcysteinem. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech kontroly (K = 100%). \*  $p < 0,05$ , chybové úsečky představují  $\pm$  SD,  $n = 6$ .

## 9. DISKUZE

Tato práce měla za cíl stanovit míru apoptózy a  $\beta$ -adrenergní signalizaci u skupin potkanů ovlivněných stresovými faktory – akutním chladem (3 dny) a stálým světlem (3 dny). Potkani tvořili celkem 4 experimentální skupiny z nichž jednu kontrolní (K) a zbylé 3 vystavené světelnému a chladovému stresu (LL, C-LD a C-LL). Nejprve bylo naší laboratoří změřeno mitochondriální bobtnání. Jak je již uvedeno v kapitole o apoptóze, zvýšená citlivost mitochondrií k přetížení vápníkem zvyšuje pravděpodobnost aktivace apoptózy a tak degradaci kardiomyocytů (Lisa et al., 2001). Zjistili jsme, že nejvyšší rychlost mitochondriálního bobtnání je u skupiny potkanů vystavených stálému světlu nebo akutnímu chladu. Graf bobtnání naznačuje podobnost vlivu těchto stresových faktorů na citlivost mitochondrií k přetížení vápníkem což může vést k snížení prahu aktivace apoptózy v kardiomyocytu (graf 1). Zajímavost tohoto výsledku však spočívá v poklesu bobtnání u skupiny potkanů vystavených oběma stresovým faktorům zároveň. Zde vidíme pokles hodnot, které se podobají hodnotám kontrolní skupiny. Jsou známé škodlivé účinky akutní chladové expozice na srdeční funkci, které mohou vést k srdečním onemocněním jako je ischemická choroba srdeční (Sheth et al. 1999), ateroskleróza (Lin et al. 2017) a srdeční hypertenze (Hirai et al., 2015). Současně je známo, že narušení cirkadiálních rytmů má detrimentalní účinek na kardiomyocyty vedoucí u lidí k obdobným typům onemocnění - srdeční hypertenze (Yamasaki et al., 1998), srdeční selhání (Martino et al., 2007). V naší studii byl však prokázán synergický efekt kombinace stálého světla a stálého chladu na potkanech, který vedl k potlačení individuálních detrimentalních účinku chladu a světla. Na základě překvapivého zjištění jsme se dále zabývali expresí proapoptotického proteinu BAX (Suzuki et al., 2000), iniciační CASP8 (Kominami et al., 2012) a antiapoptotického proteinu BCL2 (Bruey et al., 2007).

Při měření exprese apoptotického proteinu BAX došlo k nejvyššímu zvýšení u skupiny potkanů vystavených pouze stálému světlu a to o 132%. V souladu s tímto trendem je zvýšena i iniciační kaspáza 8 a to o 92%. V případě, že jsou potkani vystaveni stálému světlu dochází k narušení cirkadiálních rytmů a tím k desynchronizaci melatoninu. O melatoninu je dobře známo, že potlačuje proapoptotický BAX a zvyšuje antiapoptotický BCL2, takže má silné antiapoptotické účinky (Zhao et al., 2016). V rámci našeho měření exprese BCL2 proteinu došlo opět k signifikantnímu zvýšení u skupiny LL a to o 78%. Z tohoto pohledu by se mohlo zdát, že 3 dny stálého světla úplně nepotlačují produkci melatoninu, ale desynchronizují jeho

působení, a tak na úrovni srdce dochází ke kompenzační odpovědi na zvýšení BAX a tím i zvýšení BCL2, o čemž vypovídá i graf poměru BAX/BCL2. Tento homeostatický mechanismus v literatuře není popsán. Tři denní chladová expozice ještě signifikantně zvyšuje BAX, ale pouze o 79% a na úrovni BCL2 už nedochází k signifikantnímu zvýšení, pouze je zde tendence. Zvýšená exprese proapoptického proteinu BAXu během chladové expozice je již dobře známa z předešlých studií, kde byla exprese měřena na myším modelu. V této studii byly myši pravidelně umisťovány na 4 h denně do místnosti o teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$  po dobu jednoho a dvou týdnů. Výsledky studie ukazují signifikantní zvýšení BAXu po jednom i po dvou týdnech (Cong et al., 2018). Náš výsledek je tedy v souladu s touto studií, avšak je možné, že k aktivaci apoptózy přesto nedochází, protože exprese CASP8 odpovídá kontrolní skupině. Nesignifikantně zvýšený apoptotický účinek opět ukazuje graf poměru BAX/BCL2. Je nutno podotknout, že potkani byli chováni po 2 v podestlaných klecích. Zde tedy mohlo dojít k vzájemnému zahřívání mezi potkany a potlačení tak škodlivých účinků chladové expozice. Stresově nejvíce zatíženou skupinou naší studie byly potkani vystavení chladu i světlu. V případě proapoptického BAX i antiapoptického BCL2 je exprese obou proteinů srovnatelná s kontrolní skupinou. Tento výsledek ukazuje, že tendence ke zvýšení apoptotického účinku obou stresorů není zahájena. V literatuře synergický efekt kombinace chladové a světelné expozice není popsán. Překvapivý fakt je v souladu s grafem bobtnání, kde tento výsledek koresponduje s výsledkem mitochondriálního bobtnání, který dále naznačuje potlačení detrimetálních vlivů synergickou kombinací obou stresových faktorů a tak snížení prahu apoptotického účinku.

Dále jsme se zabývali studiem  $\beta$ -adrenergní signalizace. Pomocí metody Western blot byla změřena relativní exprese receptorů  $\beta_1$  a  $\beta_2$ . Zjistili jsme, že  $\beta_1$  je signifikantně snížen u skupiny LL o 22% a  $\beta_2$  o 25%. Dále byla regulace měřena na úrovni G-proteinů. Zde dochází k signifikantnímu snížení obou měřených inhibičních podjednotek. V případě exprese  $G_{i1/2}$  je snížení u skupiny LL o 44% (viz graf 9) a u  $G_{i3}$  o 47% (viz graf 10). Měřena byla i stimulační podjednotka, zde však nedochází k signifikantní odchylce (viz graf 8). Zde tedy pravděpodobně dochází ke kompenzačnímu efektu snížené exprese  $\beta$ -adrenergních receptorů snížením exprese inhibičních podjednotek. Studium účinku melatoninu na  $\beta$ -adrenergní signalizaci se zabývá velmi málo prací. Polská studie se zabývá účinkem melatoninu na krevní tlak (Rechciński et al., 2006). Do experimentu byli zahrnuti pacienti s ischemickou chorobou srdeční a srdeční hypertenzí během spánku. Pacientům bylo podáváno 5 mg melatoninu před spaním. Efekt melatoninu měl způsobit snížení krevního tlaku během spánkové fáze. Výsledky této studie jsou však rozporuplné. Ke snížení krevního tlaku během spánkové fáze po podání melatoninu

došlo u 1/3 pacientů, ke zvýšení došlo u 23% pacientů. Avšak existuje řada studií, které se zabývají narušením cirkadiánních rytmů a jejich negativního dopadu na srdeční funkce (Martino et al., 2007). Z námi změřených výsledků by se dalo usuzovat, že narušením cirkadiánních rytmů došlo ke zvýšené aktivitě  $\beta$ -adrenergní signalizace snížením exprese G-inhibičních podjednotek. Dále byla měřena  $\beta$ -adrenergní signalizace u chladově exponovaných potkanů. Na úrovni receptorů nedošlo k signifikantním změnám. Na úrovni G-proteinové signalizace došlo k signifikantnímu snížení  $G\alpha_s$  (26%) i obou inhibičních podjednotek –  $G_{i1/2}$  (47%) a  $G_{i3}$  (46%). O extrémní chladové expozici je dobře známo, že má detrimentalní účinky na srdeční funkci. Studie se nejčastěji zabývají vlivem extrémního chladu na lidské srdce. Je potvrzeno, že v zimním období dochází ke zvýšené sekreci katecholaminů (Brodde et al., 1976), zvýšeného cholesterolu (Whaley et al., 1987) a dochází ke zvýšené frekvenci infarktu myokardu (Sheth et al., 1999). Další studie na lidech ukazuje, že během chladové expozice dochází k modulaci až desenzitizaci  $\beta_1$  a  $\beta_2$  adrenergního receptoru (Janský et al., 2008). Vliv akutního chladu na  $\beta$ -adrenergní signalizaci byl studován i na potkaním modelu. Na myším transgenním modelu byl zkoumán knockout  $\beta_1$  receptoru v hnědé tukové tkáni. V případě, že byly myši vystaveny chladu (místnost 4°C po dobu 3h) došlo k hypotermii. Z této studie vyplývá, že stimulací  $\beta_1$  dochází k produkci tepla. Ačkoliv u našeho modelu ke zvýšené expresi  $\beta$ -adrenergních receptorů nedošlo, došlo ke snížené expresi inhibičních podjednotek a tím ke snížení inhibice celé dráhy. Zde je opět nutno připomenout, že byli potkani v podestlaných klecích po dvou, takže chladová expozice nemusela mít na potkany extrémní dopad. Nejvíce zatíženou skupinou byla opět skupina exponovaná stálému chladu a světlu. Tato skupina vykazovala opět sníženou expresi G-proteinových inhibičních podjednotek ( $G_{i1/2}$  o 68% a  $G_{i3}$  též o 68%). Aktivační podjednotka ani exprese receptorů nejsou od kontrolní skupiny odchýleny. Zde pravděpodobně dochází opět ke kompenzačnímu vlivu chladové expozice na snížení počtu  $\beta$ -adrenergních receptorů, a tak vyšší možnosti tvorby tepla. K tomuto ještě přispívá světelná expozice, která stimuluje aktivitu sympatiku v případě jasného denního světla (Scho et al., 1997).

Poslední část experimentu zahrnovala 4 experimentální skupiny vystavené stejným podmínkám jako předešlé skupiny s tím rozdílem, že byl potkanům podáván antioxidant N-acetylcystein. Antioxidant byl aplikován intraperitoneálně jednou denně ráno vždy ve stejnou hodinu. Odběr srdce se konal v době, kdy měla být podána další dávka antioxidantu. Po podání N-acetylcysteinu však opět došlo k signifikantnímu zvýšení proapoptotického proteinu BAX u skupiny LL o 120% podobně jako u LL bez NAC. Tudíž NAC nezabránil zvýšené expresi BAX u světlem exponované skupiny. Výsledek potvrzuje i zvýšená exprese CASP8 (64%). BCL2

není signifikantně zvýšen, je zde pouze jeho tendence. Sklon k apoptóze však není signifikantní o čemž vypovídá poměr BAX/BCL2. U skupiny chladově exponovaných potkanů, kterým byl zároveň podáván N-acetylcystein došlo k signifikantnímu zvýšení pouze proapoptického BAX (o 120%), což opět koresponduje s výsledkem relativní exprese BAX bez antioxidantu (79%), dokonce tato hodnota byla překročena. Na úrovni kaspázy mírné zvýšení už není signifikantní. Expresse BCL2 se neliší od kontrolní skupiny stejně jako u skupiny potkanů, kterým N-acetylcystein nebyl podáván. Výsledný graf apoptózy (graf 11) však signifikantní zvýšení nepotvrzuje. Hypoteticky nejvíce zatížená skupina vystavená oběma stresorům a zároveň ovlivněná N-Acetylcysteinem ukazuje překvapivě signifikantní změnu v expresi proteinu BCL2 a to navýšení o 73%. U stejné skupiny bez N-acetylcysteinu jeho exprese zvýšena není. Naproti tomu, kontrolní skupina po podání N-acetylcysteinu vykazuje nesignifikantní nárůst exprese BAX. O N-acetylcysteinu je dobře znám jeho antioxidační efekt, který je realizován přes glutathionový systém (Carlsten et al., 2018). Pokud je zabráněno tvorbě RNS a ROS měla by být snížena i aktivace apoptotického účinku. Další studie mluví o antiapoptotickém efektu N-acetylcysteinu na kardiomyocytárních buňkách získaných ze srdce potkana, kdy došlo k snížené expresi BAXu a zvýšené expresi BCL2 u buněk vystavených hypoxickému prostředí (Zhang et al., 2009). Na druhé straně je známo, že mírný oxidativní stres stimuluje kardioprotektivní účinky a podání N-acetylcysteinu snížilo protektivní efekt hypoxie (Balková et al., 2011). Nicméně podání N-acetylcysteinu snižuje riziko vzniku srdeční hypertrofie a ischemicko-reperfúzního poškození (Su et al., 2016). Benefiční účinek N-acetylcysteinu se v naší studii překvapivě nepotvrdil, což naznačuje, že patrně na tomto modelu není zhoršené bobtnání mitochondrií spojeno s oxidativním stresem, ale s jinými mechanismem.

## 10. ZÁVĚR

Potkani byly vystaveni dvěma stresorům trvalému světlu po tři dny a chladu ( $6^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) a kombinaci těchto faktorů. Na základě zajímavého zjištění, že citlivost mitochondrií se prohlubuje působením jednotlivých stresorů a jejich kombinace tento detrimentalní účinek ruší, jsme se rozhodli stanovit markery apoptózy a míru aktivace adrenergního systému. Výsledky ukázaly významný nárůst exprese proteinu BAX a BCL2 po 3 dnech stálého světla a stálý chlad zvýšil pouze BCL2. Je zde patrná snaha antiapoptotického BCL2 apoptóze zabránit u expozice stálému světlu. Nicméně poměr BAX/BCL2 nedosáhl significance ani v jedné skupině. Je důležité zdůraznit, že aktivační kaspáza 8 byla významně zvýšena u skupiny stálého světla. Efekt chladu byl pravděpodobně zmírněn chováním potkanů ve dvojicích a podestýlkou, což umožnilo zahřívání. Synergický efekt stálého světla a chladu vedl opět ke zmírnění detrimentalních účinků, stejně jako u mitochondriálního bobtnání.

Na úrovni  $\beta$ -adrenergní signalizace došlo k mírnému potlačení exprese receptorů u skupiny vystavené stálému světlu. Zde však dochází k potlačení inhibičních podjednotek u všech skupin vystavených stresu, což nasvědčuje o kompenzaci možného útlumu. Ve druhé části práce jsme vyvrátily hypotézu, kdy jsme předpokládali, že detrimentalní efekt akutního chladu a stálého světla souvisí s oxidativním stresem, neboť podání N-Acetyl cysteinu nevyvolalo podstatné změny.

Tato práce přinesla zcela nové a originální výsledky, které otevřely mnoho dalších otázek týkajících se působení dvou stresorů na srdce potkana a úlohy oxidativního stresu v těchto procesech.

## 11. SEZNAM LITERATURY

- Antwerp, D. J. Van, Martin, S. J., Kafri, T., Green, D. R., Verma, I. M., Antwerp, D. J. Van, Verma, I. M. (1996). Suppression of TNF- $\alpha$ -Induced Apoptosis by NF- $\kappa$ B. *Science*, 274(5288), 787–789.
- Bae, S., Siu, P. M., Choudhury, S., Ke, Q., Choi, J. H., Koh, Y. Y., & Kang, P. M. (2010). Delayed activation of caspase-independent apoptosis during heart failure in transgenic mice overexpressing caspase inhibitor CrmA. *American Journal of Physiology*, 299(5).
- Bahi, N., Zhang, J., Llovera, M., Ballester, M., Comella, J. X., & Sanchis, D. (2006). Switch from Caspase-dependent to Caspase-independent Death during Heart Development. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(32), 22943–22952.
- Balakumar, P., & Singh, M. (2006). Anti-Tumour Necrosis Factor-  $\alpha$  Therapy in Heart Failure. *Basic Clinical Pharmacology and Toxicology*, 391–397.
- Balková, P., Ková, M. H. Č., Milerová, M., Necká, J. Ř., & Kolář, F. (2011). N - acetylcysteine Treatment Prevents the Up-Regulation of MnSOD in Chronically Hypoxic Rat Hearts, 8408, 467–474.
- Banner, D. W., Alian, D., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H., Broger, C., ... Limited, F. H. R. (1993). Crystal Structure of the Soluble Human Implications for TNF Receptor Activation. *Cell Press*, 73, 431–445.
- Bassani, J. W. M., Bassani, R. A., & Bers, D. M. (1994). Relaxation in rabbit and rat cardiac cells : species-dependent differences in cellular mechanisms, 279–293.
- Bjarnadóttir, T. K., Gloriam, D. E., Hellstrand, S. H., Kristiansson, H., Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2006). Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics*, 88(3), 263–273.
- Borner, C., Martinou, I., Mattmann, C., Irmeler, M., & Schaefer, E. (1994). The Protein bcl-2a Does Not Require Membrane Attachment, but Two Conserved Domains to Suppress Apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 126(4), 1059–1068.
- Bozkurt, B., Torre-amione, G., Warren, M. S., Whitmore, J., Soran, O. Z., Feldman, A. M., & Mann, D. L. (2002). Results of Targeted Anti – Tumor Necrosis Factor Therapy With Etanercept ( ENBREL ) in Patients With Advanced Heart Failure. *Circulation*, 103(8), 1044–1047.
- Bray, M. S., Shaw, C. A., Moore, M. W. S., Garcia, R. A. P., Zanquetta, M. M., Durgan, D. J., ... Young, M. E. (2018). Disruption of the circadian clock within the cardiomyocyte influences myocardial contractile function , metabolism , and gene expression, 77030, 1036–1047.
- Brennan, P. J., Greenberg, G., Miall, W. E., & Thompson, S. G. (1982). Seasonal variation in arterial blood. *British Medical Journal*, 285(October), 919–923.

- Brodde, O., Huvermann, K., & Schümann, H. J. (1976). Influence of cold exposure on the activities of soluble and membrane-bound dopamine beta-hydroxylase in rat heart vesicles. *Journal of Neurochemistry*, 27, 433–438.
- Bruey, J., Bruey-sedano, N., Luciano, F., Zhai, D., Balpai, R., Xu, C., Reed, J. C. (2007). Bcl-2 and Bcl-X L Regulate Proinflammatory Caspase-1 Activation by Interaction with NALP1. *Cell Press*, 129(1), 45–56.
- Campos, L. M. G., Cruz-rizzolo, R. J., Watanabe, I., Pinato, L., & Nogueira, M. I. (2014). Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus based on the distribution of vasoactive intestinal peptide (VIP) and arginine vasopressin (AVP) immunoreactive fibers in the hypothalamus of *Sapajus apella*. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 57–58, 42–53.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., ... Reed, J. C. (2012). Regulation of Cell Death Protease Caspase-9 by Phosphorylation. *Science*, 1318(1998).
- Cardoso, S., Santos, R. X., Correia, S. C., Carvalho, C., Santos, M. S., Baldeiras, I., ... Moreira, P. I. (2013). Insulin-induced recurrent hypoglycemia exacerbates diabetic brain mitochondrial dysfunction and oxidative imbalance. *Neurobiology of Disease*, 49, 1–12.
- Carlsten, C., Macnutt, M. J., Zhang, Z., Sava, F., & Pui, M. M. (2018). Anti-Oxidant N-Acetylcysteine Diminishes Diesel Exhaust-Induced Increased Airway Responsiveness in Person with Airway Hyper-Reactivity. *Toxicological Science*, 139(July), 479–487.
- Cassis, L. A. (1993). Role of angiotensin II in brown adipose thermogenesis during cold acclimation. *American Journal of Physiology*, 265(6), 860–865.
- Clapham, D. E., & Neer, E. J. (1993). New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature*, 365.
- Cong, P., Liu, Y., Liu, N., Zhang, Y., Tong, C., Shi, L., Liu, Y. (2018). Cold exposure induced oxidative stress and apoptosis in the myocardium by inhibiting the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Cardiovascular Disorders*, 18(1), 1–8.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., & Greenberg, M. E. (1997). Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell Press*, 91(2), 231–241.
- Daugas, E., Susin, S. A., Zamzami, N., & Ferri, K. F. (2000). Mitochondrial-to-nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in cardiac myocytes during oxidant stress: potential role of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *The FASEB Journal*, 14(5), 729–739.
- Debono, M., Ghobadi, C., Rostami-hodjegan, A., Huatan, H., Campbell, M. J., Newell-price, J., ... Ross, R. J. (2009). Modified-Release Hydrocortisone to Provide Circadian Cortisol Profiles. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(5), 1548–1554.
- Dick, J. E., Tseng, D., & Weissman, I. L. (2010).  $\beta_2$ -Adrenergic Receptor Redistribution in Heart Failure Changes cAMP Compartmentation, 327(March), 1653–1658.



- Dizayee, S., Kaestner, S., Kuck, F., Hein, P., Klein, C., Piekorz, R. P., & Herzig, S. (2011). G<sub>a</sub>i<sub>2</sub>- and G<sub>a</sub>i<sub>3</sub>-Specific Regulation of Voltage-Dependent L-Type Calcium Channels in Cardiomyocytes, *6*(9).
- Djordjevcic, J., Cvijic, G., & Davidovic, V. (2003). Different Activation of ACTH and Corticosterone Release in Response to Various Stressors in Rats. *Physiological Research*, *52*, 67–72.
- Drahota, Z., Endlicher, R., Sta, P., Rychtrmoc, D., Milerová, M., & Zuzana, Č. (2012). Characterization of calcium, phosphate and peroxide interactions in activation of mitochondrial swelling using derivative of the swelling curves. *Journal of Bioenergetics and Biomembrane*, *44*(3), 309–315.
- Eredm, Z., Kil, B., Lujza, R., Tudom, B., & Laurian, T. (2010). Epidermal growth factor regulates adenylate cyclase activity via G<sub>s</sub> and G<sub>i</sub> 1–2 proteins in pancreatic acinar membranes, *91*, 233–246.
- Ferrari, R., Bachetti, T., Confortini, R., Opasich, C., Febo, O., Corti, A., ... Visioli, O. (1995). Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure..pdf. *Circulation*, *92*, 1479–1486.
- Fracp, J. J. B., Fracp, P. C. W., Mph, J. B. B., Ba, J. R. D., Mibiol, J. E., & Frcpath, J. A. (2001). Melatonin in Older People with Age-Related Sleep Maintenance Problems : A Comparison with Age Matched Normal Sleepers. *Sleep*, *24*(4).
- Frank, M., Lohse, M. J., & Bu, M. (2003). G<sub>i</sub> protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation, *100*(26).
- Fregly, M., Kikta, D., Threatte, R., Torres, J., & Barney, C. (1989). Development of hypertension in rats during chronic exposure to cold. *Journal of Applied Physiology*, *66*(2), 741–749.
- Frost, L., Johnsen, S. P., Pedersen, L., Husted, S., Engholm, G., Sørensen, H. T., ... Rothman, K. J. (2018). Seasonal Variation in Hospital Discharge Diagnosis of Atrial Fibrillation : A Population-Based Study Atrial fibrillation is the most common cardiac, *13*(2), 211–215.
- Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D., & Marec, H. Le. (1996). Functional  $\beta_3$ -Adrenoceptor in the Human Heart, *98*(2), 556–562.
- George, N. M., Evans, J. J. D., & Luo, X. (2007). A three-helix homo-oligomerization domain containing BH3 and BH1 is responsible for the apoptotic activity of Bax. *Genes Development*, 1937–1948.
- Gollasch, M., Kleuss, C., Hescheler, J., Wittigt, B., & Schultz, G. (1993). G<sub>i</sub>2 and protein kinase C are required for thyrotropin-releasing hormone-induced stimulation of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in rat pituitary GH3 cells, *90*(July), 6265–6269.

- González, D., Bejarano, I., Barriga, C., Rodríguez, A. B., & Pariente, J. A. (2010). Oxidative Stress-Induced Caspases are Regulated in Human Myeloid HL-60 Cells by Calcium Signal. *Current Signal Transduction Therapy*, 5(2), 181–186.
- Griffiths, G. J., Dubrez, L., Morgan, C. P., Jones, N. A., Whitehouse, J., Corfe, B. M., ... Hickman, J. A. (1999). Cell Damage-induced Conformational Changes of the Pro-Apoptotic Protein Bak In Vivo Precede the Onset of Apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 144(5), 903–914.
- Guo-zhu, H., Si-jun, Y., Wexi-xu, H., Zhu, W., Dan, H., & Li.Feng, Z. (2016). Effect of cold stress on immunity in rats, 33–42.
- Gustafsson, Å. B., Tsai, J. G., Logue, S. E., Crow, M. T., & Gottlieb, R. A. (2004). Apoptosis Repressor with Caspase Recruitment Domain Protects against Cell Death by Interfering with Bax Activation \*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(20), 21233–21238.
- Hawkins, C. J., Yoo, S. J., Peterson, E. P., Wang, S. L., Vernooy, S. Y., & Hay, B. A. (2000). The Drosophila caspase DRONC is a glutamate/aspartate protease whose activity is regulated by DIAP1, HID and GRIM. *Journal of Biological Chemistry*.
- Heinroth-hoffmann, I., & Brodde, O. (2006). Agonist-specific activation of the b 2 -adrenoceptor / G s -protein and b 2 -adrenoceptor / G i -protein pathway in adult rat ventricular cardiomyocytes. *British Journal of Pharmacology*, 147, 714–719.
- Hippe, H. J., Lüdde, M., Schnoes, K., Novakovic, A., Lutz, S., Katus, H. A., ... Wieland, T. (2013). Competition for Gβγ dimers mediates a specific cross-talk between stimulatory and inhibitory G protein α subunits of the adenylyl cyclase in cardiomyocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 386(6), 459–469.
- Hirai, M., Kato, M., Kinugasa, Y., Sugihara, S., Yanagihara, K., Yamada, K., ... Yamamoto, K. (2015). Clinical Scenario 1 Is Associated With Winter Onset of Acute Heart Failure, 79(January).
- Hirata, B. H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., ... Sasada, M. (1998). Caspases Are Activated in a Branched Protease Cascade and Control Distinct Downstream Processes in Fas-induced. *Journal of Experimental Medicine*, 187(4).
- Horowitz, J. D., Ph, D., Henry, C. A., Sc, B., Syrjanen, M. L., Sc, B., ... Antman, E. M. (1988). Combined use of nitroglycerin and N-acetylcysteine in the management of unstable angina pectoris. *Circulation*, 77(4).
- Hu, K., Ivanov, P. C., Hilton, M. F., Chen, Z., Ayers, R. T., Stanley, H. E., & Shea, S. A. (2004). Endogenous circadian rhythm in an index of cardiac vulnerability independent of changes in behavior, 101(52).
- Hunter, D. R., & Haworth, R. A. (1979). The Ca<sup>2+</sup> -Induced Membrane in Mitochondria Mitochondria can couple respiration or hydrolysis of ATP to the uptake of Ca<sup>2+</sup> ( 1-3 ). Once inside the mitochondria , the, 195(2), 468–477.

- Chung, E. S., Packer, M., Lo, H. K., Fasanmade, A. A., & Willerson, J. (2003). Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Pilot Trial of Infliximab, a Chimeric Monoclonal Antibody to Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , in Patients With Moderate-to-Severe Heart Failure. *Circulation*, *107*, 3133–3140.
- Janský, L., Vybíral, S., Truba, M., & Okrouhlík, J. (2008). Modulation of adrenergic receptors and adrenergic functions in cold adapted humans, 131–135.
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y. J., ... Zu, J. C. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Science*, *29*(410), 549–554.
- Kanosue, K., & Crawshaw, L. I. (2010). Concepts to utilize in describing thermoregulation and neurophysiological evidence for how the system works, 5–11.
- Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E., & Poirier, G. G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Research*, *53*(17).
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: Basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.
- Kiuchi, K., Shannon, R. P., Komamura, K., Cohen, D. J., Bianchi, C., Homey, C. J., ... Vatnerl, D. E. (1993). Myocardial Beta-Adrenergic Receptor Function during the Development of Pacing-induced Heart Failure, *9*(March), 907–914.
- Kohout, T. A., Takaoka, H., Mcdonald, P. H., Perry, S. J., Mao, L., Lefkowitz, R. J., & Rockman, H. A. (2001). Augmentation of Cardiac Contractility Mediated by the Human  $\beta$ -3-Adrenergic Receptor Overexpressed in the Hearts of Transgenic Mice.
- Kominami, K., Nakabayashi, J., Nagai, T., Tsujimura, Y., & Chiba, K. (2012). The molecular mechanism of apoptosis upon caspase-8 activation: Quantitative experimental validation of a mathematical model. *BBA - Molecular Cell Research*, *1823*(10), 1825–1840.
- Kono, T., Morita, H., Nishina, T., Fujita, M., Hirota, Y., Kawamura, K., & Fujiwara, A. (1996). Circadian variations of onset of Acute Myocardial Infarction and Efficacy of Thrombolytic Therapy. *Journal of the American College of Cardiology*, *27*(4), 774–778.
- Koo, M. W. L., Ogle, C. W., & Cho, C. H. (1985). The Effect of Cold-Restraint Stress on Gastric Emptying in Rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *23*(6), 2–5.
- Kreutz, F. C., Sa, K., Macnelly, S., Neubert, K., Haber, A., Bogyo, M., Borner, C. (2012). Caspase-3 feeds back on caspase-8, Bid and XIAP in type I Fas signaling in primary mouse hepatocytes. *An International Journal on Programmed Cell Death*, *17*(5), 503–
- Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W. D., Czabotar, P. E., Fischer, S. F., Perugini, M. A., ... Colman, P. M. (2008). Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death and Differentiation*, *15*(99), 1564–1571.

- Lefer, M. (1968). Influence of corticosteroids on mechanical performance of isolated rat papillary muscles'. *American Journal of Physiology*, 214(3).
- Lefkowitz, R. J. (1993). Structural basis for receptor subtype-specific regulation revealed by a chimeric 83 / j82-adrenergic receptor E ®®, 90(April), 3665–3669.
- Li, P., Nijhawan, D., & Budihardjo, I. (1997). Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1, Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell Press*, 91, 479–489.
- Lin, Y., Liu, Y., Lee, P. L., & Tung, C. (2017). Cooling-Evoked Hemodynamic Perturbations Facilitate Sympathetic Activity with Subsequent Myogenic Vascular Oscillations via Alpha2-Adrenergic Receptors. *Physiological Research*, (45), 1–27.
- Lindegger, N., & Niggli, E. (2005). Paradoxical SR Ca<sup>2+</sup> release in guinea-pig cardiac myocytes after β-adrenergic stimulation revealed by two-photon photolysis of caged Ca<sup>2+</sup>, 3, 801–813.
- Lindemann, J. P., Jones, L. R., Hathaway, D. R., Henry, B. G., & Watanabe, A. M. (1983). Beta Adrenergic Stimulation of Phospholamban Phosphorylation and Ca<sup>2+</sup>-ATPase Activity in Guinea Pig Ventricles, (1), 464–471.
- Lisa, F. Di, Menabo, R., Canton, M., Barile, M., & Bernardi, P. (2001). Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Causes Depletion of Mitochondrial and Cytosolic NAD<sup>+</sup> and Is a Causative Event in the Death of Myocytes in Postischemic Reperfusion of the Heart \*, 276(4), 2571–2575.
- Logothetis, D., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E. J., & Clapham, D. E. (1987). The βγ subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart.pdf. *Nature*, 325.
- Mannarino, C., Angelone, T., Filice, E., Quintieri, A. M., Imbrogno, S., Recchia, A., & Pulera, E. (2008). β<sub>3</sub>-Adrenoceptors modu
- Manni, S., Mauban, J. H., Ward, C. W., & Bond, M. (2008). Phosphorylation of the cAMP-dependent Protein Kinase ( PKA ) Regulatory Subunit Modulates PKA-AKAP Interaction , Substrate Phosphorylation , and Calcium Signaling in Cardiac Cells \* □, 283(35), 24145–24154.
- Martino, T., Tata, N., Belsham, D. D., Chalmers, J., Straume, M., Lee, P., Sole, M. J. (2007). Disturbed Diurnal Rhythm Alters Gene Expression and by Resynchronization. *Hypertension*, 49(5), 1104–1113.
- McCord, J., & Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase - an enzymic function erythrocyte. *The Journal of Biological Chemistry*, (22).
- Milligan, G., & Kostenis, E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: A short history. *British Journal of Pharmacology*, 147
- Moldoveanu, T., Liu, Q., Tocilj, A., Watson, M., Shore, G., & Gehring, K. (2006). The X-Ray Structure of a BAK Homodimer Reveals an Inhibitory Zinc Binding Site. *Molecular Cell*, 24(5), 677–688.

- Moriscot, A., Rabelo, R., & Bianco, A. (1993). Corticosterone inhibits uncoupling protein gene expression in brown adipose tissue. *American Journal of Physiology*, 265(1), 81–87.
- Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, S. H., ... Chang, B. S. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Science*, (381), 335–341.
- Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., & Dixit, V. M. (1998). An Induced Proximity Model for Caspase-8 Activation \*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(5), 2926–2930.
- Novotný, J., Bouřová, L., Málková, O., Svobodová, P., & Kolář, F. (1999). G Proteins, Beta-adrenoceptors and Beta-adrenergic Responsiveness in Immature and Adult Rat Ventricular Myocardium: Influence of Neonatal Hypo- and Hyperthyroidism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 772, 761–772.
- Oishi, K., Shirai, H., & Ishida, N. (2005). CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR  $\alpha$ ) in mice. *Biochemical Journal*, 581, 575–581.
- Orhan, G., Yapici, N., Yuksel, M., S, M. S., & Yalçin, A. S. (2006). Effects of N-acetylcysteine on myocardial ischemia – reperfusion injury in bypass surgery. *Heart Vessels*, 21(1), 42–47.
- Papers, J. B. C. (2001). Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man., 1–29.
- Pfeffer, M., Mu, C. M., Meissl, H., Ansari, N., Deller, T., Korf, H., ... Goethe-universita, W. (2009). The Mammalian Molecular Clockwork Controls Rhythmic Expression of Its Own Input Pathway Components, 29(19), 6114–6123.
- Rechciński, T., Kurpesa, M., Trzos, E., & Krzemińska-Pakuła, M. (2006). The influence of melatonin supplementation on circadian pattern of blood pressure in patients with coronary artery disease--preliminary report. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, 115(6), 520–528.
- Sack, M., Rader, T., Park, S., Bastin, J., McCuneS, S., & Kelly, D. (1996). Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation*, 94(11), 2837–2842.
- Sakakibara, S., Honma, H., & Kohsaka, M. (2000). Autonomic nervous function after evening bright light therapy : Spectral analysis of heart rate variability. *Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 54, 363–364.
- Sesso, A., Belizário, J. E., Marques, M. M., & Higuchi, M. L. (2012). Mitochondrial Swelling and Incipient Outer Membrane Rupture in Preapoptotic and Apoptotic Cells. *THE ANATOMICAL RECORD*, 1659(December 2010), 1647–1659.

- Sheth, T., Nair, C., Muller, J., & Yusuf, S. (1999). Increased winter mortality from acute myocardial infarction and stroke: The effect of age. *Journal of the American College of Cardiology*, 33(7), 1916–1919.
- Scho, C., Becker, C., Prank, K., Mu, A. V. Zur, & Brabant, G. (1997). Twenty-four-hour rhythms of plasma catecholamines and their relation to cardiovascular parameters in healthy young men, 675–683.
- Schreiber, S. N., Emter, R., Hock, M. B., Knutti, D., Cardenas, J., Podvinec, M., ... Kralli, A. (2004). The estrogen-related receptor alpha (ERR alpha) functions in PPARgamma coactivator 1 alpha (PGC-1alpha) induced mitochondrial biogenesis. *Proceedings Pf the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(17).
- Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., ... Martin, S. J. (1999). Ordering the Cytochrome c-initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a Caspase-9-dependent Manner. *Journal of Cell Biology*, 144(2), 281–292.
- Soares, M. C., Ferreira, R., Neuparth, M. J., Marques, F., Duarte, A., Soares, M. C., ... Marques, F. (2005). Acute and severe hypobaric hypoxia increases oxidative stress and impairs mitochondrial function in mouse skeletal muscle, 1247–1253.
- Sole, M. J., & Martino, T. A. (2009). The Role of Clock Genes in Cardiometabolic Disease Diurnal physiology : core principles with application to the pathogenesis , diagnosis , prevention , and treatment of myocardial hypertrophy and failure, 1318–1327.
- Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D., & Hamm, H. (1996). Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution.pdf. *Nature* 379, 9–74.
- Sprick, M. R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-wilde, A., Weigand, M. A., & Walczak, H. (2002). Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *The Embo Journal*, 21(17).
- Stergiou, G., Vemmos, K. N., Pliarchopoulou, K. M., Synetos, A. G., Roussias, L. G., & Moutokalakis, T. D. (2002). Parallel Morning and Evening Surge in Stroke Onset, Blood Pressure, and Physical Activity, 1480–1487.
- Streit, M. R., Weiss, C. S., Meyer, S., Ochs, M. M., Katus, A., & Hardt, S. E. (2016). Cardiac Effects of Attenuating Gs  $\alpha$  - Dependent Signaling, 1–19.
- Su, W., Zhang, Y., Zhang, Q., Xu, J., Zhan, L., Zhu, Q., Liu, H. (2016). N-acetylcysteine attenuates myocardial dysfunction and postischemic injury by restoring caveolin - 3/eNOS signaling in diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology*, 1–16.
- Sun, Z., Zhang, Z., & Cade, R. (2003). Renal responses to chronic cold exposure, 27, 22–27.
- Suzuki, M., Youle, R. J., & Tjandra, N. (2000). Structure of Bax : Coregulation of Dimer Formation and Intracellular Localization. *Cell Press*, 103, 645–654.

- Tomita, H., Nazmy, M., Kajimoto, K., Yehia, G., Molina, C. A., & Sadoshima, J. (2003). Inducible cAMP Early Repressor (ICER) Is a Negative-Feedback Regulator of Cardiac Hypertrophy and an Important Mediator of Cardiac Myocyte Apoptosis in Response to Beta -Adrenergic Receptor Stimulation Stimulation. *Circulation Research*, 2003(93), 12–22.
- Uren, R. T., Dewson, G., Chen, L., Coyne, S. C., Huang, D. C. S., Adams, J. M., & Kluck, R. M. (2007). Mitochondrial permeabilization relies on BH3 ligands engaging multiple prosurvival Bcl-2 relatives, not Bak. *Journal of Cell Biology*, 177(2), 277–287.
- Verdecchia, P., Schillaci, G., Guerrieri, M., Gatteschi, C., & Benemio, G. (1989). Circadian Blood Pressure Changes and Left Ventricular Hypertrophy in Essential Hypertension. *Circulation*, 528–537.
- Wajant, H. (2002). The Fas Signaling Pathway: More than a paradigm. *Science*, 5–7.
- Watson, P. A., Reusch, J. E. B., Mccune, S. A., Leinwand, L. A., Luckey, S. W., Konhilas, J. P., ... Moore, R. L. (2007). Restoration of CREB function is linked to completion and stabilization of adaptive cardiac hypertrophy in response to exercise. *Physiological Heart Circulation*, 80220, 246–259.
- Weber, C. R., Iii, V. P., Ginsburg, K. S., Houser, S. R., & Bers, D. M. (2002). Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> Exchange Current and Submembrane [Ca<sup>2+</sup>] During the Cardiac Action Potential.
- Wencker, D., Chandra, M., Nguyen, K., Miao, W., Garantziotis, S., Factor, S. M., ... Kitsis, R. N. (2003). A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(10), 1497–1504.
- Whaley, F. S., Ph, D., Hannan, P. J., Ph, D., Jacobs, D. R., Ph, D., & Ekelund, L. (1987). HYPERLIPIDEMIA Seasonal cholesterol cycles: the Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial placebo group. *Circulation*, 76(6), 1224–1234.
- Wolter, K. G., Hsu, Y., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X., & Youle, R. J. (1997). Movement of Bax from the Cytosol to Mitochondria during Apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 139(5), 1281–1292.
- Woodhouse, P., Khaw, K., Plummer, M., Foley, A., & Meade, T. (1994). Seasonal variations of plasma fibrinogen and factor VII activity in the elderly : winter infections and death from cardiovascular. *The Lancet*, 343(8895), 435–439.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J., & Greenberg, M. E. (1995). Opposing Effects of ERK and JNK-p38 MAP Kinases on Apoptosis. *Science*, 270(5240), 1326–1331.
- Xiao, R., Avdonin, P., Zhou, Y., Cheng, H., Akhter, S. A., Eschenhagen, T., ... Lakatta, E. G. (1999). Coupling of  $\alpha_2$  -Adrenoceptor to Gi Proteins and Its Physiological Relevance in Murine Cardiac Myocytes.

- Yamasaki, F., Schwartz, J. E., Gerber, L. M., Warren, K., & Pickering, T. G. (1998). Impact of Shift Work and Race / Ethnicity on the Diurnal Rhythm of Blood Pressure and Catecholamines. *Hypertension*, 32(3).
- Yamashita, T., Sekiguchi, A., Iwasaki, Y., & Sagara, K. (2003). Circadian Variation of Cardiac K<sup>+</sup> Channel Gene Expression.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., ... Wang, X. (2012). Prevention of Apoptosis by Bcl-2 : Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked . *Science*, 1129(1997), 1129–1132.
- Yang, Y., Liu, Y., Hsieh, M., Lin, Y., & Tung, C. (2018). Effects of prolonged paradoxical sleep deprivation with or without acute cold stress on hemodynamic perturbations in rats. *Stress*, 0(0), 1–8.
- Yano, H., Provasi, D., Cai, N. sheng, Filizola, M., Ferre, S., & Javitch, J. (2017). Development of novel biosensors to study receptor-mediated activation of Gs and Golf. *Journal of Biological Chemistry*, 292(49), 1–18.
- Young, M. E., Razeghi, P., & Taegtmeier, H. (2001). Clock Genes in the Heart Characterization and Attenuation With Hypertrophy, 1142–1151.
- Zavala, F., Tam, J. P., Hollingdale, M. R., Cochrane, A. H., Quakyi, I., Nussenzweig, R. S., & Nussenzweig, V. (1985). Involvement of the bcl-2 Gene in Human Follicular Lymphoma. *Science*, 228(4706), 0–3.
- Zhang, F., Chen, M., Yang, B., & Cao, K. (2009). N-acetylcysteine blocked hypoxia-reoxygenation induced apoptosis through ROS-p38 MAPK signaling pathway in neonatal rat cardiomyocytes. *Physiological Research*, 6(3), 168–172.
- Zhao, X.-M., Hao, H.-S., Zhao, S.-J., Wang, H.-J., Wang, N., Wang, D., ... Zhu, H.-B. (2016). Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes. *Journal of Pineal Research*, 60(2), 132–141.
- Zhu, P., Liu, J., Shi, L., Liu, J., & Zhang, X. (2015). Melatonin protects ADSCs from ROS and enhances their therapeutic potency in a rat model of myocardial infarction. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(9), 2232–2243.
- Zuberi, Z., Nobles, M., Sebastian, S., Dyson, A., Lim, S. Y., Breckenridge, R., Tinker, A. (2010). Absence of the Inhibitory G-Protein Galphai2 Predisposes to Ventricular Cardiac Arrhythmia.



## 12. PŘÍLOHY

Tabulka 1 – roztoky pro usmrcení potkana a homogenizaci tkáně

Roztoky	Chemikálie	Množství
<b>roztok Thiopentalu</b>	Thiopental	1 g
	fyziologický roztok (0,9 % NaCl)	10 ml
<b>Homogenizační pufr TMES</b>	Trizma Base	20 mM
	MgCl <sub>2</sub>	3 mM
	cCOMPLETE	50x naředěný
	PhosphoSTOP	1 tableta/10 ml
<b>pufr TME</b>	Trizma Base	20 mM
	MgCl <sub>2</sub>	3 mM
	cCOMPLETE	50x naředěný
	PhosphoSTOP	1 tableta/10 ml
<b>pufr TMES</b>	Sacharóza do roztoku TME	250 mM

Tabulka 2 – roztok pro mitochondriální bobtnání

Roztoky	Chemikálie	Množství
<b>Médium pro mitochondriální bobtnání</b>	sacharóza	125 mM
	KCl	65 mM
	HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)	10 mM
	sukcinát	5 mM
	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM
	pH	7,2

Tabulka 3 - ředění vzorků pro elektroforézu

Roztoky	Chemikálie	Množství
<b>ředění vzorků pro SDS-PAGE elektroforézu</b>	DTT (1,4-dithiothreitol)	50 mM
	SLB (Sample Laemmli Buffer)	4x naředěno
	TME	doplnění do finálního objemu

Tabulka 4 - ředění gelů pro elektroforézu

Roztoky	Chemikálie	Množství
<b>12% polyakrylamidový</b>	H <sub>2</sub> O	5,8 ml
<b>dělicí gel</b>	Akrylamid	8 ml
<b>(množství pro 4 gely)</b>	Tris C (pH = 8,9)	5 ml
	SDS (dodecylsírán sodný)	0,2 ml
	APS (amonium persulfát)	1 ml

<b>5% polyakrylamidový zaostřovací gel</b>	H2O	5,24 ml
	Akrylamid	1,67 ml
	Tris D (pH = 6,9)	2,5 ml
	SDS (dodecylsírán sodný)	0,1 ml
	APS (amonium persulfát)	0,5 ml
<b>Tris C</b>	Trizma Base	18,2 g
	TEMED (Tetramethylethylenediamine)	345 µl
	upravit pH na 8,9, doplnit MQH2O do 100 ml	
<b>Tris D</b>	Trizma Base	3,025 g
	TEMED (Tetramethylethylenediamine)	345 µl
	upravit pH na 6,9, doplnit MQH2O do 50 ml	
<b>APS</b>	Amonium Persulfát (APS)	90 mg
	H2O	5 ml

Tabulka 5 - ředění elektrodoých pufrů pro elektroforézu

Roztoky	Chemikálie	Množství
<b>vnitřní elektrodoý pufr (koncentrovaný)</b>	Trizma Base	30,3 g
	Glycin	144 g
	SDS (dodecylsírán sodný)	10 g
	doplnit mQ H2O do 1 l	
<b>vnitřní elektrodoý pufr (ředěný)</b>	100 ml koncentrovaného pufru, doplnit mQ H2O do 1 l	
<b>vnější elektrodoý pufr</b>	maximálně 4 x použitý vnitřní elektrodoý pufr	

Tabulka 6 - pořadí nanášených vzorků do gelu

Pořadí vzorků nanášených na gel				
	K	K1LL	CH1LD	CH1LL
Pořadí vzorků s N-Acetylcysteinem				
K	NAC_K6LD	NAC_K6LL	NAC_CH6LL	NAC_CH6LD

Tabulka 7 - ředění blotovacího pufru

Roztoky	Chemikálie	Množství
Towbin pufr	Trizma Base	3,03 g
	Glycin	14,4 g
	rozpustit v mQ H <sub>2</sub> O	500 ml
	Methanol	200 ml
	doplnit mQ H <sub>2</sub> O do 1 l	

Tabulka 8 - ředění promývacího roztoku

Roztoky	Chemikálie	Množství
TBS (Tris buffered saline)	Trizma Base	12,1 g
	NaCl	146,2 g
	rozpustit v mQ H <sub>2</sub> O ve 4 l	
	úprava pH na 7,5	
	doplnit mQ H <sub>2</sub> O do 5 l	
TTBS	TBS	1 l
	Tween 20	0,5 ml

Tabulka 9 - Aplikace primárních a sekundárních imunodetekčních protilátek

primární protilátka	katalogové číslo	molekulová hmotnost	ředění	sekundární protilátka	ředění
anti BAX	ab32503	21 kDa	1:1 000	Rabit IgG NA934V	1:6 600
Bcl2	SAB 4500003	26 kDa	1:1 000	Rabit IgG NA934V	1:10 000
anti-Caspase 8	ab25901	20 kDa	1:500	Rabit IgG NA934V	1:10 000
Gs	*	45 kDa	1:4 000	Rabit IgG NA934V	1:10 000
Gi ½	*	40 kDa	1:3 000	Rabit IgG NA934V	1:10 000
Gi 3	*	43 kDa	1:2 000	Rabit IgG NA934V	1:10 000

Protilátky označené \* vyrobené nekomerčně