

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

PKC δ a PKC ϵ
v myokardu potkana adaptovaného
na různé formy chronické hypoxie

PKC δ and PKC ϵ in rat heart adapted to different
forms of chronic hypoxia

Diplomová práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza



Školitelé: Mgr. Markéta Hlaváčková
doc. RNDr. František Novák, CSc.
prof. RNDr. František Kolář, CSc.

Kristýna Kožichová

2009

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelů Mgr. Markéty Hlaváčkové, doc. RNDr. Františka Nováka, CSc. a prof. RNDr. Františka Koláře, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....*1.5.2009*.....

František Kolář
.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde poděkovala svým školitelům Mgr. Markétě Hlaváčkové, doc. RNDr. Františku Novákovi, CSc. a prof. RNDr. Františku Kolářovi, CSc. a také doc. RNDr. Olze Novákové, CSc. za zadání tématu diplomové práce, cenné rady a připomínky, trpělivost a vždy milý přístup během mé experimentální práce i během sepisování diplomové práce.

Děkuji také celému kolektivu naší laboratoře, Mgr. Petře Míčové, Mgr. Patricii Balkové, Mgr. Martině Klevstigové a paní Jarmile Ševčíkové, za pomoc a příjemné pracovní prostředí.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také rodině a Markovi za podporu a trpělivost.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	7
1. ÚVOD	11
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
2.1. Protekce ischemického myokardu	12
2.1.1. Preconditioning a postconditioning	13
2.1.2. Chronická hypoxie.....	14
2.1.2.1. Negativní důsledky adaptace na chronickou hypoxii	16
2.1.2.2. Kardioprotektivní účinky chronické hypoxie	16
2.1.2.3. Reverzibilita změn vyvolaných adaptací na chronickou hypoxii	19
2.1.2.4. Experimentální modely chronické hypoxie	19
2.2. PKC	20
2.2.1. Struktura PKC.....	21
2.2.2. Výskyt isoform PKC	24
2.2.3. Regulace aktivity PKC.....	26
2.2.4. PKC a různé experimentální modely chronické hypoxie	28
2.2.4.1. PKC δ v ischemickém myokardu	30
2.2.4.2. PKC ϵ v ischemickém myokardu.....	31
3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	33
4. MATERIÁL A METODY	34
4.1. Laboratorní zvířata	34
4.2. Experimentální modely chronické hypoxie	34
4.2.1. Chronická normobarická hypoxie.....	34
4.2.2. Chronická hypobarická hypoxie	35
4.3. Odběr tkáně	35
4.4. Zdroje použitých chemikálií	36
4.5. Homogenizace a frakcionace tkáně	36
4.5.1. Homogenizace	37
4.5.1.1. Příprava homogenizačního pufu 3S.....	37

4.5.1.2. Homogenizační postup.....	38
4.5.2. Frakcionace	38
4.5.2.1. Postup frakcionace	38
4.6. Stanovení koncentrace proteinů	41
4.6.1. Princip metody	41
4.6.2. Postup stanovení	43
4.7. Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE).....	44
4.7.1. Příprava gelů	44
4.7.2. Příprava vzorků pro elektroforézu	45
4.8. Přenos proteinů na nitrocelulóзовé membrány (Western Blotting)	47
4.8.1. Postup.....	47
4.9. Imunodetekce	49
4.9.1. Protilátky	49
4.9.2. Postup imunodetekce PKC δ , PKC ϵ a P – PKC ϵ	50
4.10. Metoda zesílené chemiluminiscence (ECL)	51
4.10.1. Princip metody	51
4.10.2. Postup ECL	51
4.11. Skenování filmů na stolním skeneru	53
4.11.1. Postup.....	53
4.12. Vyhodnocení signálu	53
4.12.1. Postup.....	53
4.13. Zpracování dat	54
4.14. Statistické zpracování výsledků	54
5. VÝSLEDKY	55
5.1. Hmotnostní parametry	55
5.1.1. Adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m	55
5.1.2. Adaptace na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m	56
5.2. Velikost infarktu	57
5.2.1. Adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m.....	57
5.2.2. Adaptace na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m	58
5.3. Podíl proteinů extrahovatelných Tritonem X-100 v jednotlivých frakcích.....	58
5.3.1. Adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m	59

5.3.2. Adaptace na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m	60
5.4. Identifikace isoform PKC.....	62
5.5. Relativní zastoupení PKC δ, PKC ϵ a P – PKC ϵ po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m.....	64
5.5.1. PKC δ	64
5.5.2. PKC ϵ	66
5.5.3. P – PKC ϵ	68
5.6. Relativní zastoupení PKC δ, PKC ϵ a P – PKC ϵ po adaptaci na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m	71
5.6.1. PKC δ	71
5.6.2. PKC ϵ	74
5.6.3. P – PKC ϵ	76
6. DISKUZE	79
6.1. Hmotnostní parametry	79
6.2. Homogenizace a frakcionace tkáně	80
6.3. Identifikace isoform PKC.....	80
6.4. Relativní zastoupení PKC δ, PKC ϵ a P – PKC ϵ po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m	81
6.5. Relativní zastoupení PKC δ, PKC ϵ a P – PKC ϵ po adaptaci na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m	83
7. SHRNU TÍ	86
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	88

SEZNAM ZKRATEK

3S	homogenizační pufr se sacharózou
3ST	homogenizační pufr se sacharózou a Tritonem X-100
AAR	ischemická oblast
AKAP	vazebné proteiny pro proteinkinasy A
AMP	adenosin-5'-monofosfát
ANT	adeninnukleotidtranslokasa
aPKC	atypické proteinkinasy C
APS	persíran amonný
ATP	adenosin-5'-trifosfát
ATPasa	adenosin-5'-trifosfatasa
Bisakrylamid	N,N'-methylenbisakrylamid
BPB	bromfenolová modř
BSA	albumin z hovězího séra
BW	hmotnost těla
C	cytosol
C1–C4	konzervativní domény 1–4
CP	pelet po cytosolu
cPKC	konvenční proteinkinasy C
Cx 43	konexin 43
CytCox	cytochrom <i>c</i> oxidasa
CytCox IV	podjednotka IV cytochrom <i>c</i> oxidasy
DAG	diacylglycerol
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
D.V.	denzitometrický objem

ECL	metoda zesílené chemiluminiscence
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA	kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová
FIO ₂	inspirační koncentrace kyslíku
Glu	kyselina glutamová
Gp	G proteiny
H	homogenát
HE	extrakt homogenátu
HEP	pelet po extrakci homogenátu
HRP	křenová peroxidasa
HSP70	protein tepelného šoku 70
HW	hmotnost srdce
IHH	intermitentní hypobarická hypoxie
INH	intermitentní normobarická hypoxie
IPC	ischemický preconditioning
IR	ischemicko-reperfúzní
IS	nekrotická oblast
K _{ATP} kanály	draslíkové kanály závislé na adenosin-5'-trifosfátu
KNH	kontinuální normobarická hypoxie
LV	levá komora
M	blokovací roztok sušeného mléka
mitoK _{ATP}	mitochondriální draslíkové kanály závislé na adenosin-5'-trifosfátu
MPTP	mitochondriální permeabilní tranzitní póry
M.W.	molekulová hmotnost
N	normoxie
NC	nitrocelulóзовý

NOS	reaktivní formy dusíku
nPKC	nové proteinkinasy C
p	hladina významnosti
P – PKC ϵ	fosforylovaná proteinkinasa C ϵ (serin 729)
PKA	proteinkinasa A
PB1	domény Phox a Bem 1
PDK-1	fosfoinositid dependentní kinasa-1
PE	extrakt partikulární frakce
PEP	pelet po extrakci partikulární frakce
PI3K	fosfatidylinositol 3-kinasa
PKB	proteinkinasa B
PKC	proteinkinasa C
PKD	proteinkinasa D
PKG	proteinkinasa G
PLC	fosfolipasa C
PLD	fosfolipasa D
PMA	forbol-12-myristát-13-acetát
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PS	fosfatidylserin
R ²	hodnota spolehlivosti
RACK	receptor pro aktivované proteinkinasy C
RACK 1	vazebný protein pro proteinkinasu C β_{II}
RACK 2 (β' -COP)	vazebný protein pro proteinkinasu C ϵ
ROS	volné kyslíkové radikály
RV	pravá komora
S	septum

sarkK _{ATP}	sarkolemální draslíkové kanály závislé na adenosin-5'-trifosfátu
SDC	deoxycholát sodný
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného
S.E.M.	střední chyba průměru
Ser	serin
STICK	substráty proteinkinasy C
TTBS	fyzilogický roztok pufovaný Tweenem 20
TCA	kyselina trichloroctová
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Thr	threonin
TIF	8-bitový formát pro soubory bitmapových obrázků
TK	tyrosinkinasa
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tyr	tyrosin
V1–V5	variabilní domény 1–5
v/v	ředění objem/objem
VDAC	napětově závislý iontový kanál
w/v	ředění hmotnost/objem
ϵV_{1-2}	antagonista proteinkinasy C ϵ
$\psi\epsilon$ RACK	agonista proteinkinasy C ϵ

1. ÚVOD

Akutní okluze koronární arterie je jednou z hlavních příčin morbidity a mortality ve vyspělých zemích a podle Světové zdravotnické organizace bude do roku 2020 hlavní příčinou úmrtí na celém světě ⁽¹⁾. Není tedy divu, že se zájem řady vědců již dlouhou dobu soustřeďuje na to, jak infarktu předejít a jak zvýšit odolnost myokardu vůči nedostatku kyslíku a zmenšit tak jeho negativní dopad. Jsou známy dva hlavní způsoby protekce myokardu: tzv. preconditioning (popř. postconditioning) a dlouhodobá adaptace na působení různých faktorů, např. nedostatku kyslíku (chronické hypoxie). Nevýhodou protekce vyvolané preconditioningem (popř. postconditioningem) je, že má krátkodobé účinky. Z tohoto důvodu se zdá být výhodnější adaptace na chronickou hypoxii. Skutečnost, že lidé žijící ve vysokých nadmořských výškách mají nižší výskyt infarktu myokardu, je známá již od 50. let 20. století. Stále však nebyl vysvětlen detailní mechanismus tohoto kardioprotektivního působení. Kromě draslíkových kanálů závislých na adenosin-5'-trifosfátu, reaktivních forem kyslíku, NO, mitochondriálních permeabilních tranzitních pórů a erythropoetinu zde hraje stěžejní roli i proteinkinasa C (PKC).

Analýzou PKC po adaptaci na vysokou nadmořskou výšku se naše laboratoř zabývá již řadu let, a to na modelu hypobarické intermitentní hypoxie odpovídající 7000 m nad hladinou moře (adaptace 8 hod/den). Nově jsme zavedli i model kontinuální (adaptace 24 hod/den) a intermitentní (adaptace 23 hod/den) normobarické hypoxie 5500 m.

Mým úkolem bylo ověření změn v relativním zastoupení PKC δ , PKC ϵ a doplnění o analýzu fosforylované PKC ϵ v levé komoře myokardu potkana na již zavedeném modelu intermitentní hypobarické hypoxie 7000 m a zároveň analýza relativního zastoupení PKC δ , PKC ϵ a fosforylované PKC ϵ v levé komoře myokardu potkana na novém modelu kontinuální a intermitentní normobarické hypoxie 5500 m.

Tato diplomová práce byla vypracována na katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy ve spolupráci s Oddělením vývojové kardiologie Fyziologického ústavu AV ČR v Praze.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Protekce ischemického myokardu

Ischemií rozumíme patologický stav způsobený poklesem průtoku krve v tkáni nebo orgánu. Podstatou je nedostatek kyslíku a živin spojený s hromaděním odpadních produktů⁽²⁾.

Myokard je typicky aerobní tkání, jejíž metabolismus je na kyslíku striktně závislý⁽³⁾. Je však schopný tolerovat krátké vystavení ischemii, a to díky aktivaci endogenních adaptivních mechanismů, jimiž myokard chrání své energetické rezervy a zabraňuje tak poškození. Tyto adaptivní mechanismy zahrnují přepnutí metabolismu na anaerobní glykolýzu. Jestliže ale ischemie přetrvává delší dobu, dojde k vážnému deficitu adenosin-5'-trifosfátu (ATP)⁽⁴⁾. Tento deficit vede k ireverzibilnímu poškození, které může skončit až buněčnou smrtí. Pro přežití buněk je proto nezbytná reperfuze, která však paradoxně vede k ještě většímu poškození myokardu^(4,5). Během reperfuze dochází k tvorbě volných kyslíkových radikálů (ROS), změně permeability mitochondriální membrány a k rychlému obnovení hladiny ATP. Zároveň je v myokardu zvýšená koncentrace Ca^{2+} a dochází k rychlým změnám pH a osmotických poměrů (osmotický šok)⁽⁴⁾. Tyto jevy mohou způsobit rozvoj strukturálních, funkčních a metabolických změn, které vedou k poklesu kontraktility myokardu, objevují se arytmie a v konečném důsledku může dojít až ke smrti myocytů a srdečnímu selhání^(4,5).

Rozsah poškození myokardu je tedy závislý nejen na době trvání ischemie, ale také na průběhu obnovení koronární cirkulace při reperfúzi. Obě složky ischemicko-reperfúzního (IR) poškození tak představují důležité terapeutické cíle⁽⁴⁾.

Nejefektivnější způsob protekce myokardu využívající endogenní protektivní mechanismy reprezentuje:

- krátkodobá adaptace na sérii krátkých ischemických epizod předcházejících (**preconditioning**) či bezprostředně následujících potenciálně letální ischemii (**postconditioning**)
- dlouhodobá adaptace myokardu např. na **chronickou hypoxii**

2.1.1. Preconditioning a postconditioning

Již v roce 1986 Murry a spol. ⁽⁶⁾ na psím modelu demonstrovali, že 4 cykly 5-ti minutové ischemie oddělené reperfúzí výrazně snižují velikost infarktu vyvolaného následnou letální ischemií. Tento fenomén byl nazván ischemickým preconditioningem (IPC) a stal se nejúčinnější formou protekce infarktu myokardu *in vivo* ⁽¹⁾. Ischemický preconditioning zmenšuje velikost infarktového ložiska, snižuje výskyt arytmií a zlepšuje obnovení kontraktility srdce ⁽⁷⁾. Takto vyvolaná protekce má pouze přechodný charakter a probíhá ve dvou fázích:

1. **časná fáze** – trvá od několika minut do 2 až 3 hodin od spouštěcího ischemického podnětu
2. **pozdní fáze** – nastává zhruba 12 až 24 hodin po ischemickém podnětu a trvá 72 až 96 hodin ⁽⁸⁾

Přestože je ischemický preconditioning studován již řadu let, stále nebyl zcela objasněn jeho mechanismus. V protektivních signálech patrně hrají klíčovou roli receptory na buněčné membráně, mitochondriální draslíkové kanály závislé na ATP (K_{ATP} kanály), ROS, PKC, mitochondriální permeabilní tranzitní póry (MPTP) a celá řada dalších signálních molekul. Ze studií zabývajících se PKC vyplývá, že hlavním mediátorem preconditioningu je patrně isoforma PKC ϵ ^(8,9).

Ischemický preconditioning lze vyvolat také řadou farmak (farmakologický preconditioning) – adenosin, ethanol, bradykinin, opioidy, forbol-12-myristát-13-acetát (PMA) a mnoha dalšími látkami. Takto vyvolaná protekce má srovnatelné účinky s klasickým preconditioningem ^(10,11).

Pokud jde o využití preconditioningu v klinické praxi, je omezeno nutností zasáhnout v případě infarktu myokardu již před nástupem ischemie. Lepší možností se proto zdá být nedávno objevený postconditioning. V tomto případě jsou krátké epizody ischemie a reperfúze aplikované až bezprostředně po nástupu reperfúze a mají také kardioprotektivní účinky ⁽⁹⁾.

2.1.2. Chronická hypoxie

Chronickou hypoxií rozumíme nedostatečné zásobení tělesných tkání nebo celého organismu kyslíkem, v důsledku kterého dochází k omezení činnosti příslušné tkáně.

V literatuře se často zaměňují pojmy ischemie a hypoxie. Oba jevy jsou charakterizovány sníženou dodávkou kyslíku do myokardu. Při hypoxii je však zachováván koronární průtok, zásobení myokardu substráty i odstraňování odpadních produktů (např. laktát, H^+ a K^+). Během ischemie je naopak přerušena přívod substrátů do postižené oblasti, nejsou odváděny odpadní produkty metabolismu a dochází k poklesu pH v cytoplasmě srdečních buněk. Ischemie postihuje pouze tu oblast, kde bylo zásobení krví přerušeno uzavřením arterie. Hypoxie postihuje většinou celý myokard ⁽¹²⁾.

Z časového hlediska dělíme hypoxii na:

- **akutní** – hypoxický podnět působí minuty, hodiny, maximálně několik dní (subakutní)
- **chronickou** – hypoxický podnět působí týdny, měsíce až roky

*

Podle nejčastějších příčin vzniku se rozlišuje hypoxie:

- **anemická** – parciální tlak kyslíku je normální, ale je snížena transportní kapacita krve pro kyslík; snížení je způsobeno nedostatečným počtem krvinek nebo špatnou funkcí hemoglobinu
- **hypoxemická (systémová)** – parciální tlak kyslíku v arteriální krvi je snížen (patří sem hypoxie vyvolaná vysokou nadmořskou výškou), průtok krve není ovlivněn
- **ischemická (cirkulační)** – vzniká snížením nebo přerušením průtoku krve určitou oblastí tkáně (např. při okluzi cévy trombem) ⁽¹³⁾

Všechny výše uvedené druhy hypoxie mají své fyziologické a patologické projevy – např. hypertrofie pravé komory srdeční, plicní hypertenze, akutní infarkt myokardu, chronická ischemická choroba srdeční, cyanóza, spánková apnoe apod. ⁽¹⁴⁾.

Existují pouze dva případy, kdy lze hypoxický stav považovat za přirozený fyziologický jev:

- fetální myokard adaptovaný na hypoxii odpovídající nadmořské výšce 8000 m
- myokard obyvatel trvale žijících ve vysokých nadmořských výškách ⁽¹³⁾

Termín „vysoká nadmořská výška“ není přesně definován. Řada laboratoří považuje u člověka za minimální výšku pro rozvoj hypoxických změn 3000 m. Studie Koláře a spol. ⁽¹⁵⁾ však prokázala, že k typickým projevům chronické hypoxie dochází u potkana již v nadmořské výšce 1350 m.

Adaptace na vysokou nadmořskou výšku je charakterizována řadou funkčních změn, které slouží k udržení homeostázy při minimální spotřebě energie. Tato přizpůsobení mají jak pozitivní, tak negativní charakter. Adaptace zvyšuje toleranci myokardu vůči všem škodlivým projevům akutního nedostatku kyslíku a má celkově antihypertenzní efekt (to neplatí v případě intermitentní hypoxie). Na druhou stranu ale může vést adaptace na chronickou hypoxii k potenciálně škodlivým účinkům, jako jsou hypertrofie pravé komory srdeční či plicní hypertenze ⁽¹³⁾.

● **Krevní zásobení myokardu a koronární průtok**

Chronická hypoxie vede ke změnám v krevní cirkulaci. Při krátkodobém působení vysoké nadmořské výšky dochází ke zvýšení srdeční frekvence, minutového výdeje a ke změnám v orgánové distribuci krve. Přednostně jsou kyslíkem zásobeny orgány důležité pro přežití organismu (srdce, mozek) ⁽¹²⁾.

Dlouhodobé působení vysoké nadmořské výšky vede ke změnám krevního složení a cévního zásobení. Zvyšuje se počet erytrocytů (polycytémie, zvýšení hematokritu), a tedy koncentrace hemoglobinu, což vede k růstu transportní kapacity krve pro kyslík. ^(16,17) Erythropoéza je důsledkem působení hypoxie na ledviny, které produkují erythropoetin stimulující tvorbu a diferenciaci prekursorů červených krvinek v kostní dřeni ⁽¹⁸⁾. Zároveň se však zvyšuje krevní viskozita, a tím i zátěž srdce ⁽¹³⁾.

● **Energetický metabolismus**

Adaptace na chronickou hypoxii je v myokardu spojena s řadou změn buněčného metabolismu. Tyto změny připravují tkáň na nedostatek kyslíku. Organismus musí maximálně využít dostupnou energii, vybírá si tedy metabolické cesty a substráty s vyšší energetickou efektivitou. Roste kapacita aerobního metabolismu doprovázená zvýšeným počtem mitochondrií, zvýšenou schopností mitochondrií produkovat energii, vyšší koncentrací nebo aktivitou mitochondriálních enzymů a cytochromů a vyšší účinností oxidativní fosforylace ⁽¹²⁾. Dochází ke zvýšenému využití glukózy (vyšší aktivita

hexokinasy) a k nárůstu kapacity pro syntézu a degradaci laktátu (vyšší aktivita laktátdehydrogenasy). Zároveň klesá schopnost myokardu oxidovat mastné kyseliny, což dokumentuje snížená aktivita hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasy⁽¹⁹⁾.

Výšková hypoxie snižuje aktivitu některých sarkolemálních ATPas. Zároveň však zvyšuje jejich afinitu k ATP. Umožňuje tak lepší využití ATP a pomáhá ochránit myokard za podmínek snížené produkce energie⁽²⁰⁾.

• Plicní adaptace

Adaptace na chronickou hypoxii zvyšuje plicní objem, aktivní povrch plic a difúzní kapacitu pro výměnu plynů. Za podmínek sníženého obsahu kyslíku tak dochází ke zvýšení alveolární koncentrace kyslíku, a tím i ke zlepšení sycení erytrocytů⁽¹²⁾.

2.1.2.1. Negativní důsledky adaptace na chronickou hypoxii

Zatímco v systémové cirkulaci má adaptace na chronickou hypoxii vazodilatační účinky, v plicní cirkulaci má účinky vazokonstrikční⁽¹³⁾. Působením hypoxických podmínek dochází ke konstrikci plicních arteriol a k následné přestavbě jejich stěny. Důsledkem je plicní hypertenze, která ovlivňuje pravou srdeční komoru – dochází k jejímu přetížení a vzniku hypertrofie⁽²¹⁾. V počátku svého vzniku sice hypertrofie umožňuje dočasnou kompenzaci zvýšené zátěže, v konečném důsledku však může způsobit až srdeční selhání⁽²²⁾.

Chronická hypoxie vyššího stupně (7000 m) vede také k morfologickým změnám myokardu včetně vzniku drobných nekrotických ložisek převážně v pravé komoře⁽²³⁾. Dochází i ke změnám proteinového složení myokardu, mění se např. zastoupení jednotlivých forem kolagenu a dochází k fibróze⁽²⁴⁾. Chronická hypoxie vede také ke zpomalení tělesného růstu⁽²⁵⁾.

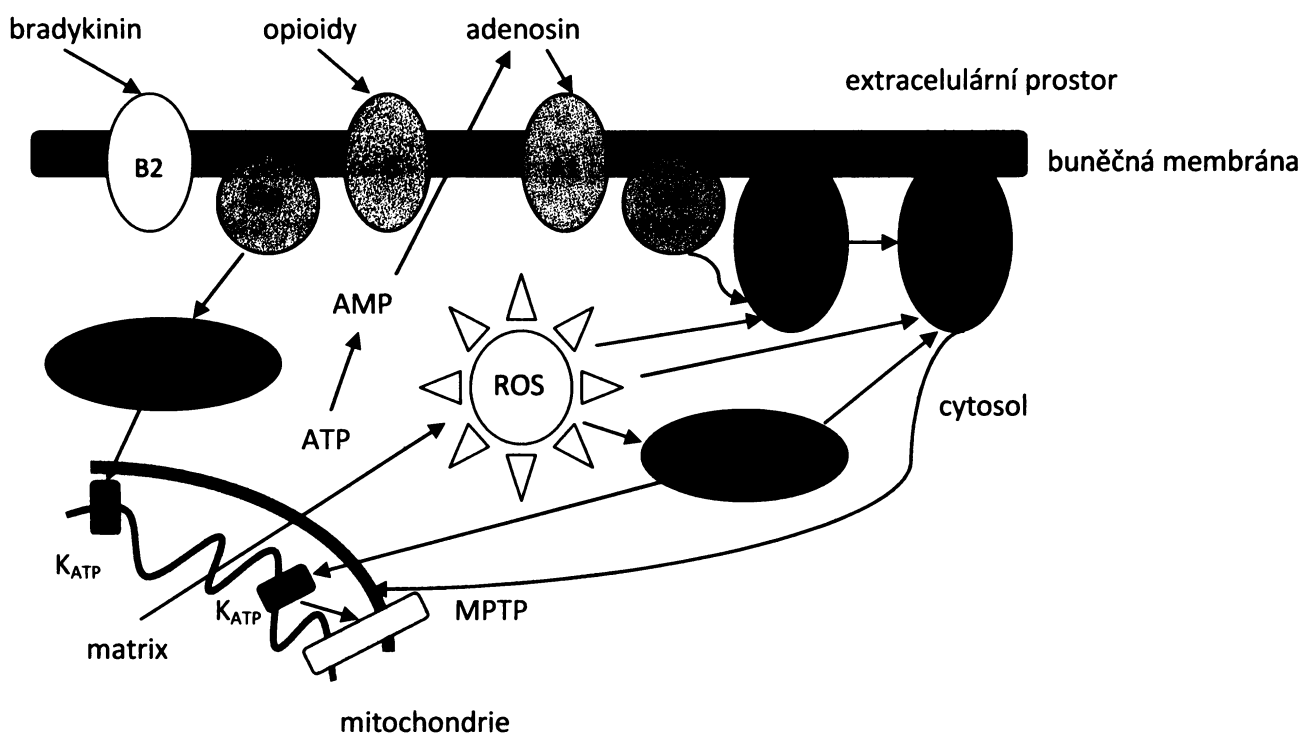
2.1.2.2. Kardioprotektivní účinky chronické hypoxie

Bylo prokázáno, že dlouhodobá adaptace na vysokou nadmořskou výšku má kardioprotektivní účinky. Myokard je odolnější vůči všem projevům akutního ischemického poškození, což se projevuje zmenšením velikosti infarktu^(25,26), poklesem počtu ischemických arytmií a také zlepšením obnovy kontraktility myokardu během reperfúze^(25,27,28,29). Na rozdíl od preconditioningu mají tyto kardioprotektivní

účinky dlouhodobý charakter. Působí týdny, někdy až měsíce od hypoxické expozice a činí tak chronickou hypoxii zajímavou z hlediska terapeutického využití⁽³⁰⁾.

Přestože jsou poznatky o ochraně myokardu vyvolané dlouhodobým pobytem ve vysoké nadmořské výšce známe již od 50. let minulého století, mechanismus tohoto jevu nebyl dosud zcela vysvětlen⁽¹⁾. Příčinou může být i množství používaných experimentálních modelů a protokolů. Řada studií však naznačuje možnost zapojení proteinkinasy (PKC⁽³¹⁾, fosfatidylinositol 3-kinasy/proteinkinasy B⁽²⁶⁾ (PI3K/PKB)), K_{ATP} kanálů, ROS, NO, opioidů, MPTP a erythropoetinu^(1,31) (obr. č. 1). Většina těchto látek je současně zahrnuta v mechanismu preconditioningu⁽¹⁾. Zdá se tedy, že preconditioning a chronická hypoxie sdílejí některé společné signální dráhy nebo alespoň jejich komponenty^(1,33).

Obrázek č. 1 Signální dráhy kardioprotekce



A1 – adenosin A1 receptory, AMP – adenosin-5'-monofosfát, ATP – adenosin-5'-trifosfát, B2 – bradykinin B2 receptory, δ – opioidní receptory, Gp – G proteiny, K_{ATP} – draslíkové kanály závislé na adenosin-5'-trifosfátu, MPTP – mitochondriální permeabilní tranzitní póry, PI3K – fosfatidylinositol 3-kinasa, PKC – proteinkinasa C, PLC – fosfolipasa C, PLD – fosfolipasa D, ROS – reaktivní formy kyslíku, TK – tyrosinkinasa. Převzato a upraveno podle⁽³²⁾.

• K_{ATP} kanály

Řada studií naznačuje, že K_{ATP} kanály hrají v kardioprotektivním mechanismu preconditioningu ⁽¹⁾ a chronické hypoxie zásadní roli ⁽³⁴⁾. Kardiomyocyty obsahují 2 typy K_{ATP} kanálů – sarkolemální a mitochondriální. Doposud však nebylo zcela jednoznačně objasněno, který typ je pro mechanismus protekce klíčový. Svou roli by zde mohly hrát i mezidruhové rozdíly ⁽¹⁾.

Sarkolemální K_{ATP} (sark K_{ATP}) kanály jsou za normálních metabolických podmínek uzavřené. Některé studie naznačují, že během ischemie/hypoxie dochází k jejich otevírání, což vede k toku K^+ do buněk, ke zkrácení fáze III srdečního akčního potenciálu, a tudíž k zachování ATP (díky sníženým kontrakcím) a redukci vstupu Ca^{2+} do buněk ⁽⁴⁾. Jiní autoři se naopak domnívají, že kardioprotekce vyvolaná IPC nebo chronickou hypoxií není na otevírání sark K_{ATP} kanálů závislá ^(4,34).

Mitochondriální K_{ATP} (mito K_{ATP}) kanály jsou patrně podstatnou složkou signálních drah IPC ⁽⁴⁾ a chronické hypoxie ^(3,34). Mechanismus jejich zapojení spočívá pravděpodobně v regulaci transportu mitochondriálního Ca^{2+} , regulaci objemu mitochondriální matrix anebo v regulaci produkce mitochondriálních ROS respiračním řetězcem. Ukázalo se, že selektivní aktivátory mito K_{ATP} kanálů (např. diazoxid) napodobují protektivní efekt preconditioningu ⁽⁴⁾ a chronické hypoxie ^(1,34). Blokátory mito K_{ATP} kanálů (např. 5-hydroxydekanoát) tento efekt naopak ruší ^(1,4,34).

• MPTP

MPTP je velký nescifický pór ve vnitřní mitochondriální membráně ⁽³⁾. Molekulární podstata MPTP stále není zcela popsána, ale předpokládá se, že se jedná o proteinový komplex složený z adeninnukleotidtranslokasy (ANT), cyklophilinu D a napětově závislého iontového kanálu (VDAC – „*voltage-dependent ion channel*“). Za normálních fyziologických podmínek je MPTP uzavřený, a vnitřní mitochondriální membrána je tedy pro metabolity a ionty téměř nepropustná. MPTP zůstává uzavřený i během ischemie ⁽³⁵⁾. Na počátku reperfúze však převládnu faktory podporující jeho otevření ^(4,5) (vysoká koncentrace mitochondriálního Ca^{2+} , vysoká koncentrace Pi, vyčerpání ATP a zejména prudce zvýšená hladina ROS) ^(3,34). Otevření MPTP umožní vodě a ve vodě rozpustným látkám vstup do mitochondrií, což vede k bobtnání mitochondriální matrix, kolapsu potenciálu vnitřní mitochondriální membrány, odpojení

dýchacího řetězce – oxidativní fosforylace ^(4,34), toku Ca^{2+} z mitochondrií a uvolnění malých proteinů jako např. cytochromu *c* do cytosolu ^(3,4,34).

Na celé řadě experimentálních modelů, jako je perfundované srdce, izolované myocyty, izolované hepatocyty, ale i lidský srdeční sval, bylo prokázáno, že inhibice otevírání MPTP během reperfúze má protektivní účinky ⁽³⁴⁾. Ukázalo se, že inhibitory otevírání MPTP (např. cyklosporin A a sanglifehrin A) chrání srdce proti IR poškození ^(3,34).

2.1.2.3. Reverzibilita změn vyvolaných adaptací na chronickou hypoxii

Protektivní působení adaptace na vysokou nadmořskou výšku má ve srovnání s preconditioningem dlouhodobé účinky ⁽³⁰⁾.

Naopak negativní změny vyvolané adaptací na výškovou hypoxii (pokles tělesné hmotnosti, plicní hypertenze, hypertrofie pravé komory, metabolické změny) se za určitou dobu vracejí k normálním hodnotám ^(14,19,36).

2.1.2.4. Experimentální modely chronické hypoxie

Mechanismus kardioprotektivního působení chronické hypoxie stále nebyl zcela objasněn a studie zabývající se účinky chronické hypoxie poskytují poněkud kontroverzní výsledky. Jednou z příčin může být značná heterogenita používaných experimentálních modelů. Modely chronické hypoxie se liší stupněm, typem (normobarická × hypobarická), a charakterem (kontinuální × intermitentní) hypoxie i detailním adaptačním protokolem (postupná adaptace, délka a frekvence reoxygenačních period v případě intermitentní hypoxie, celková doba adaptace atd.).

Hypobarická (výšková) hypoxie se přirozeně vyskytuje ve vysokohorském prostředí. Výzkumné laboratoře zabývající se jejím působením na organismus byly vybudovány na různých kontinentech až do výšek téměř 6000 m nad hladinou moře. Z praktických důvodů se však častěji využívá hypobarické hypoxie simulované v podtlakových komorách, kde je snížení parciálního tlaku kyslíku dosaženo snížením barometrického tlaku vzduchu pomocí vývěvy při zajištění dostatečné cirkulace, vlhkosti atd. Stupeň hypoxie ve většině publikovaných prací odpovídá výšce mezi 5000 m ^(28,37,38) a 7000 m ^(25,26,39). Typickou hypoxickou odpověď však může vyvolat i mnohem nižší stupeň hypoxie: bylo např. zjištěno, že již 1350 m vede u potkanů k mírné polycytémii, plicní hypertenzi a hypertrofii pravé komory srdeční ⁽¹⁵⁾.

U modelů **normobarické hypoxie** je snížen pouze parciální tlak kyslíku, přičemž barometrický tlak zůstává konstantní (odpovídající okolnímu prostředí). Obvykle je toho dosaženo použitím tlakových nádob s požadovanou směsí kyslíku a dusíku nebo speciálními generátory, které částečně odnímají kyslík ze vzduchu v hypoxické komoře. Obsah kyslíku je obvykle snížen na hodnotu kolem 10 %, která odpovídá stupni hypoxie ve výšce 5500 m ^(29,40,41,42,43,44,45).

Zvířata mohou být hypoxii vystavena **kontinuálně**, tj. bez jakýchkoliv normoxických epizod ^(29,41,44), nebo **intermitentně**, tj. s opakovanými epizodami reoxygenace. K adaptaci na kontinuální hypoxii se obvykle používají normobarické komory; u hypobarických komor je z technických důvodů obtížné zabránit opakované reoxygenaci při denní péči o zvířata. Při adaptaci na intermitentní hypoxii jsou zvířata vystavována hypoxii pouze po určitou denní dobu, jejíž délka se v různých studiích pohybuje od 4 hod ⁽⁴⁶⁾, přes 6 hod ^(28,37,38,40), 8 hod ^(25,26,39,45,47) až po 23 hod ^(41,42,48). Po zbývající denní dobu jsou zvířata držena v normoxických podmínkách (periodická reoxygenace). V modelech spánkové apnoe se epizody hypoxie a normoxie střídají s mnohem vyšší frekvencí (v řádu desítek vteřin), avšak tyto podmínky nevyvolávají charakteristické projevy chronické hypoxie.

Celková doba potřebná k adaptaci závisí na modelu hypoxie a adaptačním protokolu. V případě normobarické kontinuální hypoxie obvykle postačí 3 týdny, zatímco hypobarická intermitentní hypoxie vyžaduje kolem 5 týdnů ^(25,26,28,37).

2.2. PKC

Proteinkinasa C je součástí superrodiny kinas AGC. Tato superrodina dále obsahuje proteinkinasu A (PKA) a proteinkinasu G (PKG) ⁽⁴⁹⁾.

PKC byla objevena Nishizukou a spol. ⁽⁵⁰⁾ v roce 1977. Jedná se o multigenovou rodinu příbuzných serin/threoninových kinas, které tvoří křížovátku mnoha signálních drah ⁽⁴⁹⁾. Jednotlivé isoformy PKC se liší nejen svou strukturou (obr. č. 2), tkáňovou distribucí, subcelulární lokalizací a způsobem aktivace, ale i substrátovou specificitou ⁽⁵¹⁾. Díky tomu mohou být isoformy PKC zahrnuty v řadě odlišných buněčných dějů jako je diferenciacce a proliferace, apoptóza, genová exprese, kontrakce svalstva, energetický metabolismus a endocytóza. PKC hraje roli v paměti a učení, alkoholové

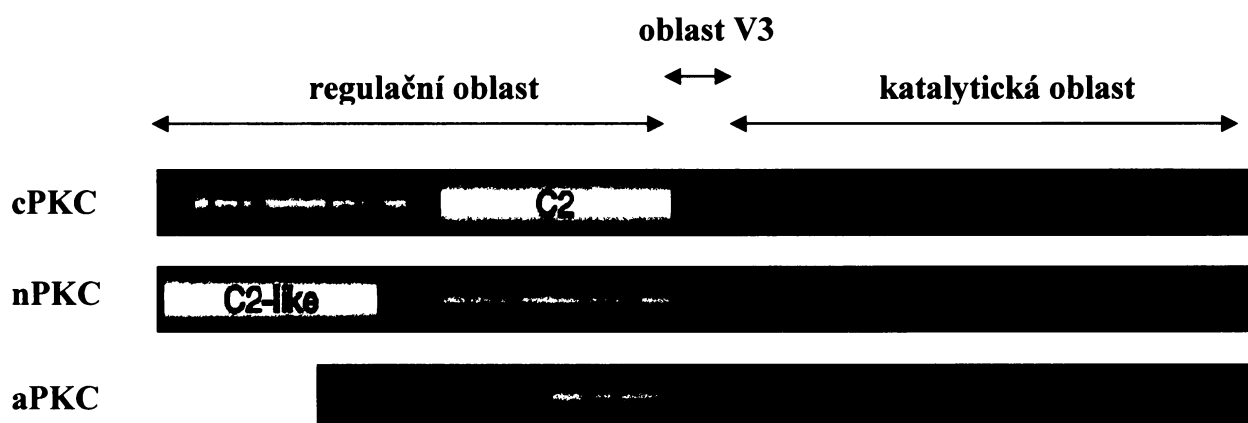
závislosti, adaptaci na bolest, tvorbě metastáz, nádorovém bujení, hypo- a hypertermii, hladovění⁽⁵²⁾, hypoxii, ischemii⁽¹⁾ a preconditioningu⁽⁸⁾.

2.2.1. Struktura PKC

Všechny isoformy PKC sdílejí určité základní strukturní znaky: jsou tvořeny jediným polypeptidovým řetězcem složeným z N-koncové regulační oblasti (20–40 kDa) a C-koncové katalytické oblasti (~ 45 kDa)^(49,53).

Molekula PKC se skládá až ze 4 konzervativních domén (C1–C4), mezi kterými jsou oblasti s menší homologií – variabilní domény (V1–V5). Regulační a katalytickou část enzymu odděluje variabilní doména 3 (V3), která se po navázání enzymu na membránu stává proteolyticky nestabilní^(49,53,54). Jako odpověď na řadu proapoptotických podnětů může u některých isoform PKC dojít ke štěpení tohoto úseku kaspasami⁽⁴⁹⁾. Znamená to, že se uvolní fragment katalytické a fragment regulační domény. Štěpení pomocí kaspas tak může u určitých isoform PKC sloužit jako jeden z mechanismů aktivace, protože volná katalytická doména již nepodléhá autoinhibici^(49,52).

Obrázek č. 2 Struktura PKC



aPKC – atypické proteinkinasy C, C1–C4 – konzervativní domény, cPKC – konvenční proteinkinasy C, nPKC – nové proteinkinasy C, PB1 – domény Phox a Bem1, PS – fosfatidylserin, šedou barvou jsou označeny variabilní domény. Převzato a upraveno podle⁽⁴⁹⁾.

Rodinu PKC dělíme na základě rozdílné struktury N-koncové regulační oblasti do tří skupin ^(49,52):

1. konvenční PKC (cPKC)

- **isoformy:** α , β_I , β_{II} , γ
- **aktivátory:** diacylglycerol (DAG), fosfatidylserin (PS), Ca^{2+}
- **struktura:** regulační oblast je tvořena doménou C1 a C2 ^(49,52). Doména C1 obsahuje autoinhibiční pseudosubstrátovou sekvenci a dále motiv bohatý na cystein. Pseudosubstrátová oblast při absenci aktivátorů interaguje s vazebným místem pro substrát v katalytické oblasti enzymu, a udržuje tak enzym v neaktivním stavu. Motiv bohatý na cystein je v řadě isoenzymů duplikovaný (C1A a C1B). Obsahuje 6 cysteinů a 2 histidiny, které koordinují 2 ionty Zn^{2+} ⁽⁴⁹⁾, a vytvářejí tak zinkové prsty ⁽⁵²⁾. Vrchní část domény C1 tvoří vysoce hydrofóbní povrch. Pozitivně nabitě prvky interagující s anionickými fosfolipidy se nacházejí zhruba uprostřed domény C1. Tato interakce umožňuje penetraci domény C1 membránovou dvojvrstvou a vazbu DAG, který je lokalizovaný hluboko v membránové struktuře. Dochází k vazbě lipidových kofaktorů (DAG, PMA) do úzké polární kapsy v jinak vysoce hydrofóbním povrchu domény C1 ⁽⁴⁹⁾.

Domény C1A a C1B se u jednotlivých isoenzymů liší svou afinitou k DAG a forbolovým esterům. U PKC α má vysokou afinitu k DAG doména C1A, k forbolovým esterům naopak doména C1B. Aktivace PKC β_{II} pomocí DAG je závislá na doméně C1A. U PKC γ vážou DAG i forbolové estery s vysokou afinitou obě domény C1. Doména C1 také zprostředkovává protein-protein interakce (např. interakce PKC γ s 14-3-3 proteiny) ⁽⁴⁹⁾.

Doména C2 obsahuje místo rozeznávající kyselé lipidy, místo pro vazbu Ca^{2+} a vazebné úseky, které zprostředkovávají protein-protein interakce isoform PKC s vazebnými partnery (např. interakce PKC β_{II} se svým specifickým vazebným proteinem RACK 1) ^(49,52).

Katalytická oblast enzymu je tvořena doménou C3 a C4. Doména C3 obsahuje vazebné místo pro ATP, doména C4 obsahuje vazebné místo pro substrát ⁽⁵¹⁾. Pro funkci a lokalizaci na specifické cíle je podstatná také variabilní doména 5 (V5). V5 obsahuje „turn“ motiv a hydrofóbní motiv.

Hydrofóbní motiv má zejména 3 funkce: ukotvit fosfoinositid dependentní kinasu-1 (PDK-1) a podpořit tak fosforylaci aktivační smyčky, tvořit katalytickou kapsu a účastnit se interakcí s doménou C2 ⁽⁴⁹⁾.

2. nové PKC (nPKC)

- **isoformy:** δ , ϵ , η , θ
- **aktivátory:** DAG, PS
- **struktura:** oproti konvenčním PKC mají v primární struktuře domény C1 a C2 v opačném pořadí ⁽⁵²⁾. Domény C1A a C1B se vyznačují rozdílnou afinitou k DAG a forbolovým esterům. Doména C1A PKC δ má vysokou afinitu k DAG, zatímco doména C1B má vysokou afinitu k forbolovým esterům. U PKC ϵ interaguje DAG s vysokou afinitou s doménou C1A, zatímco u PKC θ reaguje DAG s doménou C1B. Doména C2 nových PKC není aktivována Ca^{2+} ^(49,52) a u PKC δ neváže lipidy. Doména C2 PKC ϵ obsahuje vazebné místo pro RACK 2 (= β' -COP) – specifický vazebný protein PKC ϵ . Isoformy PKC δ , ϵ , a θ podléhají štěpení kaspasami v oblasti V3. U isoformy PKC δ však existují formy vzniklé alternativním sestřihem, které jsou proti tomuto štěpení odolné ^(49,55).

3. atypické PKC (aPKC)

- **isoformy:** ζ , ν/λ
- **aktivátory:** PS
- **struktura:** oproti konvenčním PKC neobsahují doménu C2 citlivou na Ca^{2+} , ani typickou doménu C1 ^(49,52). Jejich atypická doména C1 má pouze jeden motiv bohatý na cystein, který váže fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát nebo ceramid, ale neváže DAG. Dále mají atypické PKC doménu PB1, která je tvořena doménami Phox a Bem 1 a zprostředkovává protein-protein interakce. Isoforma PKC ζ je v oblasti V3 štěpena kaspasami. Na rozdíl od cPKC a nPKC obsahují aPKC místo hydrofóbního motivu na V5 kyselinu glutamovou (Glu) ⁽⁴⁹⁾.

Poslední známou isoformou je PKC μ . Tato isoforma se poněkud liší od zbylých členů rodiny PKC. Neobsahuje totiž pseudosubstrátovou oblast, ale má plekstrinovou doménu⁽⁵⁶⁾. Zařazení PKC μ není jednotné. PKC μ je někdy chápána jako součást nových PKC⁽⁵⁴⁾, jindy patří do rodiny PKC, ale nezařazuje se do žádné skupiny. PKC μ bývá někdy označována jako proteinkinasa D (PKD)⁽⁵⁶⁾.

2.2.2. Výskyt isoform PKC

Isoformy PKC se nacházejí v celé řadě tkání a buněk (tab. č. 1), výskyt je druhově a orgánově závislý⁽⁵⁴⁾.

Tabulka č.1 Distribuce isoenzymů PKC ve vybraných savčích buňkách a tkáních

buňka/tkáň	PKC α	PKC β_1	PKC β_2	PKC γ	PKC δ	PKC ε	PKC ζ	PKC η	PKC θ	PKC λ_1	PKC μ
centrální nervový systém	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?
srdce	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	?
tenké střevo	?	?	-	+	+	?	?	?	?	+	?
ledviny	+	+	-	+	+	+	+	+	+	?	+
játra	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	?
hladká svalovina dýchacích cest	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
pľíce	+	+	-	+	+	?	+	+	?	?	?
neutrofilly	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
monocyty	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
makrofágy	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
eozinofily	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
krevní destičky	+	+	-	+	+	+	+	?	+	?	?
T-lymfocyty	+	+	-	+	+	+	+	+	?	?	?
B-lymfocyty	+	+	-	+	+	+	+	+	?	?	?
hladká svalovina cév	+	+	-	+	+	+	+	?	?	+	?
sítnice	+	+	-	+	+	+	+	?	?	?	?
slezina	+	+	-	+	+	+	+	?	?	+	?
varlata	+	+	-	+	+	+	+	?	?	+	?
vaječníky	+	+	-	+	+	+	+	?	?	+	?
slinivka břišní	+	+	-	+	?	+	+	?	?	+	?
brzlík	+	+	-	+	?	-	?	?	?	?	?

Převzato a upraveno podle ⁽⁵⁴⁾.

2.2.3. Regulace aktivity PKC

PKC jsou regulovány zejména dvěma mechanismy:

- **fosforylací**, která reguluje aktivní místo a subcelulární lokalizaci enzymu
- pomocí **druhých poslů** (ligandů nebo substrátů, které napomáhají asociaci PKC s membránami a vedou k uvolnění pseudosubstrátu) ⁽⁵³⁾

● Regulace fosforylací/defosforylací

PKC je syntetizovaná ve formě neaktivního defosforylovaného prekurzoru ⁽⁵³⁾. Pro maturaci PKC je nezbytná trojnásobná fosforylace. Nejprve dochází k transfosforylaci na aktivační smyčce pomocí fosfoinositid dependentní kinasy-1 (PDK-1) ⁽⁵⁷⁾. PKC se tak stane katalyticky aktivní. Následně dochází k dvojí autofosforylaci na C-konci enzymu (nejprve na „turn“ motivu, poté na hydrofóbním motivu), která stabilizuje katalyticky aktivní strukturu enzymu ^(53,58). Přesné pozice fosforylací se liší u jednotlivých isoformem a jsou vysoce konzervované. PKC δ je standardně fosforylována na Thr 505, Ser 643 a Ser 662 ⁽⁵⁹⁾, PKC ϵ na Thr 566, Ser 729 a Thr 710 ⁽⁶⁰⁾.

Fosforylace PKC δ se od ostatních isoformem poněkud odlišuje. Tento isoenzym může být katalyticky aktivní i bez fosforylace na Thr 505. Úlohu fosforylace v aktivační smyčce přebírá Glu na pozici 500. Pro regulaci PKC δ jsou také velmi podstatné fosforylace na tyrosinech. Na rozdíl od ostatních isoenzymů nejsou tyto pozice striktně konzervované. Nejčastější místa tyrosinové fosforylace jsou na Tyr 512 a Tyr 523 v katalytické doméně, na Tyr 52, Tyr 155 a Tyr 187 v regulační doméně a na Tyr 311 a Tyr 332 v oblasti V3 ⁽⁵⁸⁾.

Trojnásobně fosforylovaná PKC je následně uvolněna do cytosolu. Místo pro vazbu substrátu je obsazeno pseudosubstrátem a PKC je neaktivní. Přítomnost DAG však způsobuje dramatický nárůst afinity PKC k membránám. Dochází k translokaci PKC na membrány, a to pomocí vazby DAG na doménu C1 a vazby PS na doménu C2 ⁽⁵³⁾.

Snížení množství PKC je většinou spojeno s defosforylací aktivované PKC. Poté následuje ubiquitinylace a proteolýza. Před degradací je PKC chráněna pomocí molekulárního chaperonu HSP70 ⁽⁵⁷⁾.

• Regulace lipidy

Kyselé lipidy (zejména PS) jsou účinnými kofaktory aktivujícími PKC. Vazba DAG nebo forbolových esterů v přítomnosti fosfolipidového kofaktoru vede ke konformační změně PKC. DAG způsobuje dramatický nárůst afinity cPKC a nPKC k PS. Dochází k odstranění pseudosubstrátu z vazebného místa pro substrát a k aktivaci enzymu ⁽⁵⁶⁾. Aktivace PKC pomocí DAG, ale i pomocí PS je závislá na délce jejich nenasyčených mastných kyselin ⁽⁵⁴⁾.

PKC je aktivována také cis nenasycenými mastnými kyselinami (kyselinou arachidonovou, linolovou a kyselinou olejovou) ^(54,56).

• Regulace Ca²⁺

Alosterické interakce mezi Ca²⁺ a fosfolipidy aktivují cPKC. Ca²⁺ zvyšuje afinitu cPKC ke kyselým fosfolipidům ⁽⁵³⁾. Regulace asociace PKC s membránami nebo aktivace pomocí Ca²⁺ je závislá na koncentraci Ca²⁺. Vazba na membránu vyžaduje menší koncentrace Ca²⁺. Dochází ke slabé membránové interakci spojené s konformačními změnami, které však nejsou dostačující k aktivaci enzymu. Vyšší koncentrace Ca²⁺ vedou ke konformačním změnám PKC, pseudosubstrát se uvolňuje z vazebného místa v katalytické oblasti a PKC je aktivována ⁽⁵⁶⁾.

• Regulace lokalizací

Kromě lipidů interaguje PKC také s proteiny, a to pomocí protein-protein interakcí. Tyto interakce hrají podstatnou roli v lokalizaci isoenzymů, a tím i v jejich funkcích. PKC ve své aktivní konformaci váže receptory pro aktivované PKC (RACK) ⁽⁶¹⁾ nebo substráty, které interagují s PKC (STICK), zatímco inaktivní PKC interaguje s vazebnými proteiny pro PKA (AKAP) a 14-3-3 proteiny. Podstatnou protein-protein interakcí je pravděpodobně také interakce mezi PKC a anexiny ⁽⁵⁶⁾. Ukázalo se, že pro translokaci PKC δ na membrány je nutná vazba PKC δ na anexin V ⁽⁶²⁾.

Vazebné proteiny pro PKC mohou ale nemusí, být substráty PKC. Vazba PKC na vazebné proteiny má mnohé funkce – např. aktivace či inhibice PKC, lokalizace a přemísťování neaktivní nebo aktivní PKC do specifických intracelulárních míst ⁽⁵⁶⁾.

• Regulace ROS a reaktivními formami dusíku (NOS)

Chronická hypoxie je v řadě tkání a orgánů spojená se zvýšeným oxidačním stresem a tvorbou ROS⁽¹⁾, které ovlivňují signální dráhy PKC prostřednictvím fosforylace PKC na tyrosinu, ale také pomocí redoxních modifikací. Mírný oxidační stres podporuje oxidaci cysteinových zbytků domény C1, což vede k uvolnění Zn^{2+} iontů, snížené autoinhibiční funkci a k aktivaci PKC nezávislé na kofaktorech. Naproti tomu větší oxidační stres modifikuje reaktivní cysteiny v kinasové doméně a způsobuje deaktivaci PKC⁽⁴⁹⁾.

Úloha NO a od NO odvozených reaktivních forem dusíku (např. peroxinitrit) v regulaci PKC doposud nebyla zcela objasněna. Jedním z předpokladů je, že by PKC mohla být cílem NOS. NOS způsobují nitrosylaci PKC na tyrosinech, a tím ovlivňují signální dráhy tohoto enzymu^(1,49,63).

ROS a NOS mohou patrně v závislosti na okolnostech přispívat jak k IR poškození, tak ke kardioprotekci^(1,49,63).

2.2.4. PKC a různé experimentální modely chronické hypoxie

Analýzu vlivu chronické hypoxie na PKC komplikuje nejen velké množství experimentálních modelů, ale i odlišné druhy a stáří pokusných zvířat.

Chronická hypoxie vede v levé komoře myokardu, alespoň u některých studií, ke zvýšenému relativnímu zastoupení specifických isoform PKC, k jejich subcelulární redistribuci nebo aktivaci. Inhibitor PKC (chelerytrin nebo calphostin C) podaný před ischemií kompletně ruší kardioprotektivní účinky vyvolané chronickou hypoxií. PKC je tedy pravděpodobně zahrnuta v mechanismu kardioprotekce. Doposud se však nepodařilo objasnit, jaká isoforma zde hraje klíčovou roli. Nejpravděpodobnějšími adepty jsou PKC δ a PKC ϵ ⁽³¹⁾.

Neckář a spol.⁽²⁵⁾ na modelu intermitentní hypobarické hypoxie (IHH) (8 hod/den, 5 týdnů, 7000 m) pozorovali v levé komoře myokardu potkana zvýšené relativní zastoupení PKC δ v cytosolu, nukleárně-cytoskeletární, mitochondriální i mikrosomální frakci. Kolář a spol.⁽⁴⁷⁾ zjistili, že zvýšené zastoupení PKC δ v partikulární frakci z levé komory myokardu potkana po adaptaci na IHH (8 hod/den, 5 týdnů, 7000 m) je závislé na oxidačním stresem vyvolaném hypoxií, neboť chronická léčba antioxidantem během

adaptace na IHH tento efekt kompletně zrušila. IHH vedla také ke snížení relativního zastoupení PKC ϵ v partikulární frakci. Došlo také ke zmenšení velikosti infarktového ložiska. Tento efekt byl zrušen podáním obecného inhibitoru PKC, chelerytrinu, a částečně potlačen inhibitorem PKC δ , rotlerinem⁽²⁵⁾.

Veronika Lacinová⁽⁶⁴⁾ se zabývala efektem adaptace na IHH (8 hod/den, 5 týdnů, 7000 m) na relativní zastoupení PKC α a PKC ζ v myokardu dospělých potkanů. Adaptace na IHH významně zvýšila relativní zastoupení PKC α ve všech sledovaných frakcích, nejvyšší nárůst relativního zastoupení byl pozorován ve frakci mitochondriální. Relativní zastoupení PKC ζ se vlivem IHH zvýšilo ve všech sledovaných frakcích, přičemž největší zvýšení bylo patrné v nukleárně-cytoskeletární frakci.

Hlaváčková a spol.⁽³⁹⁾ ukázali, že dieta o různém složení polynenasycených mastných kyselin řady n-3 a n-6 významně ovlivňuje účinek IHH (8 hod/den, 5 týdnů, 7000 m) na relativní zastoupení a buněčnou distribuci PKC δ a ϵ v levé komoře myokardu potkana.

Ding a spol.⁽³⁷⁾ pozorovali v levé srdeční komoře potkanů adaptovaných na mírnější IHH (6 hod/den, 6 týdnů, 5000 m) zvýšené zastoupení isoform α , δ a ϵ v partikulární frakci. V cytosolu nedošlo k žádným změnám. Adaptace zároveň zlepšila obnovu kontraktility myokardu.

Naproti tomu Rouet-Benzineb a spol.⁽⁴²⁾ po adaptaci na intermitentní normobarickou hypoxii (INH) (23 hod/den, 8, 15, 21 dnů, 10 % O₂) nepozorovali žádné změny v celkové aktivitě ani relativním zastoupení katalytického fragmentu všech isoform PKC v homogenátu myokardu levé komory potkanů.

Stejně tak Morel a spol.⁽⁴⁸⁾ nepozorovali po adaptaci na IHH (23 hod/den, 2 týdny, 5500 m) změny v obsahu ani distribuci isoform α , δ , ϵ , ζ v myokardu levé komory potkanů v žádné z buněčných frakcí.

Cataldi a spol.⁽⁴³⁾ pozorovali v levé komoře potkanů po adaptaci na INH (12 hod/den, 12 dnů, 10 % O₂) zvýšenou fosforylaci PKC α v homogenátu.

Li a spol.⁽⁴⁴⁾ vystavovali březí samice potkanů působení kontinuální normobarické hypoxie (KNH) (24 hod/den, 7 dnů, 10,5 % O₂). U dospělých potomků takto adaptovaných zvířat došlo ke snížení hladiny PKC ϵ v homogenátu. Na zastoupení PKC α , β_I , β_{II} , δ a ζ neměla adaptace žádný vliv.

V kontrastu s účinky na potkanech byl pokus Rafiee a spol.⁽²⁹⁾ na neonatálních králících. Adaptace na KNH (24 hod/den, 10 dnů, 10 % O₂) vedla v levé komoře myokardu

ke zvýšené fosforylaci PKC ϵ a translokaci PKC ϵ do partikulární frakce. Došlo také ke zlepšení obnovy kontraktility myokardu.

2.2.4.1. PKC δ v ischemickém myokardu

Dosavadní poznatky o funkci PKC δ v IR poškození a kardioprotekci jsou velmi kontroverzní. Tato isoforma má patrně jak pozitivní, tak negativní roli, a to v závislosti na tom, jak dlouho před ischemickým podnětem dojde k její aktivaci ⁽³¹⁾.

Aktivace PKC δ během reperfúze zhoršuje poškození myokardu. Mechanismus těchto škodlivých efektů je patrně způsobený zvýšením produkce ROS a aktivací proapoptotických drah ⁽⁶⁵⁾. Během IR zřejmě dochází k aktivaci PKC δ , která je spojená s translokací enzymu na mitochondrie ^(4,65). Translokace závisí na cytoplazmatickém anexinu V, na který se PKC δ v mikrotubulech přechodně váže ⁽⁶²⁾. Dochází ke stimulaci apoptózy způsobené ovlivněním rovnováhy mezi proapoptotickými a antiapoptotickými enzymy ⁽⁶⁵⁾ (zvýšení hladiny proapoptotického Bad a snížení hladiny antiapoptotického Bcl-2 a Bcl-x_L) a zvýšenému uvolňování cytochromu *c* ^(4,65). Nastává bobtnání matrix a kolaps potenciálu vnitřní mitochondriální membrány ^(4,35).

PKC δ také fosforyluje významný srdeční substrát troponin I tvořící „inhibiční podjednotku“ troponinového komplexu, který přispívá k regulaci funkce kontraktálního aparátu ⁽⁴⁹⁾.

Zvýšený relativní obsah PKC δ hraje patrně úlohu v rozvoji hypertrofie pravé i levé komory myokardu ⁽⁵⁸⁾.

PKC δ pravděpodobně interaguje s d podjednotkou F₁F₀ ATPasy a během dlouhotrvající ischemie způsobuje inhibici tvorby ATP, což by mohlo přispívat k IR poškození zpomalením obnovy aerobní produkce ATP. Na druhou stranu by tato interakce mohla být kardioprotektivní, a to v případě inhibice reverzního chodu F₁F₀ ATPasy pomocí PKC δ během ischemie ⁽⁶⁶⁾.

PKC δ má pozitivní vliv jako mediátor různých forem kardioprotekce. Zdá se, že PKC δ působí protektivně, jestliže je aktivována dostatečně dlouho před vystavením myokardu ischemii ⁽³¹⁾. Inagaki a spol. ⁽⁶⁷⁾ ukázali, že aktivace PKC δ dostatečně dlouho před ischemií vedla k aktivaci PKC ϵ a následné kardioprotekci. Úloha PKC δ v kardioprotekci byla prokázána použitím PKC δ deficientních myší. Ukázalo se, že přítomnost PKC δ je nutná k protektivnímu přechodu od aerobního k anaerobnímu metabolismu, který je vyvolán IPC ⁽⁶⁸⁾. Navíc bylo zjištěno, že PKC δ translokuje

na srdeční mitochondrie, kde fosforyluje komplex pyruvátdehydrogenasy a udržuje ho v neaktivním stavu ⁽⁴⁾. Tím pravděpodobně přispívá k posunu od aerobního k anaerobnímu metabolismu, který je pozorován i v srdcích adaptovaných na chronickou hypoxii ⁽¹⁹⁾. Mayr a spol. ⁽⁶⁹⁾ prokázali na myších srdcích, že v mechanismu kardioprotekce IPC se podstatně uplatňuje spolupráce isoform PKC δ a PKC ϵ při regulaci metabolismu glukózy.

2.2.4.2. PKC ϵ v ischemickém myokardu

O úloze PKC ϵ v kardioprotekci vyvolané IPC se dlouze spekulovalo. Počáteční výsledky byly kontroverzní a definitivní potvrzení přišlo až s použitím specifického antagonisty PKC ϵ zvaného ϵV_{1-2} . Aplikace agonisty PKC ϵ zvaného $\psi\epsilon RACK$ dokonce kardioprotekci vyvolávala ⁽⁴⁾.

Úloha PKC ϵ v mechanismu kardioprotekce pomocí chronické hypoxie však stále zůstává neobjasněna.

V mechanismu kardioprotektivního působení PKC ϵ patrně hraje roli konexin 43 a MPTP. Ukázalo se, že během hypoxie translokuje PKC ϵ na konexin 43 (Cx 43) a fosforyluje ho. Cx 43 je hlavní složkou „*gap junctions*“ kardiomyocytů. Fosforylace Cx 43 vede ke snížení vodivosti „*gap junctions*“ a mohla by tak zabraňovat šíření poškození během ischemie ^(4,52).

Jedním z cílů pro aktivovanou PKC ϵ jsou také MPTP. Zdá se, že PKC ϵ interaguje nejdříve s mitochondriálním K_{ATP} kanálem, což vede k toku K^+ do mitochondrií ⁽⁵²⁾. Zvyšuje se pH a následně dochází k tvorbě ROS, což vede k další aktivaci PKC ϵ , nyní lokalizované v mitochondriích. Výsledkem je fosforylace, a tedy inhibice MPTP ^(4,52).

PKC ϵ zároveň interaguje s cytochrom *c* oxidasou (CytCox), která je jako součást dýchacího řetězce klíčová v regulaci produkce ATP. PKC ϵ při aktivaci pomocí hypoxie interaguje se podjednotkou IV (CytCox IV), čímž zvyšuje její aktivitu. Tak pravděpodobně zvyšuje respiraci a tvorbu ATP.

Zvýšená aktivita PKC ϵ pravděpodobně zvyšuje aktivitu adeninnukleotid-translokasy, snižuje uvolnění cytochromu *c* a stabilizuje potenciál vnitřní mitochondriální membrány. Za určitých podmínek hraje PKC ϵ antiapoptotickou roli pomocí inhibice Bad ⁽⁵²⁾.

Translokace PKC ϵ na mitochondrie je spojena s aktivací aldehyddehydrogenasy-2. Tento enzym má podstatnou úlohu v detoxikaci a jeho aktivace by mohla přispívat ke kardioprotekci ⁽⁷⁰⁾.

PKC ϵ pravděpodobně hraje úlohu i v rozvoji hypertrofie ⁽⁷¹⁾.

3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Na základě studia dostupných literárních zdrojů byly určeny následující cíle této diplomové práce:

- ▶ ověřit změny v relativním zastoupení PKC δ a PKC ϵ v cytosolu, partikulární frakci a homogenátu myokardu levé komory potkana adaptovaného na dosud používaný model intermitentní hypobarické hypoxie 7000 m. Na tomto modelu dále analyzovat změny relativního zastoupení fosforylované PKC ϵ v cytosolu, partikulární frakci a homogenátu.
- ▶ na nově zavedeném modelu kontinuální a intermitentní normobarické hypoxie 5500 m (10 % O₂) sledovat relativní zastoupení PKC δ , PKC ϵ a fosforylované PKC ϵ v cytosolu, partikulární frakci a homogenátu myokardu levé komory potkana.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Laboratorní zvířata

K pokusům byli použiti dospělí samci laboratorního potkana kmene Wistar pocházející z chovu firmy Velaz. Hmotnost zvířat na počátku experimentu byla v rozmezí od 270 do 370 g. Zvířata měla volný přístup k vodě a ke standardní laboratorní dietě. Studie byla vedena ve shodě s „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” publikovaným *US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1996)* a byla schválena příslušnou komisí Fyziologického ústavu AV ČR.

4.2. Experimentální modely chronické hypoxie

Byly používány dva základní modely chronické hypoxie – hypobarická (výšková) hypoxie a normobarická hypoxie. Zatímco hypobarická komora z technických důvodů umožňuje pouze intermitentní vystavení zvířat hypoxickým podmínkám, normobarická hypoxie může být jak intermitentní, tak kontinuální.

4.2.1. Chronická normobarická hypoxie

Zvířata byla rozdělena do tří skupin:

► **kontinuální normobarická hypoxie 5500 m (KNH)** – zvířata byla vystavena nepřetržitému působení hypoxie za normobarických podmínek po dobu 4 týdnů. Obsah kyslíku byl snížen z normoxické hodnoty 21 % ($FIO_2 = 0,21$) na 10 % ($FIO_2 = 0,1$) pomocí generátorů hypoxie Everest Summit (Hypoxico Inc., N.Y., USA). Tento stupeň hypoxie odpovídá nadmořské výšce 5500 m. Během adaptace byla v komoře zajištěna cirkulace vzduchu a teplota byla udržována v rozmezí 21–23 °C.

► **intermitentní normobarická hypoxie 5500 m (INH)** – zvířata byla vystavena výše uvedeným podmínkám po dobu 4 týdnů 23 hod denně. Hypoxie byla každý den přerušena reoxygenací po dobu 60 min za normoxických podmínek ($FIO_2 = 0,21$).

► **normoxie** (N) – zvířata kontrolní skupiny byla po dobu 4 týdnů chována v normoxických podmínkách ($FIO_2 = 0,21$) při teplotě 21–23 °C.

4.2.2. Chronická hypobarická hypoxie

Zvířata byla rozdělena do dvou skupin:

► **intermitentní hypobarická hypoxie 7000 m (IHH)** - potkani byli vystaveni výškové hypoxii v hypobarické komoře. Adaptace probíhala 8 hod denně, 5 dní v týdnu; celkový počet expozičních cyklů byl 25. Barometrický tlak byl snižován postupně tak, aby po 13 expozičních odpovídal nadmořské výšce 7000 m. V této výšce má barometrický tlak hodnotu 40,9 kPa a parciální tlak kyslíku je 8,6 kPa. Během adaptace byla v komoře zajištěna cirkulace vzduchu a teplota byla udržována v rozmezí 21–23 °C.

► **normoxie** (N) – zvířata kontrolní skupiny byla po dobu 4 týdnů chována v normoxických podmínkách odpovídajících nadmořské výšce 200 m při teplotě 21–23 °C. Barometrický tlak zde byl 99 kPa a parciální tlak kyslíku 20,7 kPa.

4.3. Odběr tkáně

Potkani byli intraperitoneálně narkotizováni pentobarbitalem sodným (Sanofi, Francie) v dávce $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Srdce bylo vystřiženo z hrudníku, propláchnuto ledovým fyziologickým roztokem a po odstranění síní a velkých cév bylo rozděleno na septum (S), pravou komoru (RV) a levou komoru (LV). Ihned poté byly jednotlivé srdeční oddíly zváženy a zmrazeny v kapalném dusíku, kde byly uchovávány do dalšího zpracování.

4.4. Zdroje použitých chemikálií

V tabulce č. 2 jsou uvedeny použité chemikálie a jejich zdroje.

Tabulka č. 2 **Zdroje použitých chemikálií**

ZDROJ	CHEMIKÁLIE
C. Roth GmbH	kyselina trichloroctová (TCA)
Fluka	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)
Lach-Ner	HCl, NaOH
Lachema	aceton, CuSO ₄ , kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), glycerol, H ₂ O ₂ , kyselina octová, močovina, Na ₂ CO ₃ , persíran amonný (APS), sacharóza, vinan sodnodraselný
MERCK	deoxycholát sodný (SDC)
Penta	methanol, NaCl, zkoumadlo Folin-Ciocalteu
Sigma	akrylamid, albumin z hovězího séra (BSA), aprotinin, β-merkptoethanol, bromfenolová modř (BPB), dimethylsulfoxid (DMSO), dithiothreitol (DTT), dodecylsulfát sodný (SDS), kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová (EGTA), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), glycerol-3-fosfát, glycin, kyselina p-kumarová, leupeptin, luminol, N,N'-methylenbisakrylamid (Bisakrylamid), orthovanadát sodný, Ponceau 2S, standard molekulových hmotností, Triton X-100, Tween 20, 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris)
Spolana	NaF

4.5. Homogenizace a frakcionace tkáně

Tkáň byla homogenizována a frakcionována upraveným způsobem podle Alberta ⁽⁷²⁾ a Strassera ⁽⁷³⁾. Homogenizace i frakcionace byly provedeny v chladícím boxu při teplotě cca 6 °C. Zpracována byla vždy celá levá komora z jedné experimentální skupiny. Hmotnost levé komory se pohybovala v rozmezí 310–540 mg.

4.5.1. Homogenizace

Při homogenizaci byl použit pufr se sacharózou a s inhibitory proteas a fosfatas označený jako 3S.

4.5.1.1. Příprava homogenizačního pufru 3S

- Navážit Tris, EGTA, EDTA, NaF, sacharózu a glycerol-3-fosfát (tab. č. 3) a rozpustit ve zhruba 150 ml redestilované vody.
- Upravit pH na 7,4.
- Přidat β -merkaptoethanol a opět zkontrolovat pH.
- Přidat inhibitor fosfatas – aktivovaný orthovanadát (viz níže).
- Důkladně rozpustit inhibitory proteas – PMSF, leupeptin a aprotinin (vždy ve 100 μ l acetonu).
- Přidat k pufru rozpuštěné inhibitory proteas.

Tabulka č. 3 Složení 3S pufru

PŘÍSADA	MNOŽSTVÍ	KONCENTRACE
Tris	320,9 mg	12,5 mM
EGTA	190,4 mg	2,5 mM
EDTA	58,4 mg	1,0 mM
NaF	840,0 mg	100 mM
sacharóza	17,1 g	250 mM
glycerol-3-fosfát	432,1 mg	10 mM
β-merkaptoethanol	84,2 μ l	6 mM
orthovanadát	0,1 ml 0,2 M roztoku	0,1 mM
PMSF	5,2 mg	300 μ M
leupeptin	19,0 mg	200 μ M
aprotinin	26,4 mg	20 μ M

Aktivace orthovanadátu

Jelikož jedním z cílů bylo stanovit relativní množství fosforylované PKC ϵ (P – PKC ϵ), bylo nutné ve vzorcích inhibovat fosfatasy. K tomuto účelu jsme použili orthovanadát. Pro jeho správnou funkci je třeba orthovanadát aktivovat – zajistit přítomnost jeho monomerů.

Postup:

- Připravit si roztok orthovanadátu o potřebné koncentraci. Vznikne bezbarvý roztok.
- Pomocí HCl upravit pH na 10. Vznikne žlutý roztok dekavanadátu.
- Žlutý roztok zahřívát, dokud nedojde k jeho opětovnému odbarvení – depolymeraci dekavanadátu. Poté je orthovanadát aktivovaný.

4.5.1.2. Homogenizační postup

1. Třecí misku nejdříve vychladit kapalným dusíkem. Do misky vložit tkáň, misku překrýt alobalem, abychom zabránili ztrátám, a tkáň pomocí tloučku rozdrtit na jemný prášek. Dbát na to, aby byla tkáň neustále v kapalném dusíku.
2. K rozdrčené tkáni přidat pufr 3S v poměru 8 ml pufru na 1 g srdeční tkáně. Suspenzi rozdrčené tkáně s pufrem 3S převést do homogenizační zkumavky.
3. Homogenizovat v Potter-Elvehjemově homogenizátoru 15 tahy během 1 min. Chladit v ledové lázni.

4.5.2. Frakcionace

Schéma frakcionačního postupu je znázorněno na obrázku č. 3.

4.5.2.1. Postup frakcionace

1. Do předem vychlazené centrifugační zkumavky odebrat na extrakci 300 μ l homogenátu, zbytek homogenátu (H) centrifugovat 1,5 hod při 100 000 \times g ve vakuu (Beckman L7). Získáme cytosol (C).
2. Cytosol, resp. supernatant, odebrat do předem vychlazené mikrozkušavky (Eppendorf) a přidat Triton X-100 tak, aby jeho výsledná koncentrace v cytosolu byla 1 %. Pelet po cytosolu označen CP.

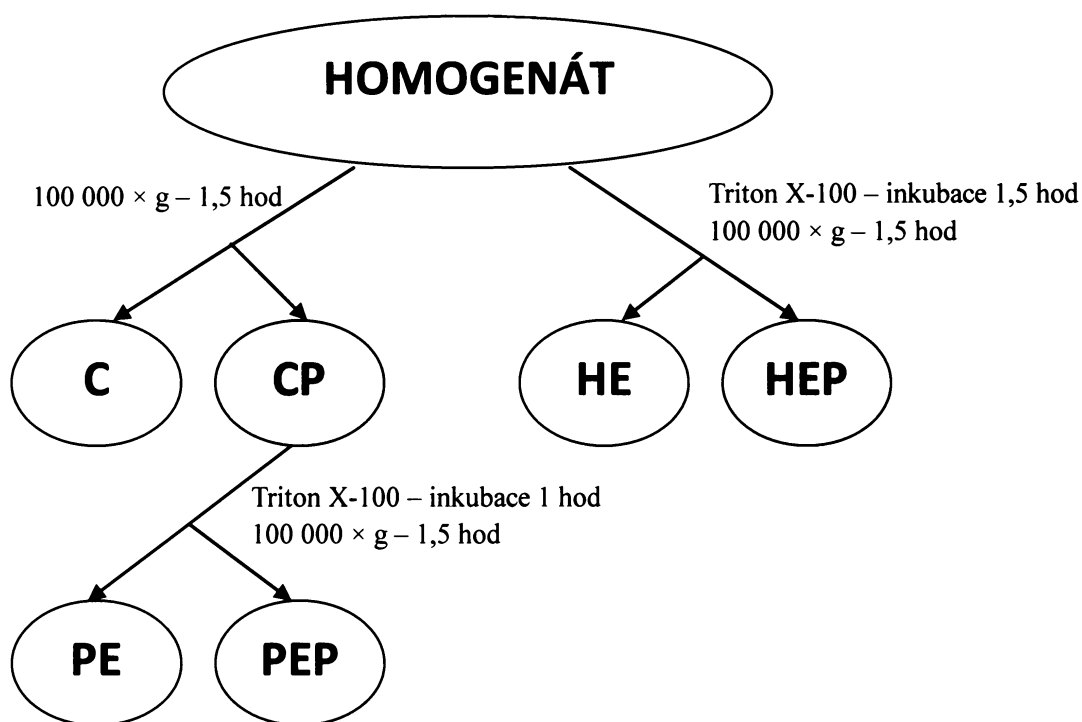
Příprava extraktů

Z partikulární frakce a z části homogenátu (300 μ l) připravit extrakty. K přípravě těchto extraktů použít pufr označený jako 3ST 1 % (Triton X-100 v pufru 3S v koncentraci 1 %).

Postup:

1. Partikulární frakci ve formě peletu po cytosolu (CP) rozsuspendovat v 3ST 1 % pufru v poměru 1 μ l 3ST 1 % pufru na 8 μ l centrifugovaného homogenátu. Pelet promíchat pomocí kovové špachtle, 3krát po dobu 10 s sonikovat v ledové lázni sonikátorem (Elma S10H, Elmasonic). Nechat 1 hod stát v ledové lázni. Poté centrifugovat 1,5 hod při 100 000 \times g ve vakuu (Beckman L7). Supernatant je extraktem partikulární frakce (PE).
2. Pelety po extrakci partikulární frakce (PEP) rozsuspendovat v 3ST 1 % pufru v poměru 1 μ l 3ST 1 % pufru na 4 μ l centrifugovaného homogenátu. Pelet promíchat pomocí kovové špachtle, 3krát po dobu 10 s sonikovat v ledové lázni sonikátorem (Elma S10H, Elmasonic).
3. K 300 μ l homogenátu přidat Triton X-100 tak, aby zde jeho výsledná koncentrace byla 1 %. Promíchat na vortexu a nechat 1 hod stát v ledové lázni. Poté centrifugovat 1,5 hod při 100 000 \times g ve vakuu (Beckman L7). Supernatant je extraktem homogenátu (HE).
4. K peletu po extrakci homogenátu (HEP) přidat 150 μ l 3ST 1 %, rozsuspendovat pomocí kovové špachtle, 3krát po dobu 10 s sonikovat v ledové lázni sonikátorem (Elma S10H, Elmasonic).

Obrázek č. 3 Schéma frakcionačního postupu



C – cytosol, CP – pelet po cytosolu, HE – extrakt homogenátu, HEP – pelet po extrakci homogenátu, PE – extrakt partikulární frakce, PEP – pelet po extrakci partikulární frakce.

Z extraktů frakcí odebrat do předem vychlazených mikrozkušavek (Eppendorf) alikvoty na stanovení relativního zastoupení PKC δ , PKC ϵ a P – PKC ϵ . Objemy alikvotů se lišily u jednotlivých frakcí: C – 30 μ l, HE – 20 μ l a PE – 20 μ l.

Z cytosolu (C), homogenátu (H), extraktů homogenátu (HE), extraktů partikulární frakce (PE) i z rozsuspendovaných peletů po extrakci homogenátu (HEP) a extrakci partikulární frakce (PEP) odebrat do předem vychlazených mikrozkušavek (Eppendorf) alikvoty na stanovení množství proteinů. Objemy alikvotů se lišily u jednotlivých frakcí: C – 15 μ l, H – 5 μ l, HE – 10 μ l, PE – 10 μ l, HEP – 5 μ l, PEP – 2 μ l. Všechny odebrané vzorky byly do dalšího zpracování uloženy při -80 °C.

Analýza relativního zastoupení isoform PKC byla provedena v cytosolu, extraktu partikulární frakce a extraktu homogenátu. Pro zjednodušení jsou extrakty partikulární

frakce a homogenátu dále v textu (výsledky, diskuze) označeny již jen jako partikulární frakce a homogenát.

4.6. Stanovení koncentrace proteinů

Stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích bylo provedeno metodou podle Petersona a spol. ⁽⁷⁴⁾. Jde o modifikovanou metodu podle Lowryho a spol. ⁽⁷⁵⁾ pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích obsahujících detergenty.

4.6.1. Princip metody

Lowryho metoda stanovení koncentrace proteinů využívá Folinovo fenolové reagens, které poskytuje s tyrosinovými zbytky bílkovin modrofialově zbarvený produkt, který je spektrofotometricky měřitelný při vlnové délce 750 nm. Metoda je empirická a před použitím je nutné sestavit kalibrační křivku pro roztoky hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci 0–30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

Modifikace metody spočívá v odstranění detergentů po precipitaci stanovovaných proteinů kyselinou trichloroctovou (TCA). Přítomnost deoxycholátu sodného (SDC) v precipitačním činidle vytváří vhodné prostředí pro rychlou denaturaci membránových proteinů.

Stanovení se provádí v mikrozkušavkách Eppendorf v tripletech. Ke každé sérii stanovení je třeba provést analýzu blanku a standardu.

Zásobní roztoky pro stanovení proteinů:

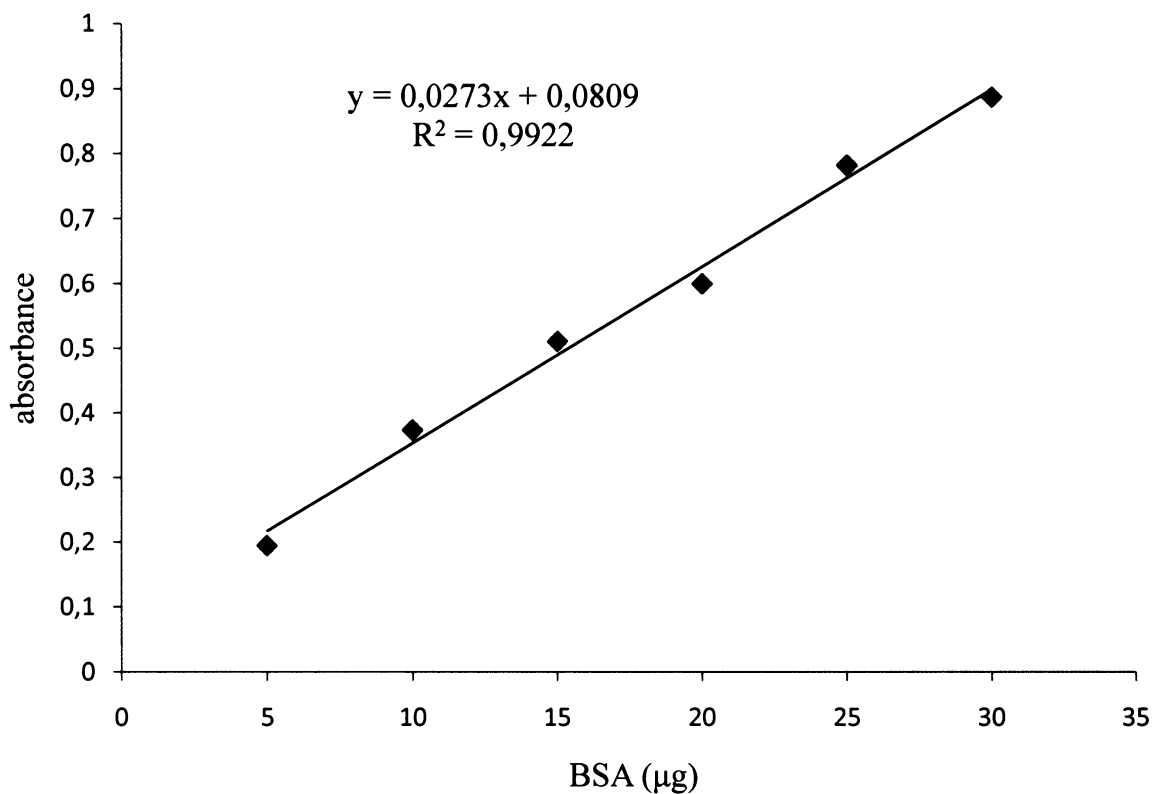
- fenolové reagens (Folin-Ciocalteu)
- 0,8 M NaOH
- 10 % SDS
- zásobní roztok alkalického činidla (20 % Na_2CO_3 + 0,2 % CuSO_4 s 0,4 % vinanem sodnodraselným v poměru 1:1)

Pracovní roztoky:

- 0,15 % SDC
- homogenizační pufr 3ST 1 %

- roztok A (10 % SDS + 0,8 M NaOH + zásobní roztok alkalického činidla + redistilovaná voda v poměru 1:1:1:1)
- roztok B (fenolové reagens + redistilovaná voda v poměru 1:6)
- standard BSA (0,5 mg.ml⁻¹)
- 72 % TCA

Graf č. 1 Kalibrační křivka stanovení proteinů podle Lowryho v modifikaci podle Petersona



Každý bod kalibrační přímky je průměrem ze tří stanovení. BSA – hovězí sérový albumin, R^2 – hodnota spolehlivosti.

4.6.2. Postup stanovení

1. Měřený vzorek naředit redestilovanou vodou (Millipore Elix S Packname Progard[®] 2), aby bylo množství proteinu v rozmezí 1–20 µg na 200 µl. Promíchat na vortexu.
2. Stanovení provést v tripletech, do mikrozkušavek napipetovat 200 µl naředěného vzorku.
3. Připravit si triplety standardu (20 µl roztoku BSA, 5 µl homogenizačního pufru 3ST 1 % a 175 µl redestilované vody) a blanku (5 µl homogenizačního pufru 3ST 1 % a 195 µl redestilované vody). Promíchat na vortexu. Stanovení obsahu proteinů ve standardu a blanku provést pro kontrolu při každém jednotlivém stanovení.
4. Přidat 20 µl 0,15 % SDC. Promíchat na vortexu a nechat 10 min inkubovat.
5. Přidat 20 µl 72 % TCA, promíchat na vortexu (vytvoří se zákal sraženiny).
6. Centrifugovat na mikrocentrifuze (Eppendorf Centrifuge 5415D) 10 min při 7000 × g.
7. Opatrně odlít supernatant tak, aby zůstal celý pelet usazený na dně mikrozkušavky. Horní okraj mikrozkušavek osušit do buničiny.
8. Přidat 200 µl redestilované vody.
9. Přidat 200 µl roztoku A, důkladně promíchat na vortexu, centrifugovat na mikrocentrifuze (Eppendorf Centrifuge 5415D) 1 min při 7000 × g. Poté nechat inkubovat 10 min.
10. Přidat 100 µl roztoku B, promíchat na vortexu a nechat inkubovat ve tmě 30 min.
11. Změřit absorbanci (spektrofotometr α-Helios, Chromspec) při 750 nm proti redestilované vodě. Nejdříve změřit blank, poté standard a následně jednotlivé vzorky.
12. Z kalibrační křivky odečíst koncentrace proteinů ve standardu a v jednotlivých vzorcích (program Microsoft Excel 2007).

4.7. Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE)

Elektroforetické dělení proteinů jednotlivých vzorků bylo prováděno na plochých polyakrylamidových gelech v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS) v elektroforetické soustavě Mini-PROTEAN 3 Cell firmy Bio-Rad[®] metodou podle Ogity a Markerta ⁽⁷⁶⁾. Koncentrace polyakrylamidu ve startovacím gelu byla 4 %, v dělicím gelu 10 %. Rozměry gelů byly 65 × 85 × 0,75 mm.

4.7.1. Příprava gelů

1. Zásobní roztoky (tab. č. 4) uchovávané v lednici při 4 °C nechat vytemperovat na laboratorní teplotu.
2. V kalibrované zkumavce si připravit roztok na dělicí gel. Napipetovat 3,32 ml roztoku I, 2,49 ml roztoku II a 4,15 ml redestilované vody. Vše důkladně promíchat na vortexu.
3. Přidat 7 µl roztoku IV, opět promíchat na vortexu.
4. Přidat 70 µl roztoku III, důkladně promíchat na vortexu a ihned nalít mezi skla v aparatuře na elektroforézu. Gel by měl sahat do výšky zhruba 1 cm pod okraj skel. Pomocí injekční stříkačky roztok opatrně převrstvit redestilovanou vodou.
5. Gel nechat alespoň 40 min polymerovat.
6. Po zpolymerování gelů odlít převrstvující vodu. Zbytek vody opatrně vysušit pomocí filtračního papíru a dbát na to, aby se filtrační papír nedotkl samotného gelu.
7. V kalibrované zkumavce připravit roztok pro startovací gel. Smíchat 0,65 ml roztoku I, 1,25 ml roztoku V a 3,05 ml redestilované vody. Promíchat na vortexu.
8. Přidat 5 µl roztoku IV, promíchat na vortexu.
9. Přidat 50 µl roztoku III, důkladně promíchat na vortexu, roztokem zaplnit zbývající prostor mezi skly a zasunout hřebínek pro vytvoření 15 vzorkových kapes. Dna kapes by měla být asi 3 mm nad povrchem dělicího gelu.
10. Nechat alespoň 20 min polymerovat.

11. Po zpolymerování startovacího gelu opatrně vyjmout hřebínky. Pomocí injekční stříkačky propláchnout vzniklé jamky v gelu redestilovanou vodou, a odstranit tak kousky gelu v jamkách a vzduchové bublinky.
12. Aparát ponořit do elektroforetické vany s vychlazeným elektrodoým pufrém (roztok VI).

4.7.2. Příprava vzorků pro elektroforézu

1. Vzorky vyjmout z hlubokomrazícího boxu (-80 °C) a nechat je rozmrazit.
2. Vzorky centrifugovat 30 s při 7000 × g.
3. Podle stanoveného obsahu proteinů vzorky zředit vzorkovým pufrém, obvykle ředit v poměru 1 díl vzorku ke 2–8 dílům vzorkového pufru (roztok VII). Promíchat na vortexu.
4. Vzorky vařit 3 min ve vodní lázni.
5. Centrifugovat 30 s při 7000 × g.
6. Takto připravené vzorky nanést do jamek ve startovacím gelu. Vzorek před nanesením důkladně promíchat na vortexu. Nanášet pipetou se speciálními špičkami pro nanášení na gel. Obvyklé nanášené množství proteinu bylo pro PKC δ 7–15 µg proteinu, pro PKC ε 10–17 µg proteinu a pro P – PKC ε 40–50 µg proteinu z každé frakce.
7. Stejným způsobem nanést i 5 µl standardu a 5 µl tritonového extraktu homogenátu mozku potkana (pozitivní kontrola).
8. K elektroforetické vaně připojit stabilizovaný zdroj stejnosměrného napětí a nastavit tyto parametry:

proud:	10 mA/gel (dokud se nezapustí vzorky do dělicího gelu, cca 10 min)
	20 mA/gel (po zapuštění vzorků do dělicího gelu)
napětí:	250 V
čas:	cca 1 hod 45 min

9. Po skončení elektroforézy vypnout zdroj napětí a vyjmout aparát z elektroforetické vany. Opatrně oddělit krycí skla od gelů, gely propláchnout pomocí stříčky redestilovanou vodou a přenést je do plastové misky Sterilin® naplněné roztokem VIII.

Tabulka č. 4 **Roztoky pro SDS-PAGE**

ROZTOK	POPIS	PŘÍPRAVA
I	30 % (w/v) akrylamid, 0,8 % (w/v) bisakrylamid	30 g akrylamidu, 0,8 g bisakrylamidu, doplnit do 100 ml, přefiltrovat přes filtrační papír.
II	pufr 1,5 M Tris (+ HCl), 0,4 % (w/v) SDS, pH 8,8	45,5 g Tris rozpustit v cca 150 ml redestilované vody, upravit pH pomocí HCl na 8,8, doplnit objem na 250 ml, přidat 1 g SDS.
III	roztok APS	75 mg APS rozpustit v 750 µl redestilované vody.
IV	TEMED	
V	pufr 0,5 M Tris (+ HCl), 0,4 % (w/v) SDS, pH 6,8	6,05 g Tris rozpustit v cca 40 ml redestilované vody, pomocí HCl upravit pH na 6,8, doplnit objem redestilovanou vodou do 100 ml, přidat 0,4 g SDS.
VI	elektrodový pufr (5 × koncentrovaný) – 0,1 M Tris, 0,5 % (w/v) SDS, 0,96 M glycin, pH 8,3	15,1 g Tris, 72 glycinu a 5 g SDS, doplnit objem redestilovanou vodou do 1 l.
VII	vzorkový pufr – 0,3 M Tris, 13 % (v/v) glycerol, 0,2 % (w/v) BPB, 1,3 % (v/v) β-merkptoethanol, pH 6,8	0,91 g Tris, 2,5 g SDS, 3,25 ml glycerolu, 0,32 ml β-merkptoethanolu; doplnit redestilovanou vodou do cca 20 ml, upravit pH pomocí HCl na 6,8, přidat 0,05 g BPB, doplnit objem redestilovanou vodou do 25 ml.
Standard	vzorkový roztok barevných standardů molekulových hmotností (M.W.)	balení M.W. standardů (Sigma) rozpustit v 0,5 ml 8 M močoviny, přidat 0,5 ml roztoku VII, rozdělit na 10 µl alikvoty, skladovat při -40 °C, před použitím povařit 3 min ve vodní lázni, dále skladovat při 4 °C.

4.8. Přenos proteinů na nitrocelulózkové membrány (Western Blotting)

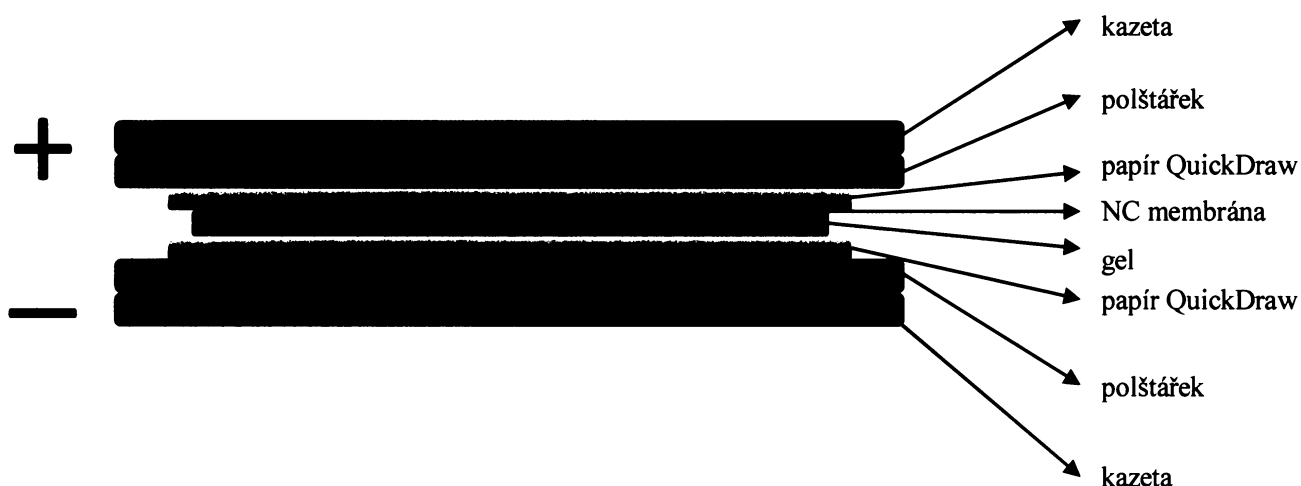
Elektropřenos proteinů na nitrocelulózkové membrány byl prováděn metodou podle Towbina ⁽⁷⁷⁾ v elektropřenosové soupravě AmershamTM pro ECL. Použité roztoky a jejich příprava jsou uvedeny v tabulce č. 5.

4.8.1. Postup

1. Po skončení elektroforézy ekvilibrovat gely alespoň 5 min v plastové misce Sterilin[®] v roztoku VIII.
2. Z nitrocelulózkové (NC) membrány HybondTM ECLTM a z papíru QuickDraw^(tm) nastříhat obdélníky o rozměrech 65 x 85 mm.
3. Sestavit sendvič pro elektropřenos (obr. č. 4). Sestavení provést ve velké Petriho misce naplněné asi do poloviny pufrem VIII tak, aby byl sendvič stále ponořen. Každou vrstvu před přiložením další přelit přenosovým pufrem, po sendviči opatrně přejet zkumavkou, a odstranit tak bublinky, které by bránily přenosu. Sestavené sendviče převázat pomocí gumiček. Je třeba dosáhnout rovnoměrného tlaku, aby byl dobrý kontakt zejména mezi gelem a membránou.
4. Sendviče zasunout do vany pro elektropřenos naplněné vychlazeným roztokem VIII. Celou vanu umístit do ledové lázně.
5. K vaně připojit stabilizovaný zdroj napětí a nastavit přenosové podmínky:

proud:	350 mA
napětí:	100 V
čas:	1 hod
6. Odpojit od zdroje a rozebrat jednotlivé sendviče. Membrány přenést na zhruba 20 s do roztoku IX. Obarvení membrány roztokem Ponceau 2S slouží ke kontrole přenosu proteinů. Membrány opláchnout v redestilované vodě.

Obrázek č. 4 Sendvič pro elektropřenos proteinů na NC membrány



Tabulka č. 5 Roztoky pro elektropřenos proteinů na NC membrány

ROZTOK	POPIS	PŘÍPRAVA
VIII	přenosový pufr – 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 20 % (v/v) methanol, pH 8,3	6,07 g Tris, 28,8 g glycinu, 400 ml methanolu, doplnit redestilovanou vodou do 2 l, pH neupravovat.
IX	0,1 % (w/v) červeň Ponceau 2S v 1 % (v/v) kyselině octové	5 ml ledové kyseliny octové zředit redestilovanou vodou, za současného míchání rozpustit 500 mg Ponceau 2S, doplnit redestilovanou vodou do 500 ml.

4.9. Imunodetekce

Imunodetekce PKC δ , PKC ϵ a P – PKC ϵ na NC membránách byla prováděna podle doporučených standardních postupů – podle návodu firmy AmershamTM pro ECL⁽⁷⁸⁾, a podle návodu firmy Bio-Rad[®] pro Immun-Blot[®] (79). Veškeré inkubace a promývání membrán byly prováděny za míchání na laboratorní kývačce ve čtvercových plastových miskách Sterilin[®] o rozměru 100 × 100 mm. Použité primární protilátky pro PKC δ a PKC ϵ byly ředěny 1:6600, pro P – PKC ϵ 1:2000. Sekundární protilátka byla ředěna 1:6000. Popis a složení roztoků používaných při imunodetekci jsou uvedeny v tabulce č. 6.

4.9.1. Protilátky

Primární antiséra proti isoformám PKC:

PKC δ delipidizované králičí antisérum (Sigma) proti syntetickému peptidu Lys-Ser-Phe-Val-Asn-Pro-Lys-Tyr-Glu-Gln-Phe-Leu-Glu odpovídajícímu aminokyselinám 662–673 (s přidaným Lys na N-konci) C-terminální oblasti (V5) potkaní PKC δ , konjugovanému s hemocyaninem.

PKC ϵ delipidizované králičí antisérum (Sigma) proti syntetickému peptidu Lys-Gly-Phe-Ser-Tyr-Phe-Gly-Glu-Asp-Leu-Met-Pro odpovídajícímu aminokyselinám 726–737 V5 oblasti lidské, myší a potkaní PKC ϵ , konjugovanému s hemocyaninem.

P – PKC ϵ (Ser 729) králičí antisérum (Upstate Signalling) proti syntetickému peptidu Cys-Lys-Gly-Phe-pSer-Tyr-Phe-Gly-Glu-Asp-Leu odpovídajícímu aminokyselinám 725–735 lidské a potkaní PKC ϵ .

Konjugát sekundární protilátky:

SwARb-Px chromatograficky čištěná imunoglobulinová frakce z prasečího antiséra (Sigma) proti králičím imunoglobulinům, konjugovaná oxidační metodou s křenovou peroxidasou (HRP).

4.9.2. Postup imunodetekce PKC δ , PKC ϵ a P – PKC ϵ

1. Membrány blokovat v roztoku M 1 hod. Na 1 membránu použít 50 ml roztoku M.
2. Membrány promýt 3krát krátce v roztoku TTBS. Toto opakovat 2krát v intervalech po 5 min.
3. Připravit si roztok primární protilátky. Na jednu membránu použít 1,5 μ l primárního antiséra v 10 ml TTBS (pro PKC δ a PKC ϵ) a 5 μ l primárního antiséra (pro P – PKC ϵ) v 10 ml TTBS.
4. Membrány s primární protilátkou inkubovat 1,5 hod. Pro stanovení P – PKC ϵ následně nechat membránu v primární protilátce přes noc do druhého dne.
5. Membrány promýt 3krát krátce v roztoku TTBS. Toto opakovat 2krát v intervalech po 5 min.
6. Připravit roztok sekundární protilátky v TTBS.
7. Membrány inkubovat v roztoku sekundární protilátky 1 hod.
8. Membrány promýt 3krát krátce v roztoku TTBS. Toto opakovat 2krát v intervalech po 5 min.

Tabulka č. 6 **Roztoky pro imunodetekci**

ROZTOK	POPIS	PŘÍPRAVA
TTBS	pufrovaný roztok NaCl – 0,1 M Tris, 2,5 M NaCl, 0,5 % (v/v) Tween 20; pH 7,5	12,1 g Tris, 146,1 g NaCl, doplnit redestilovanou vodou do cca 800 ml, upravit pH pomocí HCl na 7,5. Přidat 5 ml Tweenu 20 a doplnit redestilovanou vodou do objemu 1 l.
M	blokovací roztok – 5 % (w/v) sušené mléko v TTBS	2,5 g nízkotučného sušeného mléka v 50 ml TTBS.

4.10. Metoda zesílené chemiluminiscence (ECL)

4.10.1. Princip metody

ECL (enhanced chemiluminiscence) je firmou AmershamTM patentovaná metoda detekce peroxidasové aktivity prostřednictvím chemiluminiscence za přítomnosti zesilovačů. Luminiscence je definována jako emise světla vznikající disipací energie molekuly chemické látky v excitovaném stavu. Metoda ECL používá cyklického diacylhydrazidu luminolu, který je v mírně alkalickém prostředí oxidován peroxidem vodíku za katalýzy HRP. Produkt oxidace je v excitovaném stavu, ze kterého přechází emisí světla do základního stavu. K zesílení chemiluminiscence dochází za přítomnosti látek na bázi fenolů. Díky tomu se světelný tok zvýší asi 1000krát a prodlouží dobu emise ve srovnání s reakcí bez zesilovačů. Luminiscence v tomto systému dosahuje maxima po 5 až 20 min a poté pomalu klesá s poločasem cca 60 min. Maximum emise má vlnovou délku 428 nm, a je tedy zachytitelné na film citlivý k modrému světlu (autoradiografický nebo rentgenový film). Tato metoda se používá téměř výhradně při detekci různých antigenů na membránách pomocí konjugátů sekundárních protilátek s HRP v dvoustupňovém systému: primární protilátka proti detekovanému antigenu/konjugát sekundární protilátky proti primární protilátce s HRP.

4.10.2. Postup ECL

Při ECL jsme postupovali podle instrukcí výrobce AmershamTM pro ECL ⁽⁷⁸⁾. Některé doporučené materiály jsme však nahradili jejich ekonomicky výhodnějšími ekvivalenty. Místo fólie SaranWrapTM jsme použili běžnou potravinovou fólii. Membrány byly exponovány na film Medical X-Ray Film od firmy Foma. Bylo provedeno vždy několik různě dlouhých expozic, aby byl zachycen optimální rozsah denzitometrických objemů pro kvantitativní vyhodnocení.

Pro PKC δ , PKC ϵ a P – PKC ϵ byla vyzkoušena optimální doba expozice. Jako výchozí doba byla zvolena expozice 1 min. Vždy bylo exponováno několik filmů v časech okolo optima.

Při vyvolávání filmů byl použit přístroj Fomei Optima X-Ray Film Procesor[®] od firmy Protec Medizintechnik GmbH & Co. KG. Roztoky použité při ECL jsou uvedeny v tabulce č. 7.

1. Membrány po imunodetekci nechat okapat a pinzetou je přenést proteinovou stranou nahoru na opláchnuté víčko misky Sterilin®.
2. Smícháním 1,5 ml roztoku X a 1,5 ml roztoku XI připravit čerstvý roztok pro detekci. Důkladně promíchat.
3. Detekční roztok nalít na připravenou membránu a nechat reagovat 1 min.
4. Membránu nechat okapat a pinzetou přenést na fólii tak, aby mezi lícovou stranou membrány a fólií nebyly bubliny a záhyby.
5. Zabalenou membránu vložit do papírové autoradiografické kazety a za tmy na membránu přiložit autoradiografický film. Kazetu zavřít a zatížit. Nechat potřebnou dobu exponovat.
6. Exponovaný film za tmy vložit do přístroje Fomei Optima X-Ray Film Procesor® a vyčkat, dokud se film nevyvolá.

Tabulka č. 7 Složení roztoků pro ECL

ROZTOK	POPIS	SLOŽENÍ
1	2,5 mM luminol v 0,1 M Tris, pH 8,8	22,5 mg luminolu v 0,5 ml DMSO, doplnit 0,1 M Tris (pH 8,8) do 50 ml.
2	90 mM kyselina p-kumarová	18,5 mg kyseliny p-kumarové v 1,25 ml DMSO.
X	50 ml roztoku 1 + 220 μ l roztoku 2	
XI	5,4 mM H ₂ O ₂ v 0,1 M Tris, pH 8,8	30,6 μ l 30 % (v/v) H ₂ O ₂ v 50 ml 0,1 M Tris (pH 8,8).

4.11. Skenování filmů na stolním skeneru

Filmy s ECL byly označeny a skenovány na skeneru Epson Perfection 1240 U[®].

4.11.1. Postup

Film skenovat za těchto podmínek:

jas:	138
kontrast:	146
typ obrazu:	Black & White Photo
nastavení:	adaptér pro pozitivní film
rozlišení:	300 dpi
rozměry:	100 %
formát:	8bit TIFF uncompressed (přípona .tif)

4.12. Vyhodnocení signálu

Vyhodnocení denzitometrického objemu skvrn na filmu bylo prováděno pomocí programu ImageQuant.

4.12.1. Postup

1. Soubor s příponou .tif s naskenovaným obrazem filmu otevřít a zobrazit v paletě Pseudo ve falešných barvách mapujících odstíny šedi.
2. Skvrny PKC δ , PKC ϵ a P – PKC ϵ ohraničit objektem typu Rectangle (okolo největší skvrny vytvořit pomocí myši obdélník). Překopírovat tento objekt na všechny ostatní hodnocené skvrny na filmu.
3. Objekty skvrn označit čísla stop a uložit.
4. Provést objemovou integraci na označených skvrnách s automatickým odečtem hodnoty pozadí. Jako hodnota pozadí pro danou skvrnu je brán průměr hodnot pixelů ležících pod obdélníkem ohraničujícím skvrnu (nastavení Local Background). Výsledkem integrace je bezrozměrná hodnota – denzitometrický objem (D.V.) skvrny, získaný sečtením hodnot všech pixelů zahrnutých do skvrny, zmenšený o hodnotu pozadí.

4.13. Zpracování dat

Zpracování dat pro jednotlivé filmy bylo částečně automatizováno systémem vzorců provádějících korekce, přepočty na nanášku 1 μg proteinu a výpočty průměru. Data byla zpracována v programu Microsoft Excel 2007, pomocí kterého byly také vynášeny grafy. Denzitometrický objem skvrny byl přepočítán na 1 μg aplikovaného celkového proteinu vzorku. Grafy a tabulky (v kapitole 5) jsou uvedeny v arbitrárních jednotkách nebo jako poměry relativního zastoupení v partikulární frakci k cytosolu, popř. poměry relativního zastoupení P – PKC ϵ k celkové PKC ϵ v dané frakci. Arbitrární jednotky jsou dány součtem hodnocených denzitometrických objemů, který je roven 100. Poměry relativního zastoupení vyjadřují poměr daných denzitometrických objemů (přepočítaných na 1 μg proteinu).

4.14. Statistické zpracování výsledků

Výsledky byly statisticky zpracovány s využitím programů Jandel Scientific SigmaStat a Microsoft Excel 2007. Výsledky byly vyjádřeny jako aritmetický průměr, rozptyl dat jako střední chyba průměru (S.E.M.). Významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena pomocí jednocestné analýzy variance a následného Student-Newman-Keulsova testu. Za statisticky významný byl považován rozdíl s hladinou významnosti menší než 0,05 ($p < 0,05$).

5. VÝSLEDKY

5.1. Hmotnostní parametry

5.1.1. Adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m

Tabulka č. 8 ukazuje vliv intermitentní hypobarické hypoxie 7000 m (IHH) na hmotnostní parametry pokusných potkanů. Adaptace na IHH vedla ke zpomalení růstu: hmotnost těla (BW) klesla na 88 % hodnoty normoxických potkanů. Vyšší hmotnost srdce (HW) u zvířat hypoxické skupiny (126 % hodnoty normoxických potkanů) byla zapříčiněna především hypertrofií pravé komory (157 % normoxické kontroly). U hypoxické skupiny mírně vzrostla i hmotnost levé komory (125 % normoxické hodnoty). Relativní hmotnost srdce (HW/BW) se po adaptaci na IHH zvýšila na 143 %, relativní hmotnost pravé komory na 176 % a relativní hmotnost levé komory na 141 % normoxické kontroly.

Tabulka č. 8 Hmotnostní parametry po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m

parametry	N	IHH
n	7	7
BW (g)	350 ± 10	307 ± 5*
HW (mg)	747 ± 13	944 ± 44*
RV (mg)	159 ± 6	250 ± 13*
LV (mg)	411 ± 7	512 ± 33*
S (mg)	177 ± 7	182 ± 11
HW/BW (mg/g)	2,14 ± 0,05	3,07 ± 0,11*
RV/BW (mg/g)	0,46 ± 0,02	0,81 ± 0,04*
LV/BW (mg/g)	1,18 ± 0,03	1,66 ± 0,09*
S/BW (mg/g)	0,51 ± 0,02	0,59 ± 0,03
RV/LV (mg/mg)	0,39 ± 0,02	0,49 ± 0,02*

Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± S.E.M. N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie 7000 m, n – počet zvířat ve skupině, BW – hmotnost těla, HW – hmotnost srdce, RV – pravá komora, LV – levá komora, S – septum, HW/BW – relativní hmotnost srdce, RV/BW – relativní hmotnost pravé komory, LV/BW – relativní hmotnost levé komory, S/BW – relativní hmotnost septa.

* – statisticky významný rozdíl IHH vs. N ($p < 0,05$).

5.1.2. Adaptace na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m

Tabulka č. 9 ukazuje vliv kontinuální normobarické hypoxie 5500 m (KNH) a intermitentní normobarické hypoxie 5500 m (INH) na hmotnostní parametry pokusných potkanů. Adaptace na KNH ani na INH neovlivnila hmotnost těla a srdce potkanů. Hmotnost pravé komory byla vyšší u KNH (121 % hodnoty normoxických potkanů) i u INH (120 % hodnoty normoxických potkanů). Relativní hmotnost pravé komory se zvýšila u KNH i INH (130 %, resp. 126 % normoxické hodnoty).

Tabulka č. 9 Hmotnostní parametry po adaptaci na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m

parametry	N	KNH	INH
n	8	8	8
BW (g)	335 ± 9	310 ± 12	316 ± 7
HW (mg)	720 ± 25	685 ± 24	694 ± 30
RV (mg)	153 ± 5	185 ± 8*	184 ± 14*
LV (mg)	382 ± 19	334 ± 13	345 ± 16
S (mg)	185 ± 5	166 ± 8	165 ± 5*
HW/BW (mg/g)	2,15 ± 0,03	2,21 ± 0,04	2,19 ± 0,07
RV/BW (mg/g)	0,46 ± 0,01	0,60 ± 0,02*	0,58 ± 0,04*
LV/BW (mg/g)	1,14 ± 0,03	1,08 ± 0,03	1,09 ± 0,03
S/BW (mg/g)	0,56 ± 0,02	0,53 ± 0,01	0,52 ± 0,02
RV/LV (mg/mg)	0,41 ± 0,02	0,55 ± 0,02*	0,53 ± 0,03*

Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± S.E.M. N – normoxie, KNH – kontinuální normobarická hypoxie 5500 m, INH – intermitentní normobarická hypoxie 5500 m, n – počet zvířat ve skupině, BW – hmotnost těla, HW – hmotnost srdce, RV – pravá komora, LV – levá komora, S – septum, HW/BW – relativní hmotnost srdce, RV/BW – relativní hmotnost pravé komory, LV/BW – relativní hmotnost levé komory, S/BW – relativní hmotnost septa.

* – statisticky významný rozdíl KNH (popř. INH) vs. N ($p < 0,05$).

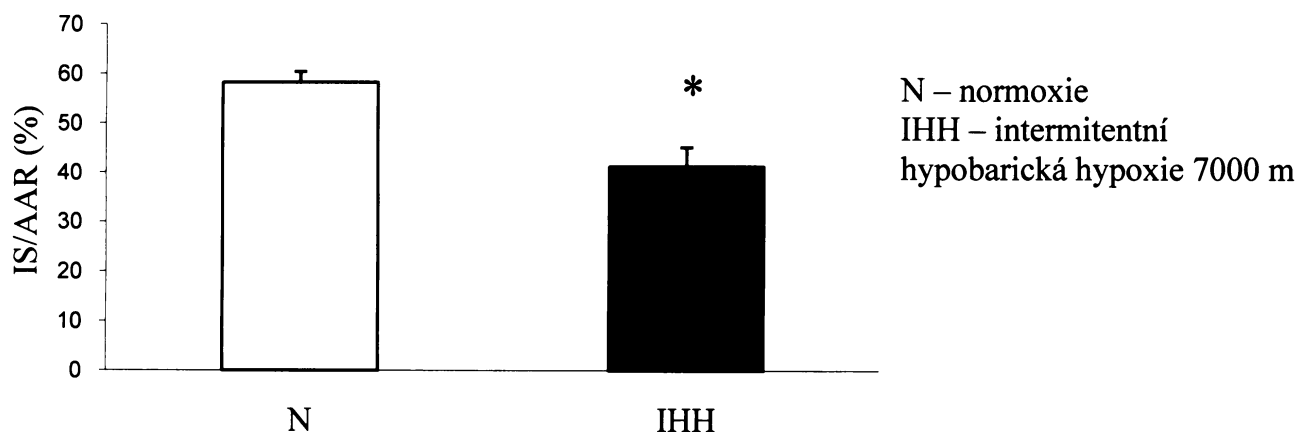
5.2. Velikost infarktu

U pokusných potkanů byla stanovena velikost infarktu vyjádřená jako velikost nekrotické oblasti (IS, „*infarct size*“) vztážená na velikost oblasti ischemií ohrožené (AAR, „*area at risk*“). Toto stanovení bylo provedeno Oddělením vývojové kardiologie Fyziologického ústavu AV ČR v Praze.

5.2.1. Adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m

Graf č. 2 ukazuje, že adaptace na IHH snížila velikost infarktu na 71 % hodnoty normoxické kontroly ⁽²⁵⁾.

Graf č. 2 Velikost infarktu po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m



IS – velikost nekrotické oblasti, AAR – velikost ischemické oblasti. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n = 18.

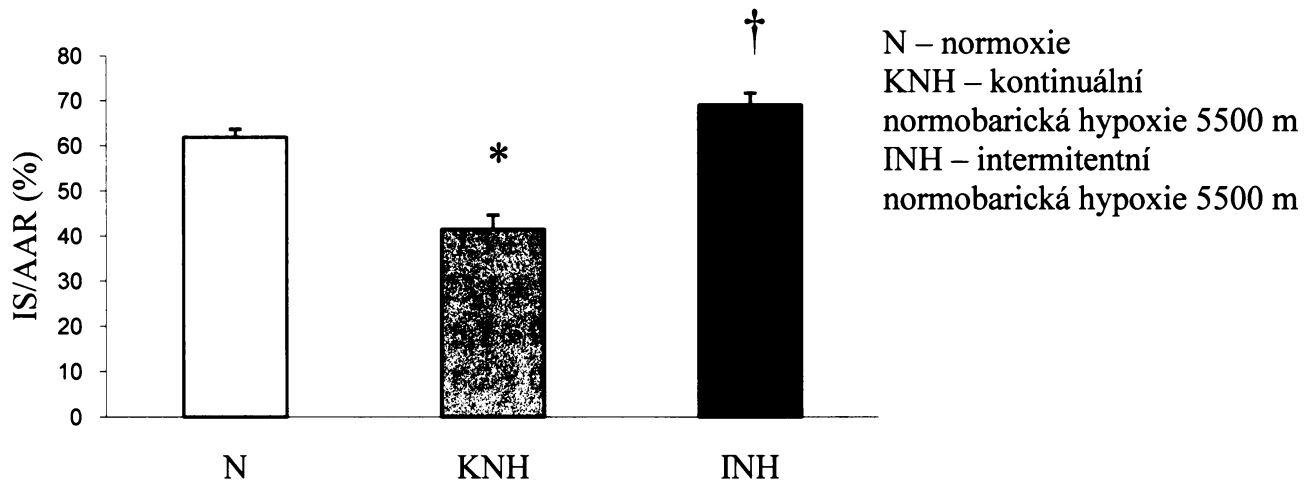
* – statisticky významný rozdíl IHH vs. N ($p < 0,05$).

Převzato z ⁽²⁵⁾.

5.2.2. Adaptace na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m

Graf č. 3 ukazuje, že adaptace na KNH snížila velikost infarktu na 67 % normoxické hodnoty, zatímco adaptace na INH neměla protektivní účinek.

Graf č. 3 Velikost infarktu po adaptaci na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m



IS – velikost nekrotické oblasti, AAR – velikost ischemické oblasti. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n = 18.

* – statisticky významný rozdíl KNH vs. N ($p < 0,05$).

† – statisticky významný rozdíl INH vs. KNH ($p < 0,05$).

5.3. Podíl proteinů extrahovatelných Tritonem X-100 v jednotlivých frakcích

Pro každou frakcionaci byla použita levá srdeční komora (310–540 mg), která byla homogenizována v homogenizačního pufru 3S (2,4–4,3 ml, tj. 12,5 % homogenát). Relativní zastoupení PKC δ , PKC ϵ a P – PKC ϵ bylo stanoveno v extraktu homogenátu, v cytosolu a v extraktu partikulární frakce. Extrakce Tritonem X-100 představuje částečný purifikační krok, kdy isoformy PKC přecházejí do extraktů partikulární frakce a homogenátu a část ostatních proteinů zůstává v peletu.

5.3.1. Adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m

V tabulkách č. 10 a 11 jsou uvedeny koncentrace a podíl proteinů extrahovatelných Tritonem X-100 v buněčných frakcích za různých experimentálních podmínek. Mezi normoxickým a na IHH adaptovaným myokardem nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v koncentracích proteinů. Adaptace na IHH neovlivnila koncentraci proteinů extrahovatelných do Tritonu X-100.

Tabulka č. 10 **Koncentrace proteinů po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m**

buněčná frakce	koncentrace proteinů (g/l)	
	N	IHH
H	21,3 ± 1,6	19,6 ± 0,9
HE	7,5 ± 0,5	8,1 ± 0,6
HEP	23,1 ± 2,6	22,1 ± 2,6
C	5,7 ± 0,4	6,2 ± 0,3
PE	8,2 ± 0,7	9,2 ± 0,9
PEP	49,6 ± 7,0	48,0 ± 9,3

Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± S.E.M. ze čtyř frakcionačních pokusů. N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie 7000 m, H – homogenát, HE – extrakt homogenátu, HEP – pelet po extrakci homogenátu, C – cytosol, PE – extrakt partikulární frakce, PEP – pelet po extrakci partikulární frakce.

Tabulka č. 11 **Podíl proteinů extrahovatelných Tritonem X-100 v jednotlivých frakcích po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m**

buněčná frakce	podíl proteinů extrahovatelných Tritonem X-100 (% homogenátu)	
	N	IHH
H	100	100
HE	33,1 ± 0,6	35,5 ± 2,4
C	25,1 ± 1,1	28,5 ± 0,5*
PE	4,3 ± 0,3	5,2 ± 0,7

Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± S.E.M. ze čtyř frakcionačních pokusů. Podíl proteinů extrahovatelných Tritonem X-100 v jednotlivých frakcích: výtěžek proteinů dané frakce v mg vyjádřený jako procento celkového proteinu homogenátu (100 %). N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie 7000 m, H – homogenát, HE – extrakt homogenátu, C – cytosol, PE – extrakt partikulární frakce.

* – statisticky významný rozdíl IHH vs. N ($p < 0,05$).

5.3.2. Adaptace na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m

V tabulkách č. 12 a 13 jsou uvedeny koncentrace a podíl proteinů extrahovatelných Tritonem X-100 v buněčných frakcích za různých experimentálních podmínek. Mezi normoxickým a na KNH resp. INH adaptovaným myokardem nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly v koncentracích proteinů. Adaptace na KNH nebo INH neovlivnila koncentraci proteinů extrahovatelných do Tritonu X-100.

Tabulka č. 12 Koncentrace proteinů po adaptaci na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m

buněčná frakce	koncentrace proteinů (g/l)		
	N	KNH	INH
H	19,2 ± 2,5	19,8 ± 2,2	19,7 ± 1,8
HE	7,5 ± 0,4	7,7 ± 0,3	7,9 ± 0,4
HEP	22,4 ± 1,2	21,8 ± 1,1	20,5 ± 1,7
C	6,5 ± 0,4	6,0 ± 0,4	6,0 ± 0,6
PE	7,4 ± 0,6	7,3 ± 0,5	7,5 ± 0,3
PEP	42,3 ± 4,5	43,6 ± 6,3	42,2 ± 5,3

Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± S.E.M. z pěti frakcionačních pokusů. N – normoxie, KNH – kontinuální normobarická hypoxie 5500 m, INH – intermitentní normobarická hypoxie 5500 m, H – homogenát, HE – extrakt homogenátu, HEP – pelet po extrakci homogenátu, C – cytosol, PE – extrakt partikulární frakce, PEP – pelet po extrakci partikulární frakce.

Tabulka č. 13 Podíl proteinů extrahovatelných Tritonem X-100 v jednotlivých frakcích po adaptaci na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m

buněčná frakce	podíl proteinů extrahovatelných Tritonem X-100 (% homogenátu)		
	N	KNH	INH
H	100	100	100
HE	35,2 ± 2,3	32,1 ± 0,5	34,3 ± 1,1
C	31,4 ± 3,6	26,1 ± 2,4	27,1 ± 1,1
PE	3,2 ± 0,6	3,4 ± 0,5	3,7 ± 0,6

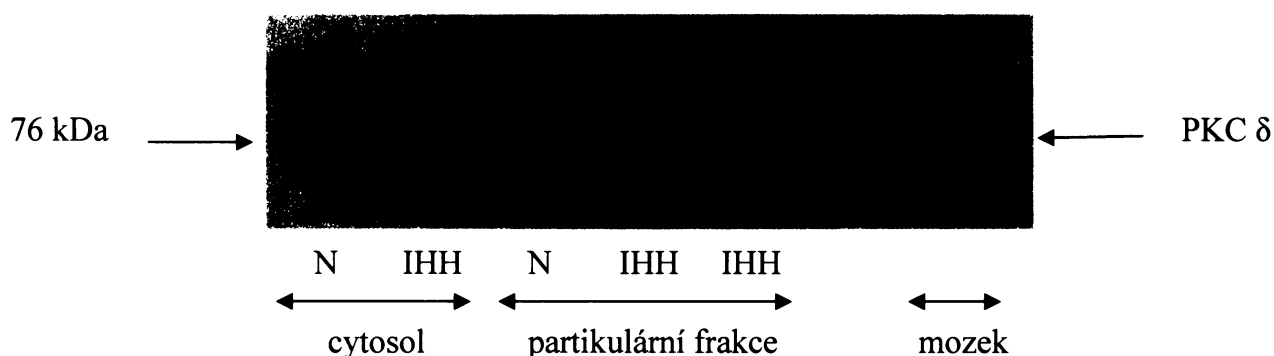
Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± S.E.M. z pěti frakcionačních pokusů. Podíl proteinů extrahovatelných Tritonem X-100 v jednotlivých frakcích: výtěžek proteinů dané frakce v mg vyjádřený jako procento celkového proteinu homogenátu (100 %). N – normoxie, KNH – kontinuální normobarická hypoxie 5500 m, INH – intermitentní normobarická hypoxie 5500 m, H – homogenát, HE – extrakt homogenátu, C – cytosol, PE – extrakt partikulární frakce.

5.4. Identifikace isoformů PKC

PKC δ , PKC ϵ a P – PKC ϵ byly identifikovány pomocí pozitivní kontroly (tritonový extrakt homogenátu mozku potkana) a srovnáním elektroforetické pohyblivosti s pozicemi proteinových standardů známých molekulových hmotností.

Signál PKC δ byl identifikován jako proužek o průměrné molekulové hmotnosti 76 kDa (obr. č. 5).

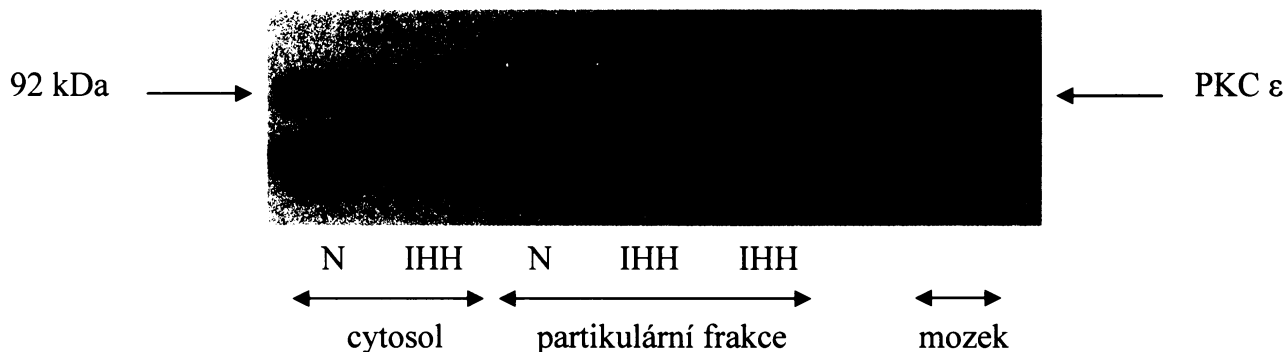
Obrázek č. 5 Identifikace PKC δ



Filmy s ECL signálem, expozice 30 sekund. Šipkou je označen proužek odpovídající PKC δ . Nanášky: cytosol 15 μg proteinu, partikulární frakce 7 μg proteinu. N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie 7000 m.

Signál PKC ϵ byl identifikován jako dva proužky o průměrné molekulové hmotnosti 92 kDa (obr. č. 6).

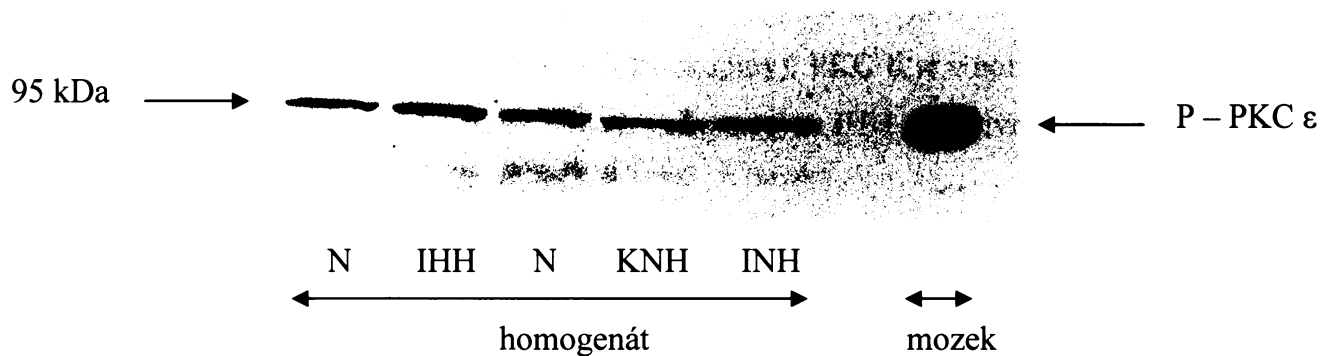
Obrázek č. 6 Identifikace PKC ϵ



Filmy s ECL signálem, expozice 30 sekund. Šipkou je označen proužek odpovídající PKC ϵ . Nanášky: cytosol 17 μg proteinu, partikulární frakce 10 μg proteinu. N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie 7000 m.

Signál P – PKC ϵ byl identifikován jako proužek o průměrné molekulové hmotnosti 95 kDa (obr. č. 7).

Obrázek č. 7 Identifikace P – PKC ϵ



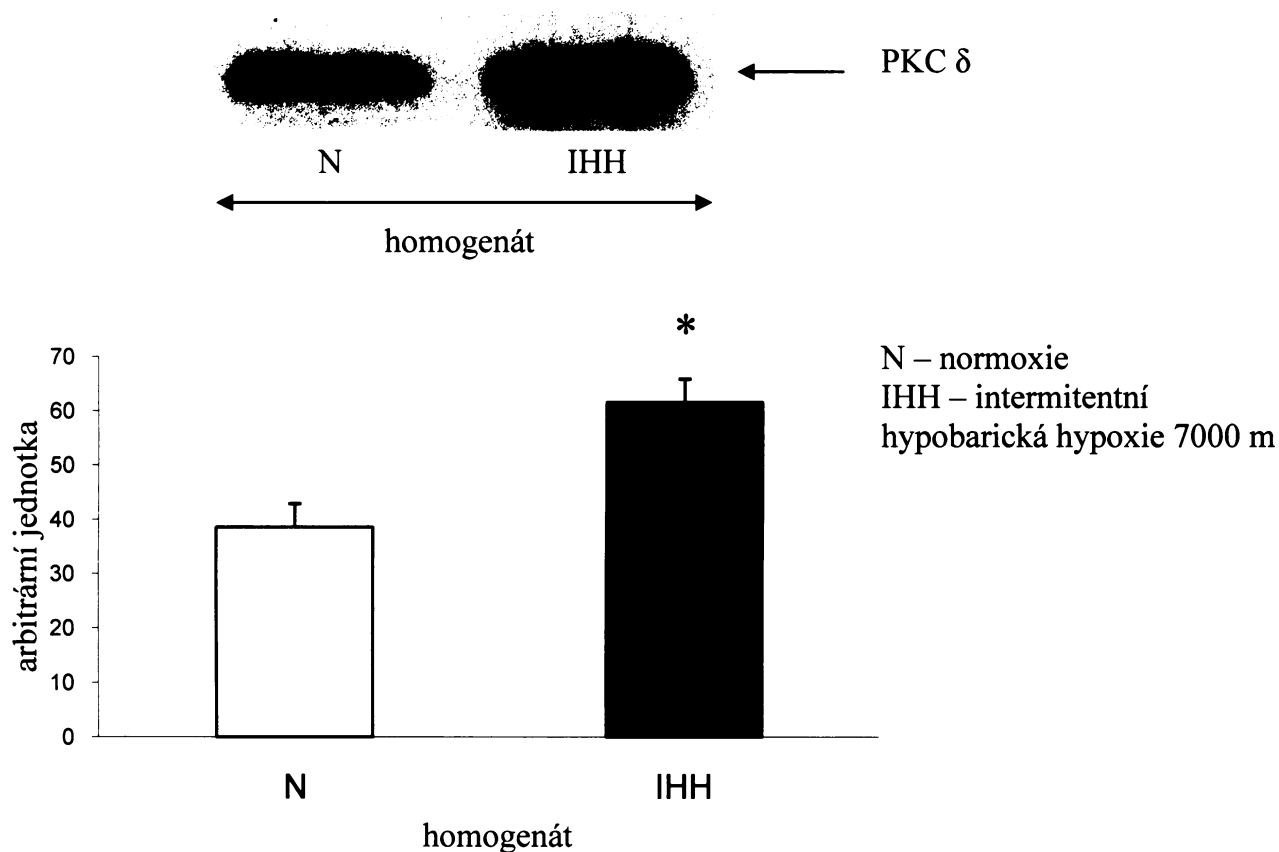
Filmy s ECL signálem, expozice 30 sekund. Šipkou je označen proužek odpovídající P – PKC ϵ . Nanášky: homogenát 40 μ g proteinu. N – normoxie, IHH – intermitentní hypobarická hypoxie 7000 m, KNH – kontinuální normobarická hypoxie 5500 m, INH – intermitentní normobarická hypoxie 5500 m.

5.5. Relativní zastoupení PKC δ , PKC ϵ a P – PKC ϵ po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m

5.5.1. PKC δ

Grafy č. 4 a 5 ukazují, že adaptace na IHH zvýšila relativní zastoupení PKC δ v homogenátu (160 % normoxické skupiny), v cytosolu (193 % normoxické skupiny) a v partikulární frakci (126 % normoxické skupiny). PKC δ je v normoxické i IHH tkáni přítomná převážně v partikulární frakci. Adaptace na IHH neovlivnila distribuci PKC δ mezi partikulární frakcí a cytosolem.

Graf č. 4 Relativní zastoupení PKC δ v homogenátu po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m

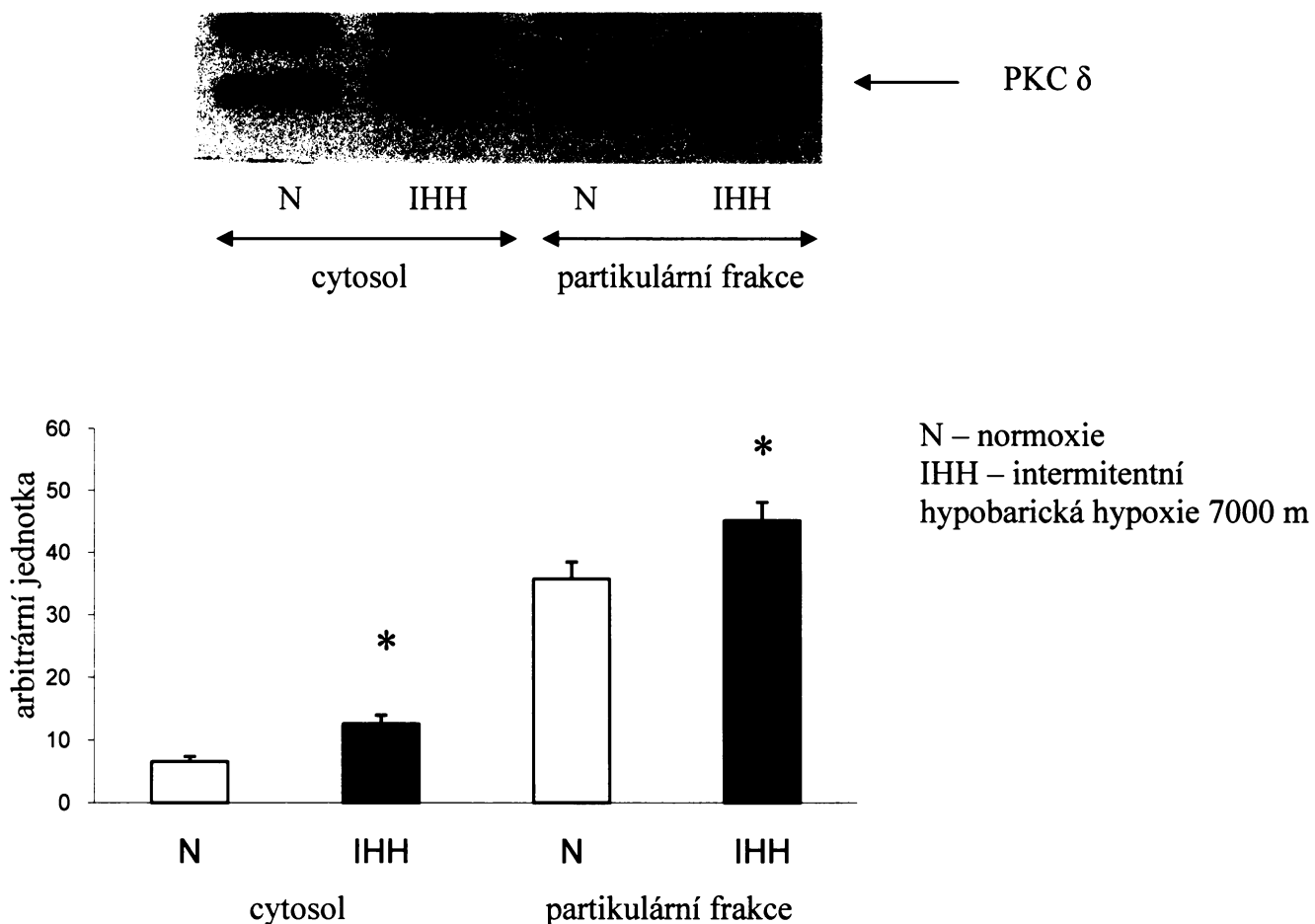


Reprezentativní imunoblot – nanášky: homogenát 10 μ g proteinu.

Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 μ g proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Hodnoty každého pokusu jsou z identického filmu. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n = 6.

* – statisticky významný rozdíl IHH vs. N ($p < 0,05$).

Graf č. 5 Relativní zastoupení PKC δ v cytosolu a partikulární frakci po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m



Reprezentativní imunoblot – nanášky: cytosol 15 μ g proteinu, partikulární frakce 7 μ g proteinu.

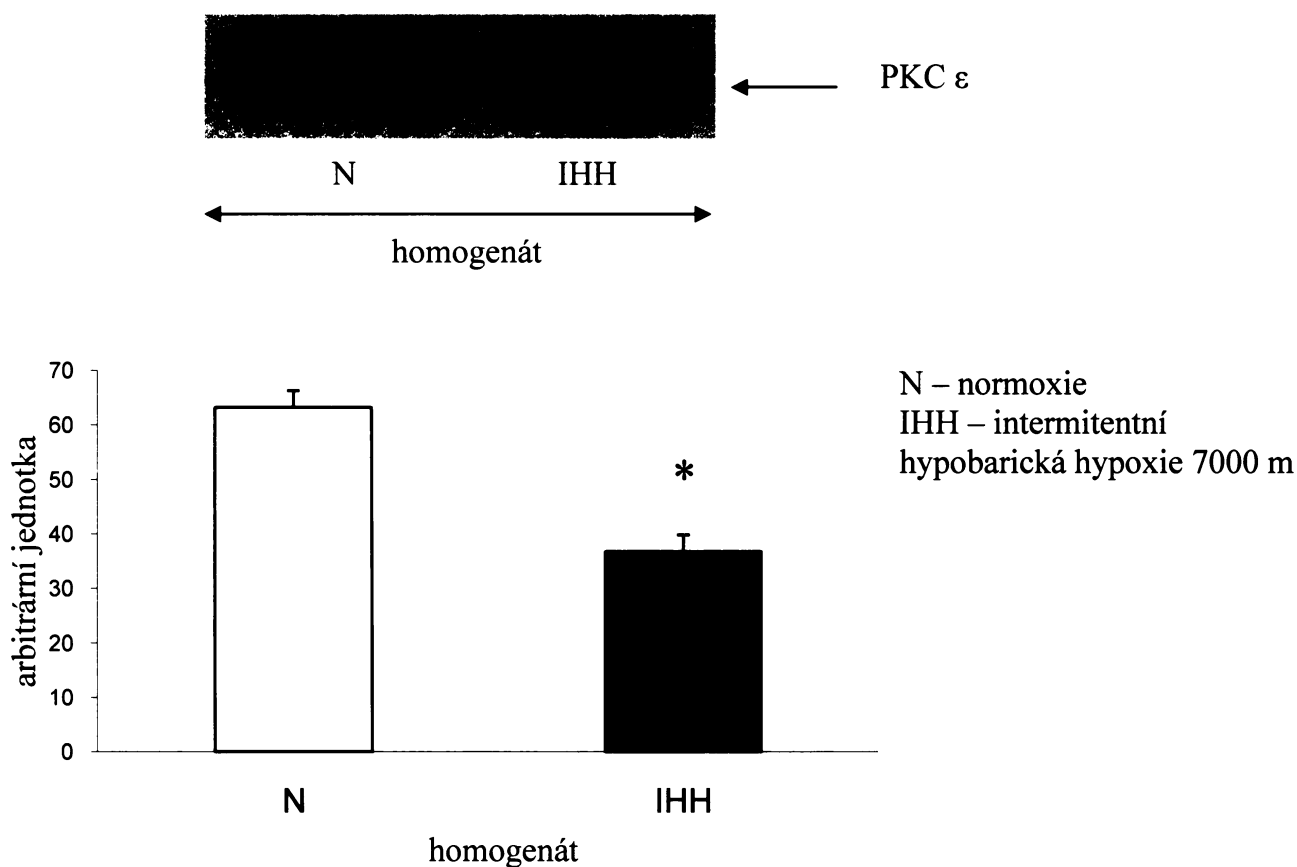
Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 μ g proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Hodnoty každého pokusu jsou z identického filmu. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n = 6.

* – statisticky významný rozdíl IHH vs. N (p < 0,05).

5.5.2. PKC ϵ

Graf č. 6 dokumentuje, že IHH snížila relativní zastoupení PKC ϵ v homogenátu (58 % normoxické skupiny). Toto snížení se týká především partikulární frakce, kde po adaptaci na IHH kleslo relativní zastoupení PKC ϵ na 60 % hodnoty normoxické skupiny (graf č. 7). Adaptace na IHH hypoxii neovlivnila distribuci PKC ϵ mezi partikulární frakcí a cytosolem.

Graf č. 6 Relativní zastoupení PKC ϵ v homogenátu po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m

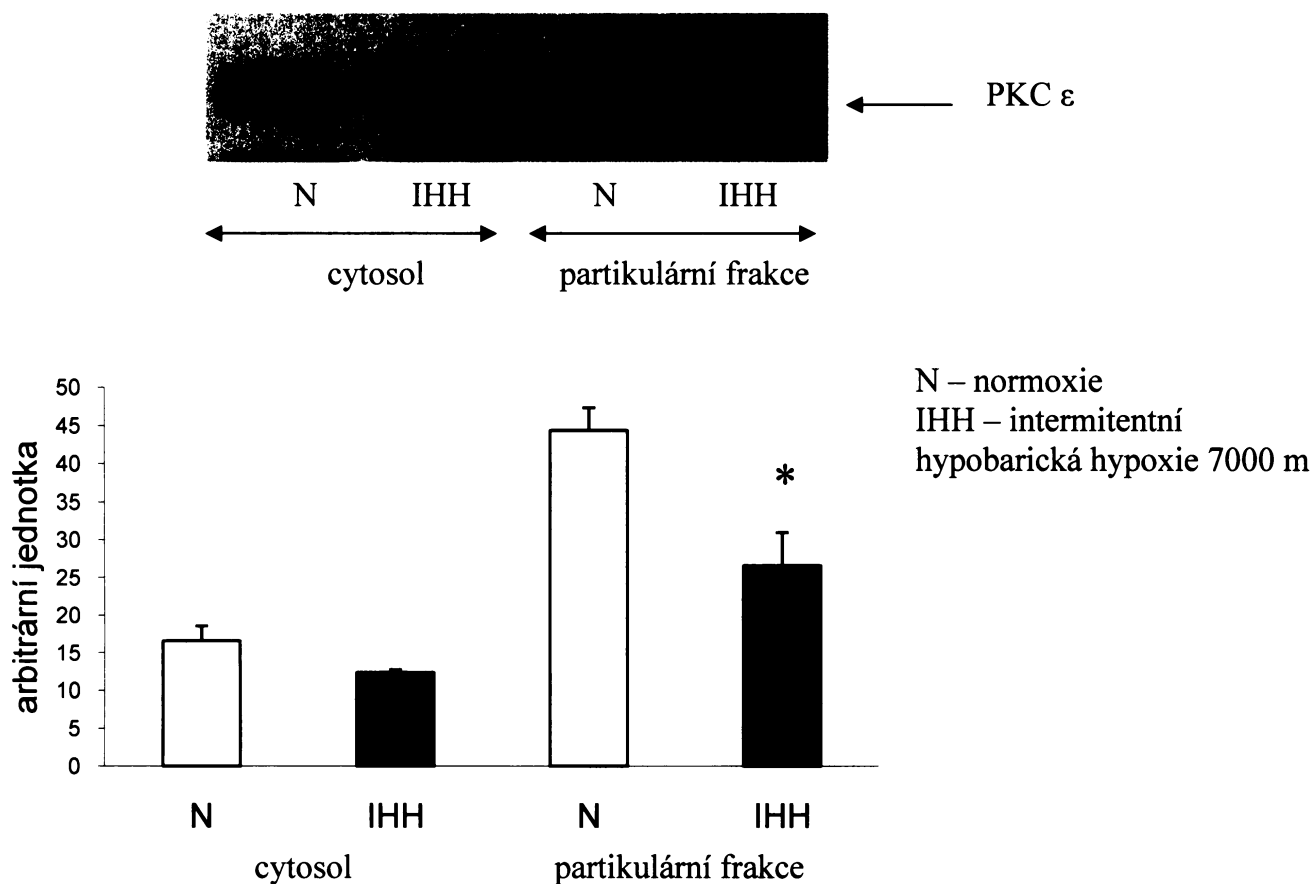


Reprezentativní imunoblot – nanášky: homogenát 12 μ g proteinu.

Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 μ g proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Hodnoty každého pokusu jsou z identického filmu. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n = 6.

* – statisticky významný rozdíl IHH vs. N ($p < 0,05$).

Graf č. 7 Relativní zastoupení PKC ϵ v cytosolu a partikulární frakci po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m



Reprezentativní imunoblot – nanášky: cytosol 17 μg proteinu, partikulární frakce 10 μg proteinu.

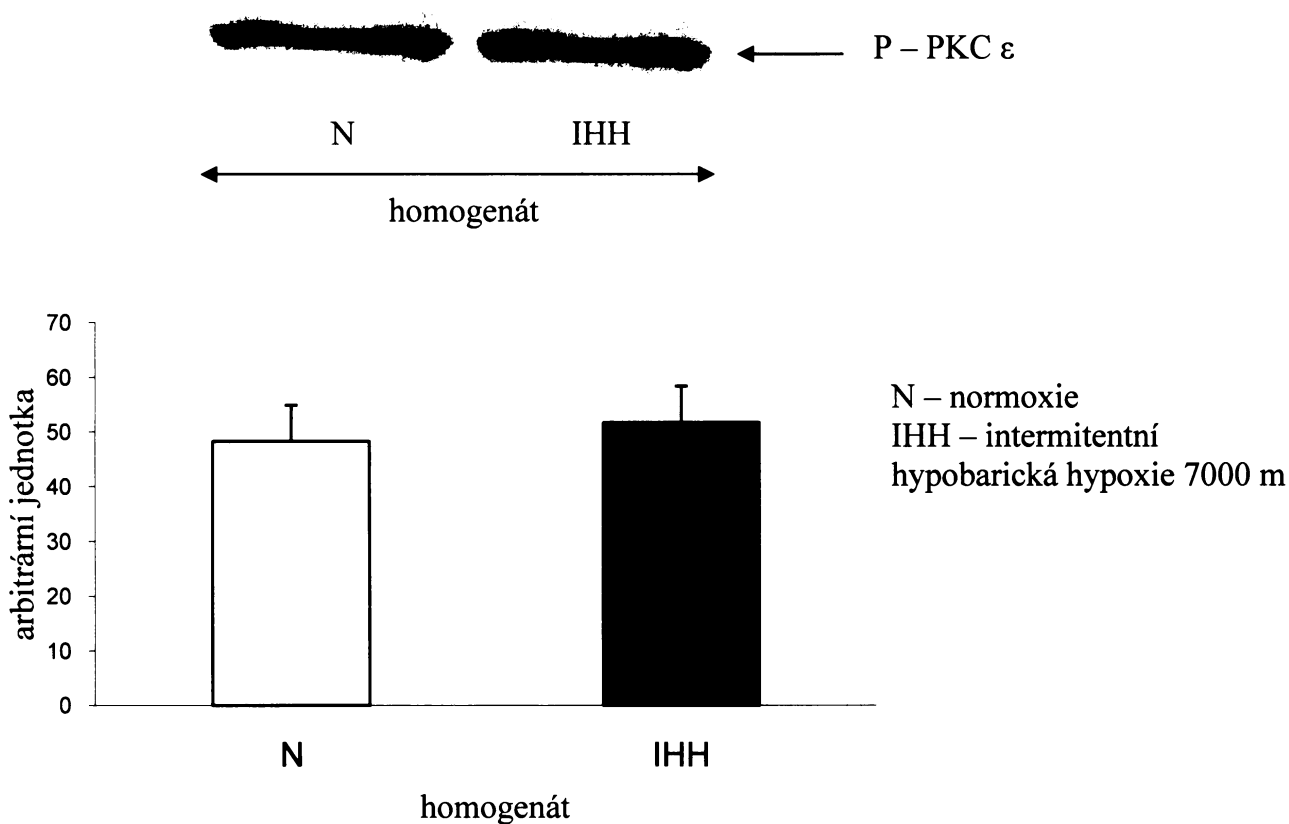
Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 μg proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Hodnoty každého pokusu jsou z identického filmu. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n = 6.

* – statisticky významný rozdíl IHH vs. N ($p < 0,05$).

5.5.3. P – PKC ϵ

Na grafech č. 8 a 9 je patrné, že IHH neměla vliv na relativní zastoupení P – PKC ϵ v homogenátu, cytosolu ani partikulární frakci. Poměr relativního zastoupení P – PKC ϵ a celkové PKC ϵ ukázal, že IHH zvýšila podíl P – PKC ϵ v homogenátu (187 % hodnoty normoxie), cytosolu i partikulární frakci (grafy č. 10 a 11).

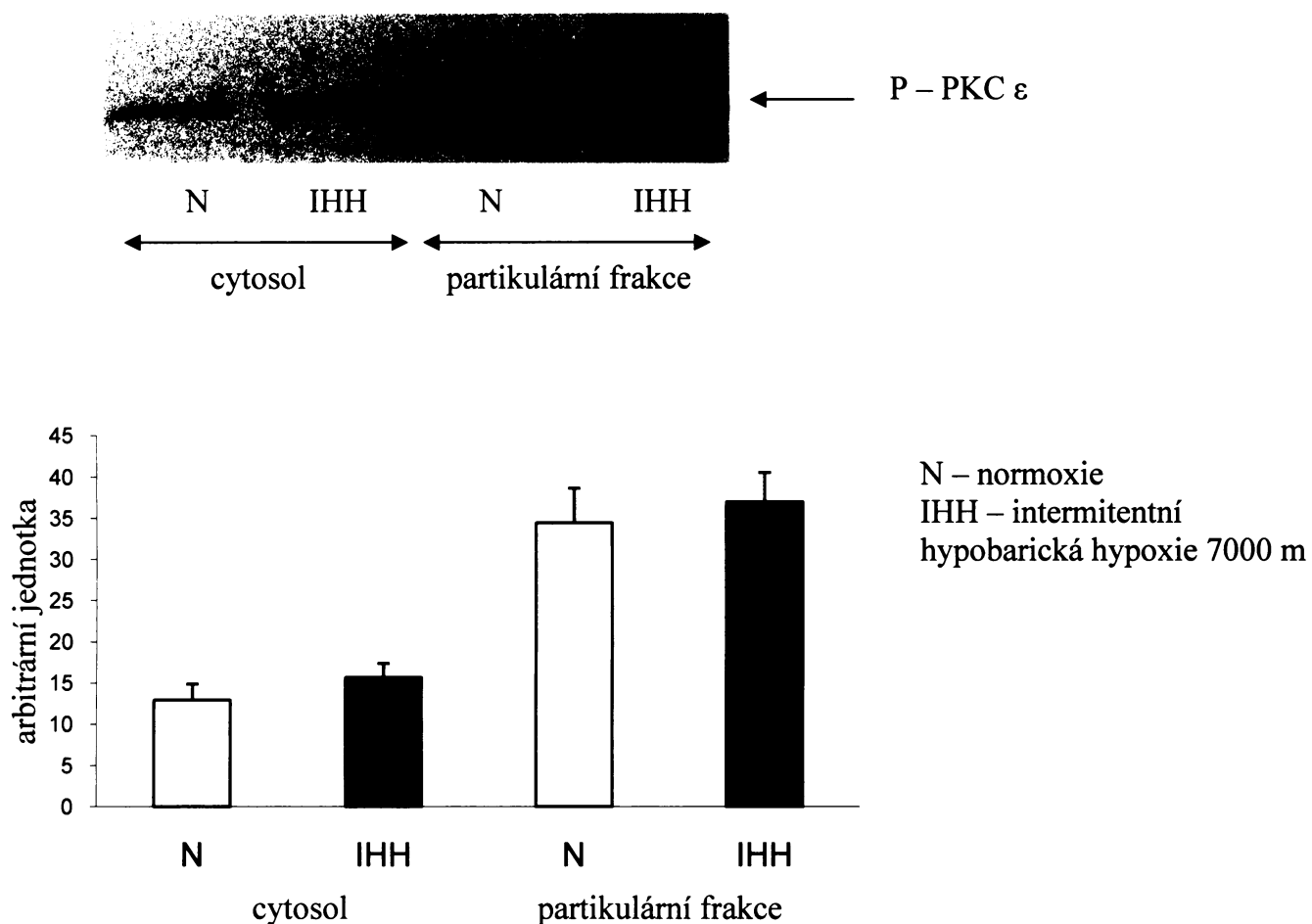
Graf č. 8 Relativní zastoupení P – PKC ϵ v homogenátu po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m



Reprezentativní imunoblot – nanášky: homogenát 40 μ g proteinu.

Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 μ g proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Hodnoty každého pokusu jsou z identického filmu. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n = 6.

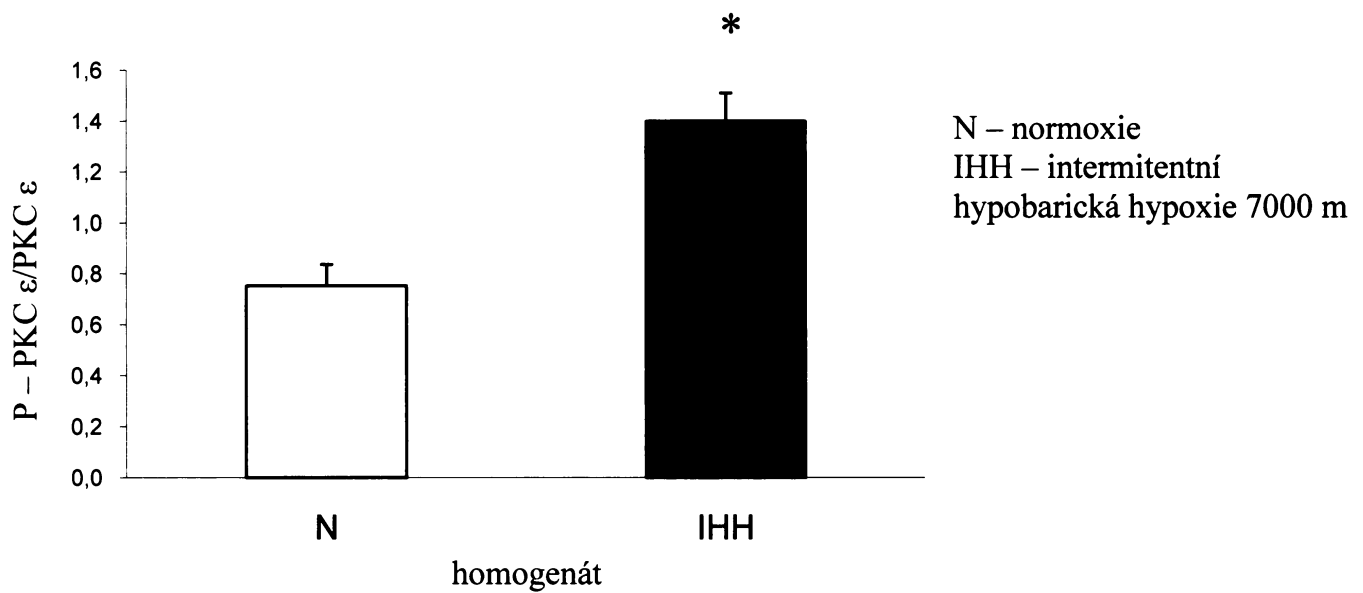
Graf č. 9 Relativní zastoupení P – PKC ϵ v cytosolu a partikulární frakci po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m



Reprezentativní imunoblot – nanášky: cytosol 40 μ g proteinu, partikulární frakce 50 μ g proteinu.

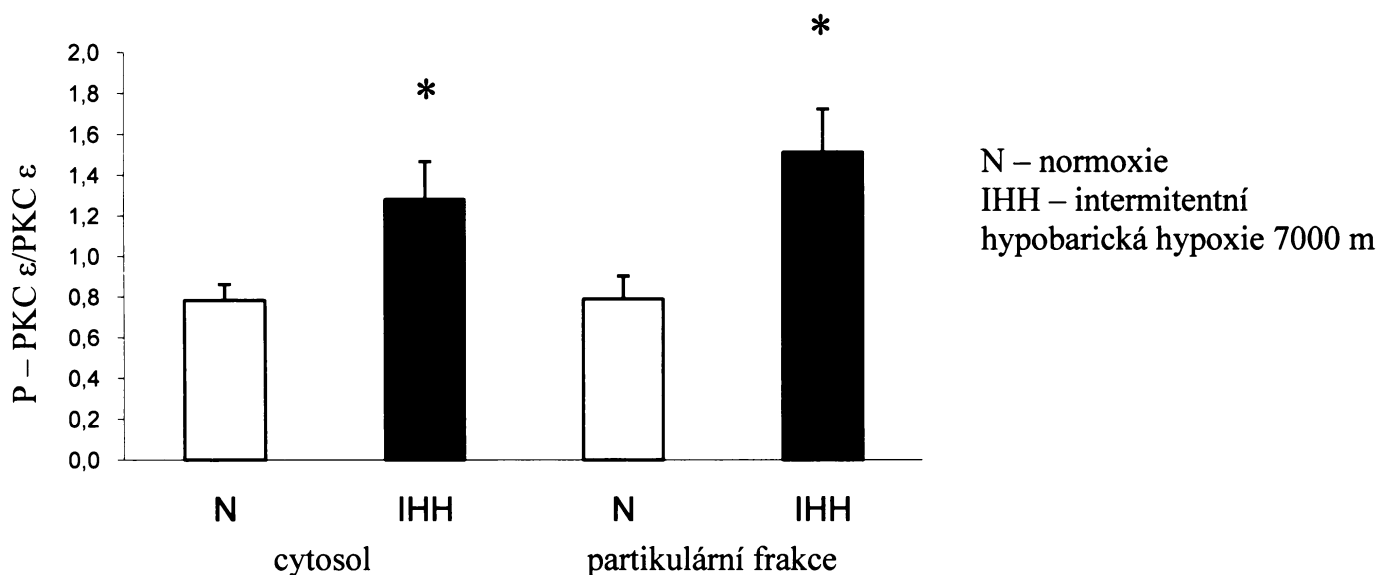
Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 μ g proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Hodnoty každého pokusu jsou z identického filmu. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n = 6.

Graf č. 10 Poměr relativního zastoupení P – PKC ϵ a celkové PKC ϵ v homogenátu



P – PKC ϵ /PKC ϵ : poměr denzitometrického objemu (vztaženo na 1 μ g proteinu) P – PKC ϵ k denzitometrickému objemu (vztaženo na 1 μ g proteinu) PKC ϵ . Hodnoty každého pokusu jsou z identického filmu. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n = 6.
 * – statisticky významný rozdíl IHH vs. N (p < 0,05).

Graf č. 11 Poměr relativního zastoupení P – PKC ϵ a celkové PKC ϵ v cytosolu a partikulární frakci



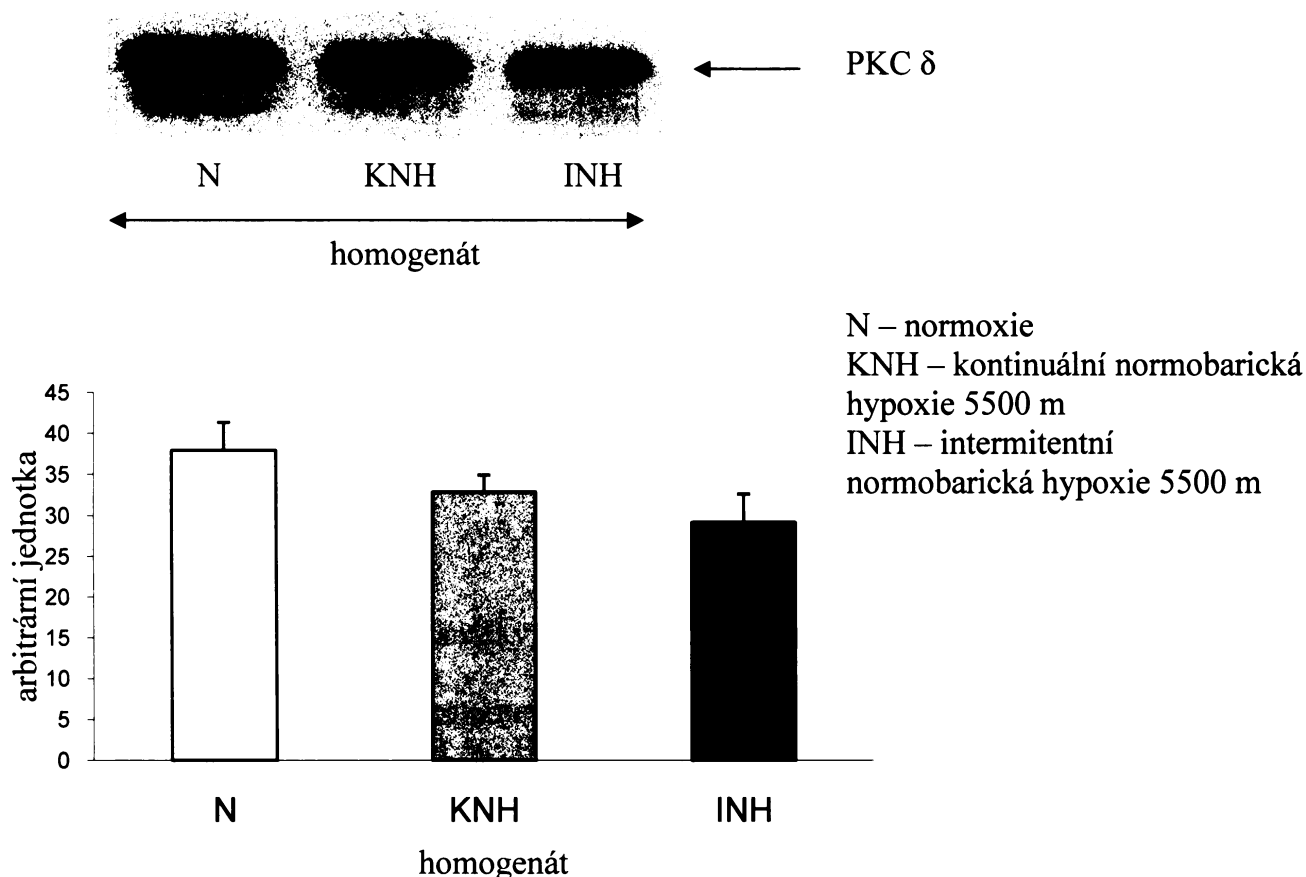
P – PKC ϵ /PKC ϵ : poměr denzitometrického objemu (vztaženo na 1 μ g proteinu) P – PKC ϵ k denzitometrickému objemu (vztaženo na 1 μ g proteinu) PKC ϵ . Hodnoty každého pokusu jsou z identického filmu. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n = 6.
 * – statisticky významný rozdíl IHH vs. N (p < 0,05).

5.6. Relativní zastoupení PKC δ , PKC ϵ a P – PKC ϵ po adaptaci na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m

5.6.1. PKC δ

Graf č. 12 ukazuje, že KNH ani INH neovlivnila relativní zastoupení PKC δ v homogenátu. Zatímco adaptace na KNH nevyvolala změny relativního zastoupení PKC δ v cytosolu ani v partikulární frakci, adaptace na INH zvýšila množství PKC δ v cytosolu (175 % normoxické skupiny, 214 % kontinuálně hypoxické skupiny) a snížila množství PKC δ v partikulární frakci (78 % normoxické skupiny) (graf č. 13). Adaptace na INH vedla k redistribuci PKC δ z partikulární frakce do cytosolu (graf č. 14).

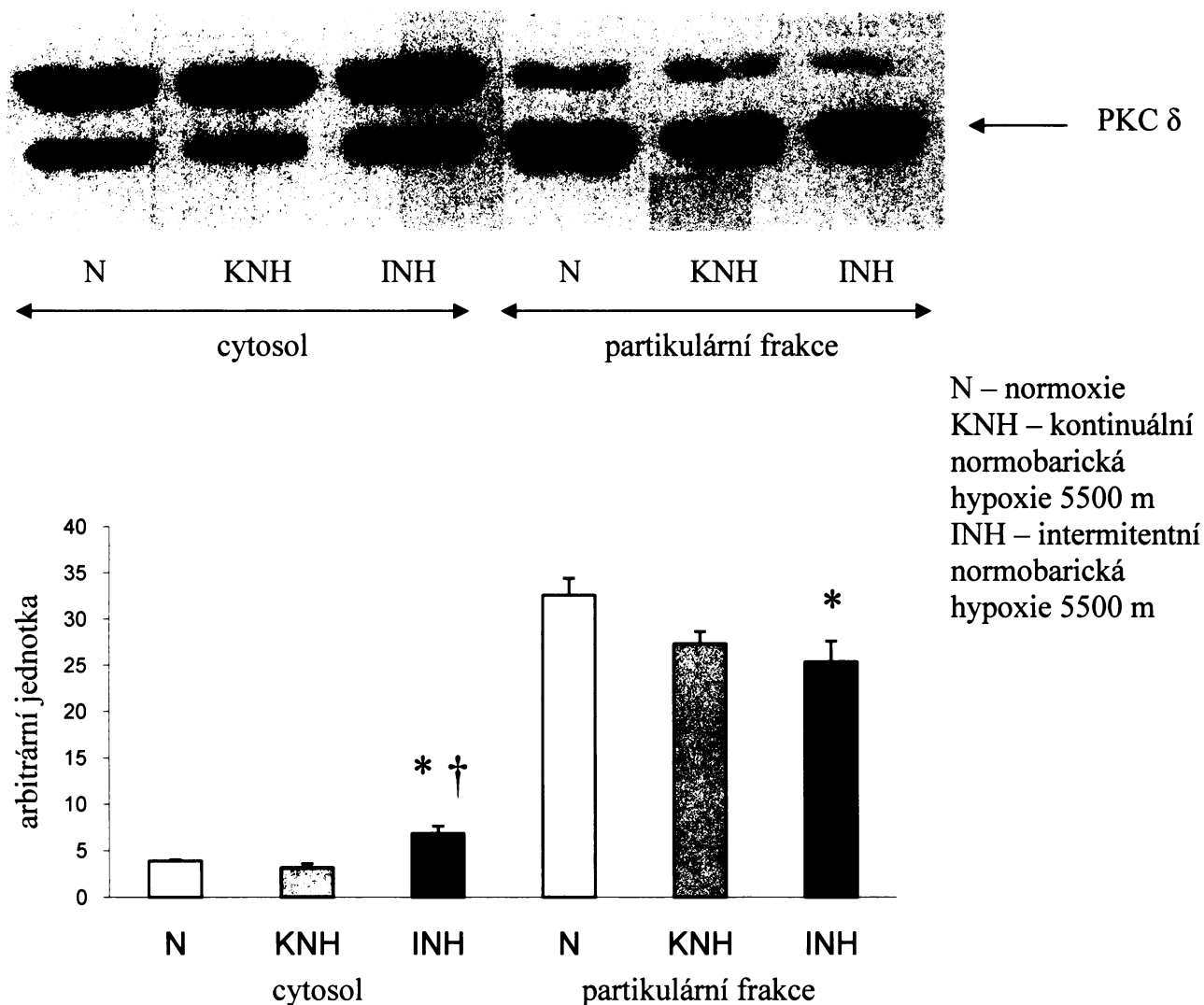
Graf č. 12 Relativní zastoupení PKC δ v homogenátu po adaptaci na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m



Reprezentativní imunoblot – nanášky: homogenát 10 μ g proteinu.

Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 μ g proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Hodnoty každého pokusu jsou z identického filmu. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n = 6.

Graf č. 13 Relativní zastoupení PKC δ v cytosolu a partikulární frakci po adaptaci na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m



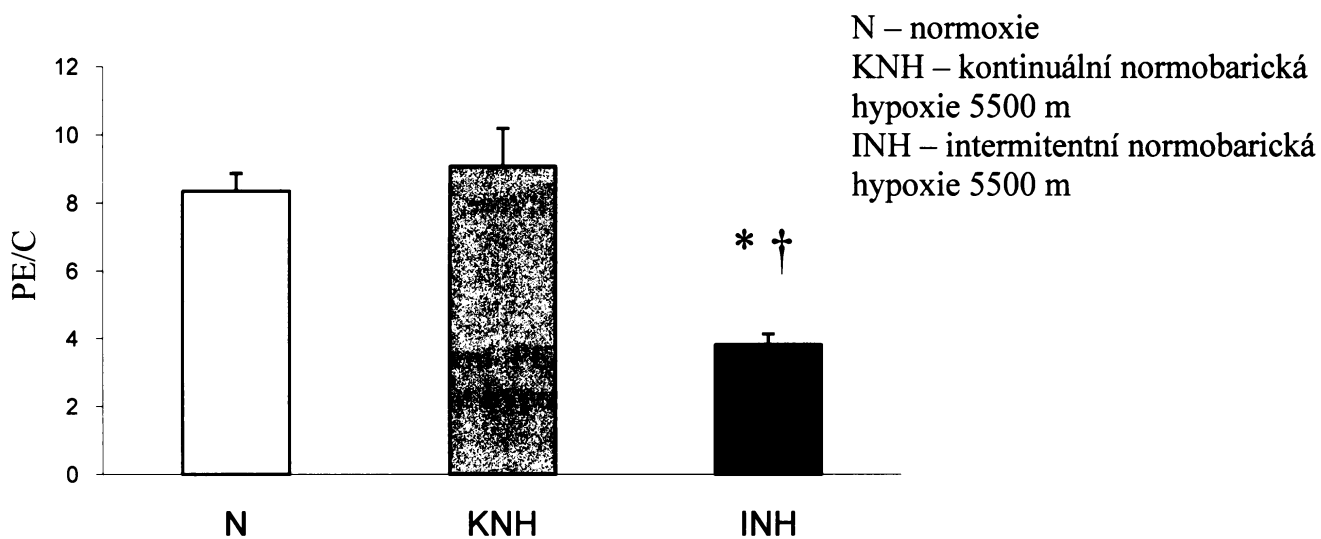
Reprezentativní imunoblot – nanášky: cytosol 15 μ g proteinu, partikulární frakce 7 μ g proteinu.

Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 μ g proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Hodnoty každého pokusu jsou z identického filmu. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n = 6.

* – statisticky významný rozdíl INH vs. N ($p < 0,05$).

† – statisticky významný rozdíl INH vs. KNH ($p < 0,05$).

Graf č. 14 Poměr relativního zastoupení PKC δ v partikulární frakci a v cytosolu



PE/C: poměr denzitometrického objemu (vztaženo na 1 μg proteinu) partikulární frakce k denzitometrickému objemu (vztaženo na 1 μg proteinu) cytosolu. Hodnoty každého pokusu jsou z identického filmu. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. $n = 6$.

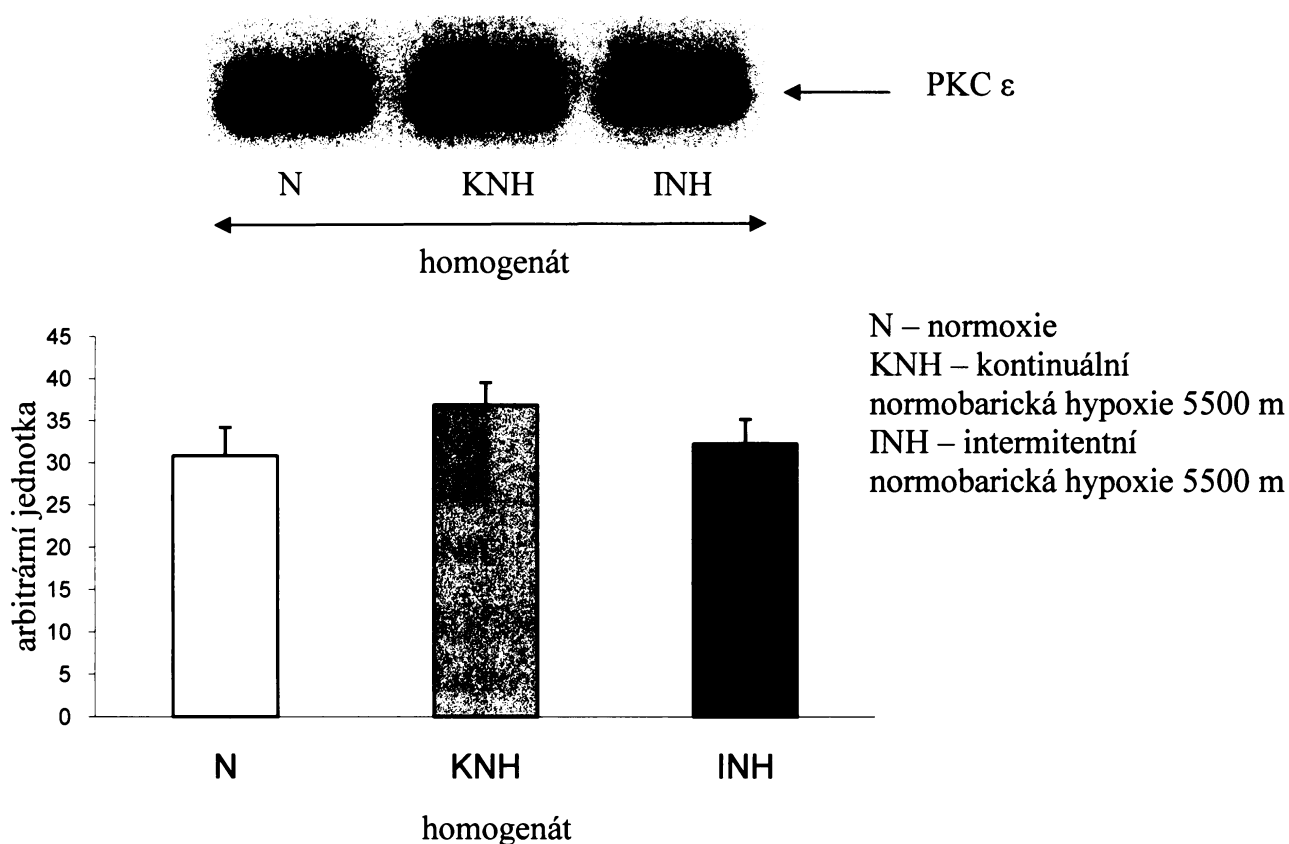
* – statisticky významný rozdíl INH vs. N ($p < 0,05$).

† – statisticky významný rozdíl INH vs. KNH ($p < 0,05$).

5.6.2. PKC ϵ

Grafy č. 15 a 16 ukazují, že KNH ani INH nevyvolala změny relativního zastoupení PKC ϵ v homogenátu, cytosolu ani partikulární frakci. Z grafu č. 16 je patrné, že PKC ϵ je více zastoupena v partikulární frakci u všech experimentálních skupin a adaptace na KNH ani INH neovlivnila její distribuci mezi cytosolem a partikulární frakcí.

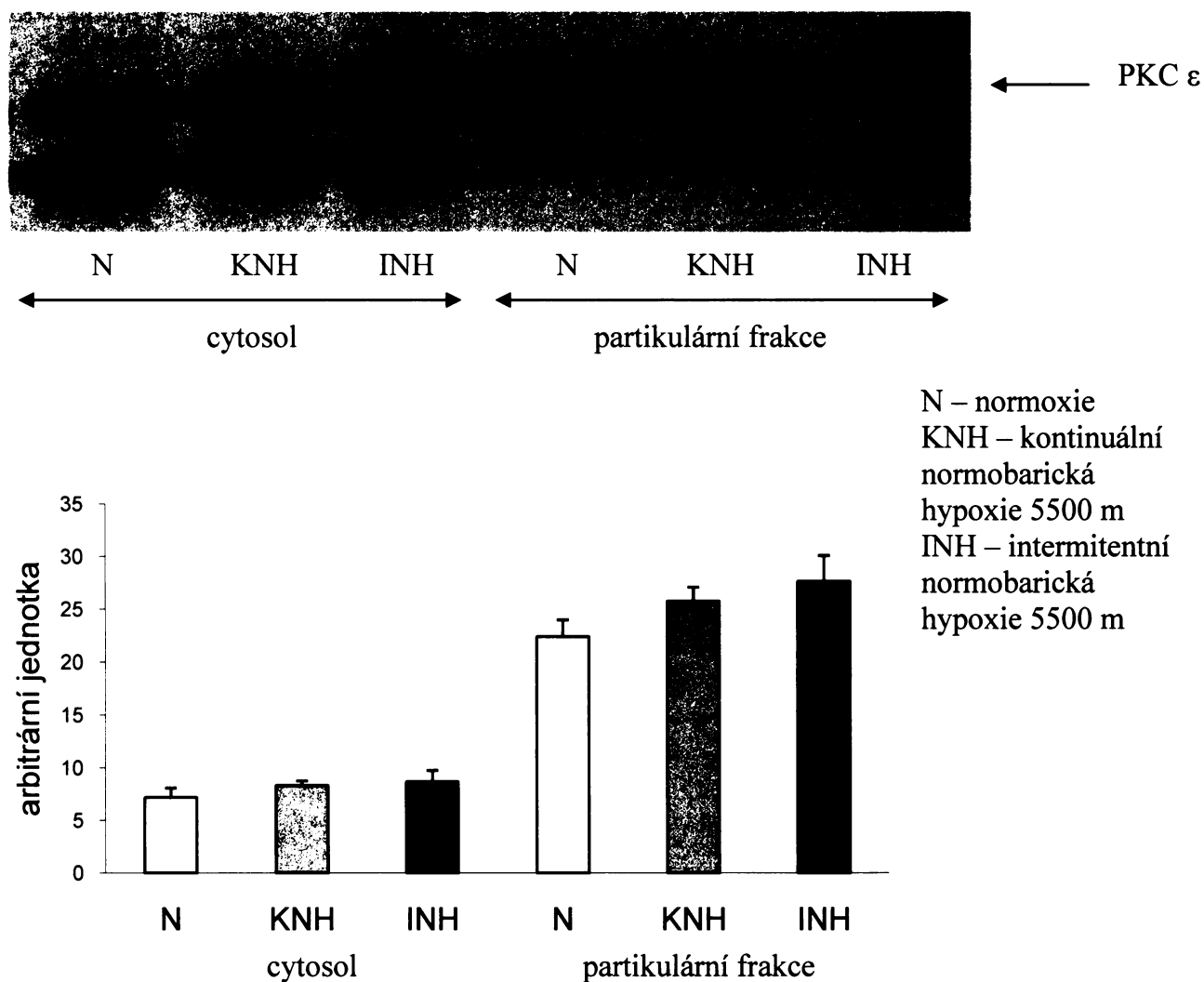
Graf č. 15 Relativní zastoupení PKC ϵ v homogenátu po adaptaci na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m



Reprezentativní imunoblot – nanášky: homogenát 12 μ g proteinu.

Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 μ g proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Hodnoty každého pokusu jsou z identického filmu. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n = 6.

Graf č. 16 Relativní zastoupení PKC ϵ v cytosolu a partikulární frakci po adaptaci na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m



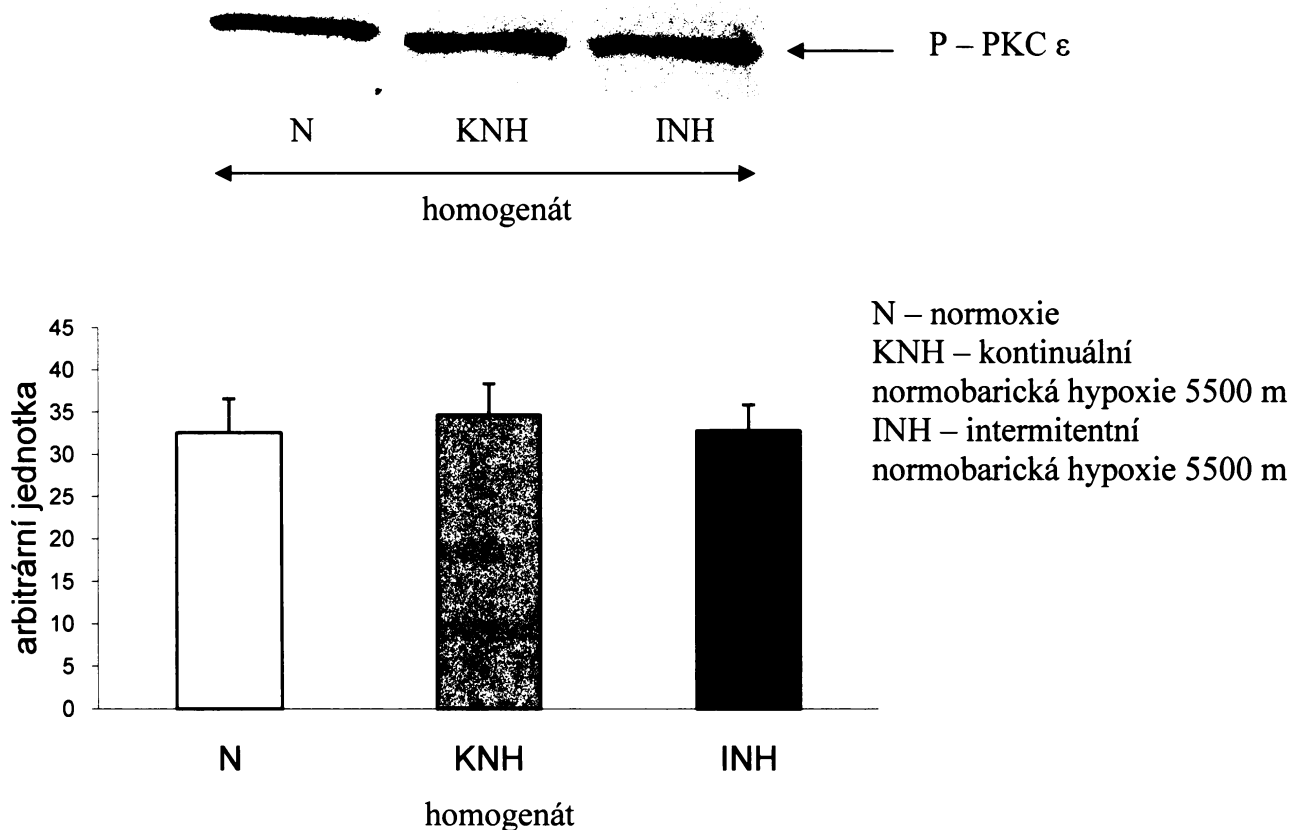
Reprezentativní imunoblot – nanášky: cytosol 17 μg proteinu, partikulární frakce 10 μg proteinu.

Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 μg proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Hodnoty každého pokusu jsou z identického filmu. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n = 6.

5.6.3. P – PKC ϵ

Grafy č. 17 a 18 ukazují, že KNH ani INH nevyvolala změny relativního zastoupení P – PKC ϵ v homogenátu, cytosolu ani v partikulární frakci. Z grafu č. 18 je patrné, že P – PKC ϵ je téměř rovnoměrně rozdělena mezi cytosol a partikulární frakci. KNH ani INH neovlivnila poměr relativního zastoupení P – PKC ϵ a celkové PKC ϵ v homogenátu, cytosolu a partikulární frakci (grafy č. 19 a 20). Graf č. 20 ukazuje, že poměr P – PKC ϵ a celkové PKC ϵ v cytosolu je výrazně vyšší ve srovnání s tímto poměrem v partikulární frakci.

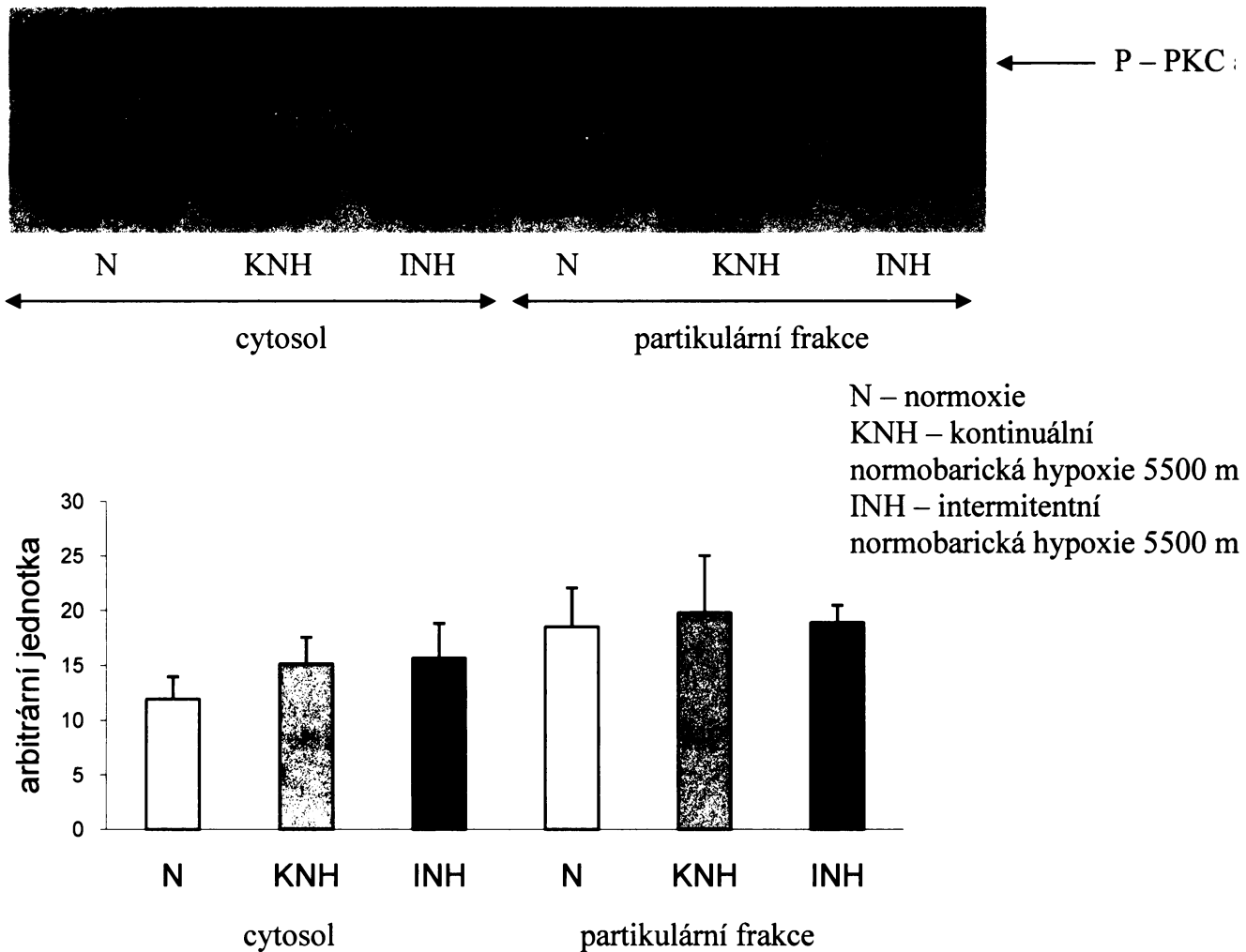
Graf č. 17 Relativní zastoupení P – PKC ϵ v homogenátu po adaptaci na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m



Reprezentativní imunoblot – nanášky: homogenát 40 μ g proteinu.

Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 μ g proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Hodnoty každého pokusu jsou z identického filmu. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n = 6.

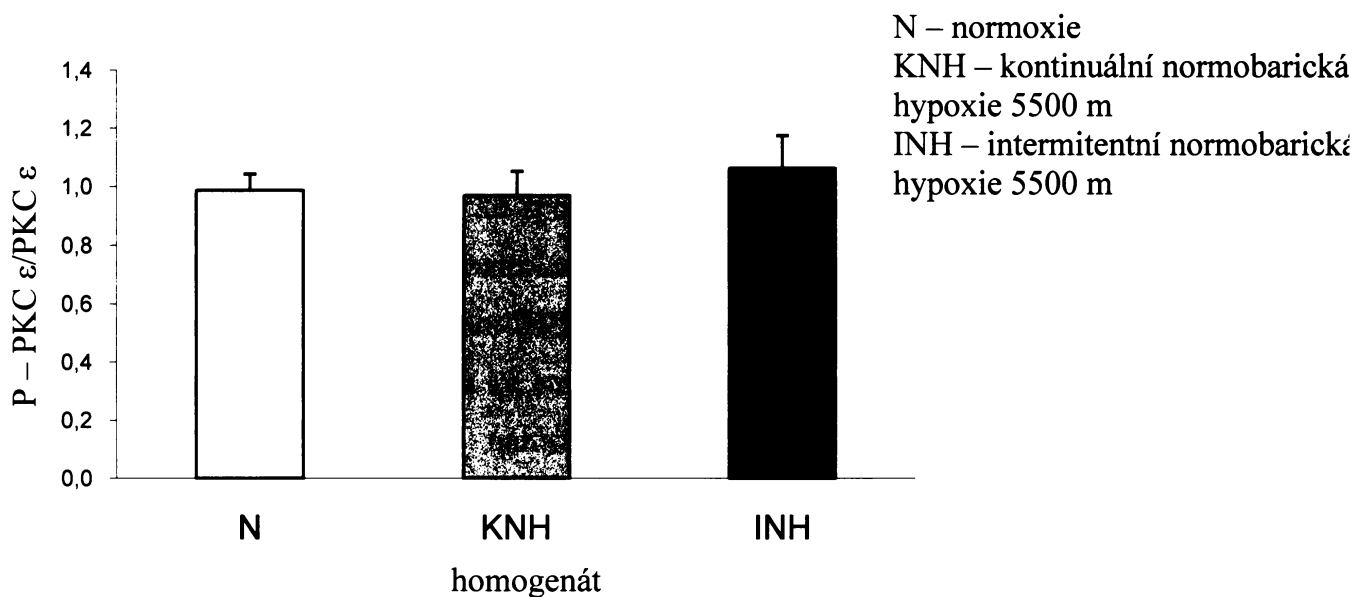
Graf č. 18 Relativní zastoupení P – PKC ϵ v cytosolu a partikulární frakci po adaptaci na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m



Reprezentativní imunoblot – nanášky: cytosol 40 μg proteinu, partikulární frakce 45 μg proteinu.

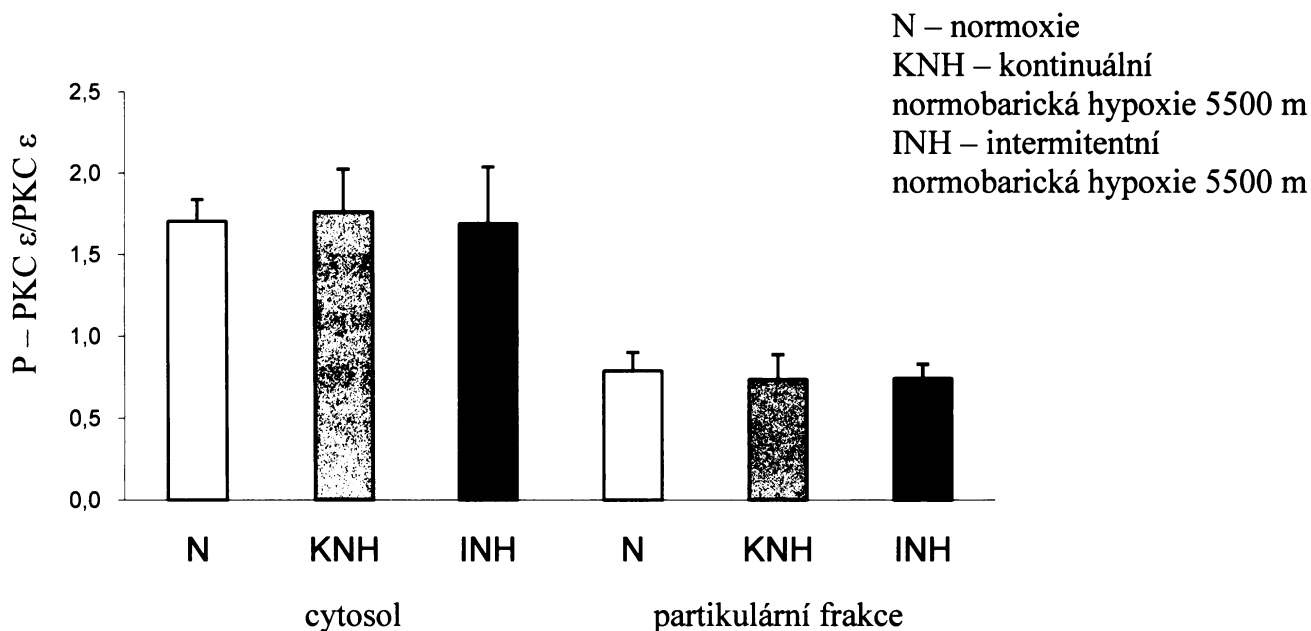
Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 μg proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Hodnoty každého pokusu jsou z identického filmu. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n = 6.

Graf č. 19 Poměr relativního zastoupení P – PKC ϵ a celkové PKC ϵ v homogenátu



P – PKC ϵ /PKC ϵ : poměr denzitometrického objemu (vztaženo na 1 μ g proteinu) P – PKC ϵ k denzitometrickému objemu (vztaženo na 1 μ g proteinu) PKC ϵ . Hodnoty každého pokusu jsou z identického filmu. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n = 6.

Graf č. 20 Poměr relativního zastoupení P – PKC ϵ a celkové PKC ϵ v cytosolu a partikulární frakci



P – PKC ϵ /PKC ϵ : poměr denzitometrického objemu (vztaženo na 1 μ g proteinu) P – PKC ϵ k denzitometrickému objemu (vztaženo na 1 μ g proteinu) PKC ϵ . Hodnoty každého pokusu jsou z identického filmu. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. n = 6.

6. DISKUZE

6.1. Hmotnostní parametry

Adaptace na IHH vedla ke zpomalení růstu a způsobila snížení tělesné hmotnosti potkanů oproti normoxickým kontrolám. Tento pokles je ve shodě s předchozími pracemi zabývajícími se stejným modelem IHH ^(25,47) a je patrně vyvolán stresovými podmínkami, které u pokusných zvířat vedou ke sníženému příjmu potravy. U potkanů adaptovaných na IHH jsme také pozorovali nárůst hmotnosti srdce, který byl způsoben zejména hypertrofií pravé komory. Chronická hypoxie způsobuje plicní hypertenzi, která vede k tlakovému přetížení a k vývoji hypertrofie. Zvýšila se i hmotnost levé komory. K hypertrofii levé komory dochází jednak v důsledku zvýšené objemové zátěže během hypoxických expozic a jednak působením katecholaminů. Svou roli zde může hrát i zvýšená viskozita krve ⁽¹³⁾. Nárůst hmotnosti pravé i levé srdeční komory je ve shodě s pracemi zabývajícími se adaptací na IHH ^(25,47).

Adaptace na KNH a INH způsobila zvýšení hmotnosti pravé komory. Tyto výsledky jsou ve shodě s pracemi, které používaly stejný stupeň hypoxie, např. Morel a spol. ⁽⁴⁸⁾ (IHH, 23 hod/den, 2 týdny, 5500 m) a Rouet-Benzineb a spol. ⁽⁴²⁾ (INH, 23 hod/den, 8, 15, 21 dnů, 10 % O₂). Zmiňovaní autoři pozorovali také snížení tělesné hmotnosti. V našem pokusu došlo pouze k nepatrnému poklesu tělesné hmotnosti, který nebyl statisticky významný.

Po adaptaci na IHH byly hmotnostní změny větší než po adaptaci na KNH a INH, což je v souladu s rozdílem ve stupni hypoxie (u IHH byl barometrický tlak snížen na hodnotu odpovídající 7000 m, zatímco obsah kyslíku (10 %) u KNH a INH odpovídal stupni hypoxie v 5500 m).

6.2. Homogenizace a frakcionace tkáně

Postupy homogenizace a frakcionace byly zvoleny podle metod převzatých z prací zabývajících se analýzou PKC^(80,81,82,83). Tkáň byla uchovávána v kapalném dusíku, poté byla rozdrčena na prášek a homogenizována pomocí Potter-Elvehjemova homogenizátoru^(80,84). Centrifugací homogenátu (100 000 × g/1,5 hod) jsme získali cytosol a partikulární frakci ve formě peletu. Podíl proteinů v cytosolu se u jednotlivých experimentálních skupin (N, IHH, KNH, INH) pohyboval v rozmezí 24–31 % z celkového množství proteinů. Práce zabývajících se homogenizací a frakcionací srdeční tkáně obdobným způsobem uvádějí srovnatelné výtěžky^(32,85).

Z peletu partikulární frakce a z části homogenátu jsme připravili extrakty pomocí Tritonu X-100. Extrakce představuje částečný purifikační krok, během kterého jsou z membrán extrahovány prakticky všechny isoformy PKC. Tento krok vede ke zpřesnění výsledků. Spolu s PKC přechází do extraktu homogenátu u jednotlivých experimentálních skupin (N, IHH, KNH, INH) 32–36 % proteinů homogenátu. Tyto výsledky se shodují s naší předchozí prací, kdy jsme za stejných homogenizačních a frakcionačních podmínek získali obdobné výsledky⁽⁸⁶⁾. Extrakce buněčných frakcí Tritonem je používána ve většině laboratoří zabývajících se analýzou isoform PKC^(48,82,85).

Nenalezli jsme žádné statisticky významné rozdíly mezi koncentracemi proteinů v jednotlivých frakcích (homogenát, cytosol, extrakt partikulární frakce a homogenátu) ani v peletech (po extrakci homogenátu a partikulární frakce) za různých experimentálních podmínek. Adaptace na IHH, KNH ani INH neovlivnila množství proteinů extrahovatelných Tritonem X-100.

6.3. Identifikace isoform PKC

Isoformy PKC δ a PKC ϵ byly identifikovány pomocí primárních protilátek Sigma, P – PKC ϵ (Ser 729) pomocí primární protilátky Upstate Signalling. Pozici ECL signálu jsme zjistili pomocí pozitivní kontroly (tritonový extrakt homogenátu mozku potkana), která je používána v řadě laboratoří zabývajících se analýzou PKC^(80,81,87), a také srovnáním elektroforetické pohyblivosti s pozicemi proteinových standardů známých

molekulových hmotností. Signál PKC δ byl identifikován jako proužek o průměrné molekulové hmotnosti 76 kDa, signál PKC ϵ jako dva proužky o průměrné molekulové hmotnosti 92 kDa a signál P – PKC ϵ jako proužek o průměrné molekulové hmotnosti 95 kDa.

6.4. Relativní zastoupení PKC δ , PKC ϵ a P – PKC ϵ po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii 7000 m

V tomto experimentu jsme sledovali změny relativního zastoupení isoform PKC δ a PKC ϵ v homogenátu, cytosolu a partikulární frakci v levé komoře myokardu potkana po adaptaci na IHH. Cílem bylo ověřit výsledky publikované na tomto modelu hypoxie a doplnit je o analýzu P – PKC ϵ .

PKC δ je v myokardu potkana přítomna zejména v partikulární frakci, což je v souladu s literaturou i předchozími výsledky naší laboratoře^(39,47,85). Adaptace na IHH zvýšila relativní zastoupení PKC δ v homogenátu a obou buněčných frakcích, tj. v cytosolu i partikulární frakci. Tyto výsledky potvrzují předchozí studie, kde bylo po adaptaci na IHH zjištěno zvýšené zastoupení PKC δ jak v celkové partikulární frakci, tak v jednotlivých buněčných frakcích (cytosolu, nukleárně-cytoskeletární, mitochondriální i mikrosomální frakci) oproti normoxické skupině^(25,39,47).

Po adaptaci na IHH jsme zaznamenali snížení relativního zastoupení PKC ϵ v homogenátu a partikulární frakci. Pokles relativního zastoupení PKC ϵ v partikulární frakci pozorovali na modelu IHH i Kolář a spol.⁽⁴⁷⁾ a Hlaváčková a spol.⁽³⁹⁾. Naproti tomu Neckář a spol.⁽²⁵⁾ nezjistili na modelu IHH žádné změny v relativním zastoupení PKC ϵ v jednotlivých buněčných frakcích. Tento rozdíl může být výsledkem odlišného homogenizačního a frakcionačního postupu. V případě studie Neckáře a spol.⁽²⁵⁾ byla tkáň homogenizována stříháním, nikoli drcením v tekutém dusíku v třecí misce, a nebylo analyzováno debris (pelet po stočení při 800 \times g). Tyto výsledky ukazují, že volba způsobu homogenizace tkáně a frakcionačního postupu může významně ovlivnit proces izolace PKC, její distribuci a následně charakter pozorovaných změn. Tuto hypotézu podporují výsledky studie Huntera a spol.⁽⁸⁸⁾, která ukázala, že volba postupu izolace PKC (koncentrace Tritonu X-100, způsob homogenizace, frakcionační protokol) z myokardu

levé komory potkana významně ovlivňuje distribuci PKC v jednotlivých buněčných frakcích. Z tohoto důvodu je při porovnávání výsledků jednotlivých studií zabývajících se úlohou PKC v mechanismu působení chronické hypoxie velmi důležité brát v úvahu nejen odlišné modely adaptace na chronickou hypoxii, ale také postupy izolace isoform PKC.

Podobně jako v naší studii, Ding a spol. ⁽³⁷⁾ pozorovali v myokardu po adaptaci na mírnější stupeň IHH (6 hod/den, 6 týdnů, 5000 m) zvýšení v relativním zastoupení PKC δ v partikulární frakci. Na rozdíl od nás tito autoři pozorovali v partikulární frakci také zvýšení relativního zastoupení PKC ϵ . Zda v této diskrepanci hraje roli volba nižší nadmořské výšky nebo jiný časový interval reoxygenace, je obtížné posoudit a bylo by třeba experimentálního ověření.

Sledovali jsme také změny fosforylace PKC ϵ (vyjádřené jako poměr P – PKC ϵ a celkové PKC ϵ) na serinu 729 v „turn“ motivu. Tato pozice patří ke třem konzervovaným místům fosforylace PKC ϵ . Fosforylace je jedním ze znaků svědčících o maturaci enzymu (vzniku katalyticky aktivního enzymu). Ačkoliv adaptace na IHH snížila obsah celkové PKC ϵ v buněčných frakcích ve srovnání s normoxickými hodnotami, neovlivnila relativní zastoupení P – PKC ϵ v těchto buněčných frakcích. Tyto výsledky naznačují, že myokard levé komory potkana adaptovaného na IHH má tendenci si udržet stejnou hladinu katalyticky aktivní (fosforylované) PKC ϵ , jaká je u normoxických kontrol.

Co se týče fyziologických parametrů, došlo po adaptaci na IHH ke snížení velikosti infarktu (na 71 % normoxické hodnoty), které negativně korelovalo s relativním zastoupením isoformy PKC δ ⁽²⁵⁾. Neckář a spol. ⁽²⁵⁾ ukázali, že podání obecného inhibitoru PKC, chelerytrinu, vedlo k úplnému zrušení kardioprotekce indukované adaptací na IHH. Podání inhibitoru PKC δ , rotlerinu, vedlo k oslabení tohoto kardioprotektivního účinku. Rotlerin také potlačil kolokalizaci PKC δ s mitochondriemi vyvolanou adaptací na IHH ⁽³⁹⁾. Z těchto výsledků vyplývá, že se v kardioprotektivním účinku adaptace na IHH zřejmě uplatňuje PKC δ . Pokud jde o uplatnění dalších isoform PKC, nabízí se PKC α , u které bylo také pozorováno zvýšení jejího relativního zastoupení v jednotlivých buněčných frakcích z myokardu potkana po adaptaci na IHH ⁽⁶⁴⁾ nebo PKC ϵ , která je spolu s PKC δ jednou z nejhojněji zastoupených isoform PKC v myokardu dospělého potkana ⁽⁸⁹⁾. Ze studií zabývajících se kardioprotektivním účinkem IPC je zřejmé,

že isoformy PKC δ a PKC ϵ se ve svém působení podporují a jejich úloha v kardioprotekci je závislá na načasování jejich aktivace^(67,69).

6.5. Relativní zastoupení PKC δ , PKC ϵ a P – PKC ϵ po adaptaci na kontinuální a intermitentní normobarickou hypoxii 5500 m

Modely KNH a INH byly v naší laboratoři zavedeny nově. Zaměřili jsme se na porovnání vlivu KNH a INH na relativní zastoupení PKC δ , PKC ϵ a P – PKC ϵ v homogenátu, cytosolu a partikulární frakci z levé komory myokardu potkana. Přechod z hypobarické komory na normobarickou byl nutný kvůli realizaci modelu kontinuální hypoxie. U hypobarických komor je totiž z technických důvodů obtížné zabránit opakované reoxygenaci při denní péči o zvířata. Dalším odlišným bodem oproti IHH byla doba reoxygenace (1 hod/den) a stupeň hypoxie, který u KNH a INH odpovídal 5500 m (10 % kyslíku).

Zatímco adaptace na KNH nevyvolala změny relativního zastoupení PKC δ , PKC ϵ a P – PKC ϵ v homogenátu, cytosolu ani partikulární frakci z myokardu levé komory potkana oproti normoxii, adaptace na INH zvýšila relativní zastoupení PKC δ v cytosolu a zároveň snížila relativní zastoupení PKC δ v partikulární frakci. Adaptace na INH tedy vedla k přesunu PKC δ z partikulární frakce do cytosolu, což může být znakem její deaktivace anebo změny dostupnosti substrátů. Na relativní zastoupení PKC δ , PKC ϵ a P – PKC ϵ v celé tkáni (homogenát) levé komory myokardu neměla adaptace na INH stejně jako KNH žádný vliv. Skutečnost, že u KNH nedošlo k žádným změnám relativního zastoupení sledovaných enzymů, mohla být způsobena mírnější hypoxií. Nemůžeme ale vyloučit, že nedošlo k translokaci isoform PKC mezi jednotlivými buněčnými kompartmenty/membránami. Podrobnější analýza distribuce PKC v jednotlivých buněčných kompartmentech bude provedena během pokračování projektu pomocí metody fluorescenční imunohistochemie.

Ve shodě s našimi výsledky je studie Rouet-Benzineb a spol.⁽⁴²⁾, kteří použili model INH (23 hod/den, 8, 15 a 21 dnů, 10 % O₂) a nepozorovali změny v celkové aktivitě ani relativním zastoupení katalytického fragmentu žádné z isoform PKC v homogenátu z levé komory myokardu potkanů.

Podobný model kontinuální hypoxie, jako jsme použili v našem pokusu, zavedli i Li a spol. ⁽⁴⁴⁾ a Rafiee a spol. ⁽²⁹⁾. Li a spol. vystavovali březí samice potkanů KNH (24 hod/den, 7 dnů, 10,5 % O₂). U jejich dospělých potomků bylo oproti normoxickým kontrolám zaznamenáno snížené relativní zastoupení PKC ϵ v homogenátu. Rafiee a spol. po adaptaci neonatálních králíků na KNH (24 hod/den, 10 dnů, 10 % O₂) pozorovali v levé komoře myokardu zvýšenou fosforylaci PKC ϵ a její redistribuci do partikulární frakce ve srovnání s normoxickou kontrolou. Tyto výsledky nejsou ve shodě s naší studií, rozdíly mohou být způsobeny odlišnou dobou adaptace zvířat a mezidruhovými rozdíly.

Na modelu IHH (23 hod/den, 2 týdny, 5500 m) zkoumali relativní zastoupení PKC δ a PKC ϵ Morel a spol. ⁽⁴⁸⁾. Ve shodě s naší studií nepozorovali žádné změny v obsahu ani distribuci PKC ϵ v analyzovaných buněčných frakcích z levé komory. V kontrastu s našimi výsledky však nezaznamenali žádné změny v distribuci PKC δ mezi partikulární frakcí a cytosolem, což může být dáno kratší dobou adaptace zvířat.

Adaptace na KNH ovlivnila i citlivost myokardu k ischemicko-reperfúznímu poškození. Předběžné výsledky získané Oddělením vývojové kardiologie Fyziologického ústavu AV ČR v Praze ukazují, že adaptace na KNH vedla ke snížení velikosti infarktu a neměla vliv na výskyt arytmií ve srovnání s normoxickými kontrolami. Ve shodě s těmito výsledky pozorovali Rafiee a spol. ⁽²⁹⁾ zlepšení obnovy kontraktility levé komory neonatálních králíků adaptovaných na KNH (24 hod/den, 10 dnů, 10 % O₂) ve srovnání s normoxickou kontrolou.

Naproti tomu adaptace na INH neměla na velikost infarktu žádný vliv a dokonce vedla ke zvýšení počtu ischemických komorových arytmií. Vysvětlení tohoto překvapivého nálezu bude vyžadovat další podrobné analýzy. Adaptace na INH (1 hod reoxygenace/den) vedla k translokaci PKC δ z partikulární frakce do cytosolu (což je znakem deaktivace), zatímco adaptace na IHH (16 hod reoxygenace/den) zvýšila relativní zastoupení PKC δ ve všech buněčných frakcích (viz výše) a měla kardioprotektivní účinky ⁽²⁵⁾. Tyto výsledky poukazují na význam délky periodické reoxygenace a podporují představu, že přítomnost PKC δ na buněčných membránách hraje významnou roli v kardioprotektivních projevech adaptace na chronickou hypoxii.

Z našich výsledků i výše citovaných studií vyplývá, že účinky chronické hypoxie podstatně závisí na zvoleném experimentálním modelu. Jednotlivé modely se mohou lišit

intenzitou (nadmořská výška, popř. obsah kyslíku), typem komory (normobarická × hypobarická), délkou a frekvencí případných reoxygenačních period a také celkovou dobou adaptace. Účinky adaptace na chronickou hypoxii jsou pravděpodobně závislé na všech těchto aspektech, resp. jejich kombinacích. V naší studii se ukázaly jako klíčové faktory doba reoxygenace a stupeň hypoxie.

7. SHRNU TÍ

Ve své diplomové práci jsem dospěla k následujícím výsledkům:

► **Adaptace potkanů na IHH (7000 m, 8 hod/den):**

- zvýšila relativní zastoupení PKC δ v cytosolu, extraktu partikulární frakce a extraktu homogenátu
- snížila relativní zastoupení PKC ϵ v extraktu partikulární frakce a extraktu homogenátu
- zvýšila poměr P – PKC ϵ /PKC ϵ v cytosolu, extraktu partikulární frakce i extraktu homogenátu
- snížila velikost infarktu

► **Adaptace potkanů na KNH (5500 m, 24 hod/den):**

- nevyvolala změny relativního zastoupení PKC δ , PKC ϵ ani P – PKC ϵ v cytosolu, extraktu partikulární frakce ani extraktu homogenátu
- snížila velikost infarktu

► **Adaptace potkanů na INH (5500 m, 23 hod/den):**

- zvýšila relativní zastoupení PKC δ v cytosolu
- snížila relativní zastoupení PKC δ v extraktu partikulární frakce
- způsobila translokaci PKC δ z membrán do cytosolu
- neovlivnila velikost infarktu

Závěr:

Účinky chronické hypoxie na relativní zastoupení isoform PKC δ a PKC ϵ v myokardu levé komory a na kardioprotekci závisí na konkrétním experimentálním modelu hypoxie. Zdá se, že zde hraje podstatnou úlohu stupeň hypoxie (nadmořská výška, popř. obsah kyslíku), typ komory (normobarická \times hypobarická) a délka a frekvence případných reoxygenačních period. Naše výsledky jsou v souladu s představou, že přítomnost PKC δ na buněčných membránách hraje významnou roli v kardioprotektivním mechanismu chronické hypoxie.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Kolář, F., Ošťádal, B.: Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res.* 53, S3–S13 (2004).
2. Vokurka, M., Hugo, J. a kol.: Velký lékařský slovník. Maxdorf Jessenius, str. 390 (2002).
3. Zhu, W. Z., Xie, Y., Chen, L., Yang, H. T., Zhou, Z. N.: Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 40 (1), 96–106 (2006).
4. Budas, G. R., Churchill, E. N., Mochly-Rosen, D.: Cardioprotective mechanisms of PKC isoenzyme-selective activators and inhibitors in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol Res.* 55 (6), 523–536 (2007).
5. Hearse, D. J.: Ischemia, reperfusion, and the determinants of tissue injury. *Cardiovasc Drugs Ther.* 4, 767–776 (1990).
6. Murry, C. E., Jennings, R. B., Reimer, K. A.: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 74 (5), 1124–1136 (1986).
7. Zaugg, M., Lucchinetti, E., Uecker, M., Pasch, T., Schaub, M. C.: Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms. *Br J Anaesth.* 91 (4), 551–565 (2003).
8. Otani, H.: Ischemic preconditioning: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antiox Redox Signal.* 10 (2), 207–247 (2008).
9. Lim, S. Y., Davidson, S. M., Hausenloy, D. J., Yellon, D. M.: Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res.* 75 (3), 530–535 (2007).

10. Kloner, R. A., Jennings, R. B.: Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation*. 104 (24), 2981–2989 (2001).
11. Speechly-Dick, M. E., Mocanu, M. M., Yellon, D. M.: Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circ Res*. 75 (3), 586–590 (1994).
12. Moret, P. R.: Hypoxia and the heart. V knize: *Hearts and Heart-like Organs* (Bourne, G. H. ed.). Academic Press, New York, str. 333–387 (1980).
13. Ošťádal, B., Kolář, F.: Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: Beneficial and adverse effects. *Respir Physiol Neurobiol*. 158, 224–236 (2007).
14. Ošťádal, B., Kolář, F., Pelouch, V., Procházka, J., Widimský, J.: Intermittent high altitude and cardiopulmonary systém. V knize: *The adapted heart* (Nagano, M., Takeda, N., Dhalla, N. S. ed.). Raven Press, New York, str. 173–182 (1994).
15. Kolář, F., Ošťádal, B., Procházka, J., Pelouch, V., Rajecová, O., Štrec, V., Bárta, E.: Age-dependent influence of a moderate altitude (1,350 m) on the rat cardiopulmonary system. *Physiol Bohemoslov*. 37 (5), 443–450 (1988).
16. Kasalický, J., Ressler, J., Urbanová, D., Widimský, J., Ošťádal, B., Pelouch, V., Vízek, M., Procházka, J.: Relative organ blood flow in rats exposed to intermittent high altitude hypoxia. *Pflugers Arch*. 368, 111–115 (1977).
17. Scheel, K. W., Seavey, E., Gaugl, J. F., Williams, S. E.: Coronary and myocardial adaptations to high altitude in dogs. *Am J Physiol*. 259, H1667–H1673 (1990).
18. Scholz, H., Schurek, H. J., Eckardt, K. U., Bauer, C.: Role of erythropoietin in adaptation to hypoxia. *Experientia*. 46, 1197–1201 (1990).

19. Bass, A., Ošťádal, B., Procházka, J., Pelouch, V., Šamánek, M., Stejskalová, M.: Intermittent high altitude-induced changes in energy metabolism in the rat myocardium and their reversibility. *Physiol Bohemoslov.* 38 (2), 155–161 (1989).
20. Ziegelhöffner, A., Procházka, J., Pelouch, V., Ošťádal, B., Dzurba, A., Vrbjar, N.: Increased affinity to substrate in sarcolemmal ATPases from hearts acclimatized to high altitude hypoxia. *Physiol Bohemoslov.* 36 (5), 403–415 (1987).
21. Kolář, F., Ošťádal, B., Procházka, J., Pelouch, V., Widimský, J.: Comparison of cardiopulmonary response to intermittent high-altitude hypoxia in young and adult rats. *Respiration.* 56, 57–62 (1989).
22. Kolář, F., Ošťádal, B.: Right ventricular function in rats with hypoxic pulmonary hypertension. *Pflugers Arch.* 419 (2), 121–126 (1991).
23. Urbanová, D., Pelouch, V., Ošťádal, B., Widimský, J., Ressler, J., Procházka, J.: The development of myocardial changes during intermittent high altitude hypoxia in rats. *Cor Vasa.* 19 (3), 246–250 (1977).
24. Pelouch, V., Kolář, F., Ošťádal, B., Milerová, M., Čihák, R., Widimský, J.: Regression of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy, and fibrosis: effect of enalapril. *Cardiovasc Drugs Ther.* 11 (2), 177–185 (1997).
25. Neckář, J., Marková, I., Novák, F., Nováková, O., Szarszoi, O., Ošťádal, B., Kolář, F.: Increased expression and altered subcellular distribution of PKC-delta in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288 (4), H1566–H1572 (2005).
26. Ravingerová, T., Matějčková, J., Neckář, J., Andělová, E., Kolář, F.: Differential role of PI3K/Akt pathway in the infarct size limitation and antiarrhythmic protection in the rat heart. *Mol Cell Biochem.* 297, 111–120 (2007).

27. Faltová, E., Mráz, M., Pelouch, V., Procházka J., Ošťádal, B.: Increase and regression of the protective effect of high altitude acclimatization on the isoprenaline-induced necrotic lesions in the rat myocardium. *Physiol Bohemoslov.* 36 (1), 43–52 (1987).
28. Xie, Y., Zhu, Y., Zhu, W. Z., Chen, L., Zhou, Z. N., Yuan, W. J., Yang, H. T.: Role of dual-site phospholamban phosphorylation in intermittent hypoxia-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288 (6), H2594–H2602 (2005).
29. Rafiee, P., Shi, Y., Kong, X., Pritchard, K. A. Jr., Tweddell, J. S., Litwin, S. B., Mussato, K., Jaquiss, R. D., Su, J., Baker, J. E.: Activation of protein kinases in chronically hypoxic infant human and rabbit hearts: role in cardioprotection. *Circulation.* 106 (2), 239–245 (2002).
30. Neckář, J., Ošťádal, B., Kolář, F.: Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiol Res.* 53 (6), 621–628 (2004).
31. Kolář, F., Novák, F., Neckář, J., Nováková, O., Ošťádal, B., Musters, R. J. P.: Role of protein kinases in chronic intermittent hypoxia-induced cardioprotection. V knize: *Physiology and Pathophysiology of Intermittent Hypoxia* (Xi L. ed.), Serebrovskaya T.V., Nova Science Publ., Hauppauge N.Y., v tisku (2008).
32. Břeh, J.: Vliv N-acetylcysteinu na expresi proteinkinasy C v myokardu potkana adaptovaného na chronickou hypoxii. Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie, (2005).
33. Neckář, J., Papoušek, F., Nováková, O., Ošťádal, B., Kolář, F.: Cardioprotective effects of chronic hypoxia and preconditioning are not additive. *Basic Res Cardiol.* 97 (2), 161–167 (2002).

34. Kolář, F., Neckář, J., Ošťádal, B.: MCC-134, a blocker of mitochondrial and opener of sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels, abrogates cardioprotective effects of chronic hypoxia. *Physiol Res.* 54 (4), 467–471 (2005).
35. Shanmuganathan, S., Hausenloy, D. J., Duchon, M. R., Yellon, D. M.: Mitochondrial permeability transition pore as a target for cardioprotection in the human heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289 (1), H237–242 (2005).
36. Ressler, J., Urbanová, D., Widimský, J., Ošťádal, B., Pelouch, V., Procházka, J.: Reversibility of pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy induced by intermittent high altitude hypoxia in rats. *Respiration.* 31 (1), 38–46 (1974).
37. Ding, H. L., Zhu, H. F., Dong, J. W., Zhu, W. Z., Zhou, Z. N.: Intermittent hypoxia protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury by activating protein kinase C. *Life Sci.* 75, 2587–2603 (2004).
38. Li, J., Zhang, H., Zhu, W. Z., Yu, Z., Guo, A., Yang, H. T., Zhou, Z. N.: Preservation of the p*H*_i during ischemia via PKC by intermittent hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 356 (2), 329–333 (2007).
39. Hlaváčková, M., Neckář, J., Ježková, J., Bálková, P., Staňková, B., Nováková, O., Kolář, F., Novák, F.: Dietary polyunsaturated fatty acids alter myocardial protein kinase C expression and affect cardioprotection induced by chronic hypoxia. *Exp Biol Med.* 232 (6), 823–832 (2007).
40. Yeung, H. M., Kravtsov, G. M., Ng, K. M., Wong, T. M., Fung, M. L.: Chronic intermittent hypoxia alters Ca²⁺ handling in rat cardiomyocytes by augmented Na⁺/Ca²⁺ exchange and ryanodine receptor activities in ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292 (6), C2046–C2056 (2007).

41. Morel, S., Milano, G., Ludunge, K. M., Corno, A. F., Samaja, M., Fleury, S., Bonny, C., Kappenberger, L., von Segesser, L. K., Vassalli, G.: Brief reoxygenation episodes during chronic hypoxia enhance posthypoxic recovery of LV function: role of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Basic Res Cardiol.* 101 (4), 336–345 (2006).
42. Rouet-Benzineb, P., Eddahibi, S., Raffestin, B., Laplace, M., Depond, S., Adnot, S., Crozatier, B.: Induction of cardiac nitric oxide synthase 2 in rats exposed to chronic hypoxia. *J Mol Cell Cardiol.* 31 (9), 1697–1708 (1999).
43. Cataldi, A., Bianchi, G., Rapino, C., Sabatini, N., Centurione, L., Di Giulio, C., Bosco, D., Antonucci, A.: Molecular and morphological modifications occurring in rat heart exposed to intermittent hypoxia: role for protein kinase C alpha. *Exp Gerontol.* 39 (3), 395–405 (2004).
44. Li, G., Bae, S., Zhang, L.: Effect of prenatal hypoxia on heat stress-mediated cardioprotection in adult rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286 (5), H1712–H1719 (2004).
45. Chen, L. M., Kuo, W. W., Yang, J. J., Wang, S. G., Yeh, Y. L., Tsai, F. J., Ho, Y. J., Chang, M. H., Huang, C. Y., Lee, S. D.: Eccentric cardiac hypertrophy was induced by long-term intermittent hypoxia in rats. *Exp Physiol.* 92 (2), 409–416 (2007).
46. Asemu G., Neckář J., Szárszoi O., Papoušek F., Ošťádal B., Kolář F.: Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats. *Physiol Res.* 49 (5), 597–606 (2000).
47. Kolář, F., Ježková, J., Bálková, P., Břeh, J., Neckář, J., Novák, F., Nováková, O., Tomášová, H., Srbová, M., Ošťádal, B., Wilhelm, J., Herget, J.: Role of oxidative stress in PKC- δ upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292 (1), H224–H230 (2007).

48. Morel, O. E., Buvry, A., Le Corvoisier, P., Tual, L., Favret, F., León-Velarde, F., Crozatier, B., Richalet, J. P.: Effects of nifedipine-induced pulmonary vasodilatation on cardiac receptors and protein kinase C isoforms in the chronically hypoxic rats. *Pflugers Arch.* 446 (3), 356–364 (2003).
49. Steinberg, S. F.: Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev.* 88 (4), 1341–1378 (2008).
50. Nishizuka, Y.: Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9 (7), 484–496 (1995).
51. Mackay, H. J., Twelves, C. J.: Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat Rev Cancer.* 7 (7), 554–62 (2007).
52. Barnett, M. E., Madgwick, D. K., Takemoto, D. J.: Protein kinase C as a stress sensor. *Cell Signal.* 19 (9), 1820–1829 (2007).
53. Newton, A. C.: Protein kinase C: Structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* 270 (48), 28495–28498 (1995).
54. Webb, B. L., Hirst, S. J., Giembycz, M. A.: Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. *Br J Pharmacol.* 130 (7), 1433–1452 (2000).
55. Ueyama, T., Ren, Y., Ohmori, S., Sakai, K., Tamaki, N., Saito, N.: cDNA cloning of an alternative splicing variant of protein kinase C delta (PKC deltaIII), a new truncated form of PKCdelta, in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 269 (2), 557–563 (2000).
56. Ron, D., Kazanietz, M. G.: New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *Faseb J.* 13 (13), 1658–1676 (1999).
57. Newton, A. C.: Protein Kinase C Family. *Encyclopedia of Biological Chemistry* (3), 523–526 (2004).

58. Steinberg S. F.: Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta. *Biochem J.* 384, 449–459 (2004).
59. Kikkawa, U., Matsuzaki, H., Yamamoto, T.: Protein kinase C δ (PKC δ): activation mechanisms and functions. *J Biochem.* 132 (6), 831–839 (2002).
60. Akita, Y.: Protein Kinase C- ϵ (PKC- ϵ): its unique structure and function. *J Biochem.* 132 (6), 847–852 (2002).
61. Schechtman, D., Mochly-Rosen, D.: Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene.* 20 (44), 6339–6347 (2001).
62. Kheifets, V., Bright, R., Inagaki, K., Schechtman, D., Mochly-Rosen, D.: Protein kinase C δ (δ PKC)-annexin V interactions: a required step in δ PKC translocation and function. *J Biol Chem.* 281 (32), 23218–23226 (2006).
63. Webb, A., Bond, R., McLean, P., Uppal, R., Benjamin, N., Ahluwalia, A.: Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101 (37), 13683–13688 (2004).
64. Lacinová, V.: Vliv akutní ischemie na expresi proteinkinasy C v myokardu potkana adaptovaného na chronickou hypoxii. Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie, (2002).
65. Murriel, C. L., Churchill, E., Inagaki, K., Szveda, L. I., Mochly-Rosen, D.: Protein kinase Cdelta activation induces apoptosis in response to cardiac ischemia and reperfusion damage: a mechanism involving BAD and the mitochondria. *J Biol Chem.* 279 (46), 47985–47991 (2004).
66. Nguyen, T., Ogbi, M., Johnson, J. A.: Delta protein kinase C interacts with the d subunit of the F₁F₀ ATPase in neonatal cardiac myocytes exposed to hypoxia or phorbol ester. *J Biol Chem.* 283 (44), 29831–29840 (2008).

67. Inagaki, K., Mochly-Rosen, D.: DeltaPKC-mediated activation of epsilonPKC in ethanol-induced cardiac protection from ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 39 (2), 203–211 (2005).
68. Mayr, M., Metzler, B., Chung, Y. L., McGregor, E., Mayr, U., Troy, H. et al.: Ischemic preconditioning exaggerates cardiac damage in PKC-delta null mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287 (2), H946–H956 (2004).
69. Mayr, M., Liem, D., Zhang, J., Li, X., Avliyakov, N. K., Yang, J. I., Young, G., Vondriska, T. M., Ladroue, C., Madhu, B., Griffiths, J. R., Gomes, A., Xu, Q., Ping, P.: Proteomic and metabolomic analysis of cardioprotection: Interplay between protein kinase C epsilon and delta in regulating glucose metabolism of murine hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 46 (2), 268–277 (2009).
70. Churchill, E. N., Disatnik, M. H., Mochly-Rosen, D.: Time-dependent and ethanol-induced cardiac protection from ischemia mediated by mitochondrial translocation of ϵ PKC and activation of aldehyde dehydrogenase 2. *J Mol Cell Cardiol.* 46 (2), 278–284 (2009).
71. Dorn, G. W., Force, T.: Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest.* 115 (3), 527–537 (2005).
72. Albert, C. J., Ford, D. A.: Protein kinase C translocation and PKC-dependent protein phosphorylation during myocardial ischemia. *Am J Physiol.* 276, H642–H650 (1999).
73. Strasser, R. H., Simonis, G., Schön, S. P., Braun, M. U., Ihl-Vahl, R., Weinbrenner, C., Marquetant, R., Kübler, W.: Two distinct mechanisms mediate a differential regulation of protein kinase C isozymes in acute and prolonged myocardial ischemia. *Circ Res.* 85 (1), 77–87 (1999).
74. Peterson, G. L.: A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem.* 83 (2), 346–356 (1977).

75. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193 (1), 265–275 (1951).
76. Ogita, Z. I., Markert, C. L.: A miniaturized system for electrophoresis on polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 99 (2), 233–241 (1979).
77. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proct Natl Acad Sci USA.* 76 (9), 4350–4354 (1979).
78. Amersham: ECL Western blotting detection reagents ECL Western blotting analysis system. Instruction manual, procedures & troubleshooting (1997).
79. Bio-Rad: Immun-Blot[®] Assay Kit. Instruction manual (1996).
80. Albert, C. J., Ford, D. A.: Protein kinase C translocation and PKC-dependent protein phosphorylation during myocardial ischemia. *Am J Physiol.* 276, H642–H650 (1999).
81. Gu, X., Bishop, S. P.: Increased protein kinase C and isozyme redistribution in pressure-overload cardiac hypertrophy in the rat. *Circ Res.* 75 (5), 926–931 (1994).
82. Strasser, R. H., Simonis, G., Schön, S. P., Braun, M. U., Ihl-Vahl, R., Weinbrenner, C., Marquetant, R., Kübler, W.: Two distinct mechanisms mediate a differential regulation of protein kinase C isozymes in acute and prolonged myocardial ischemia. *Circ Res.* 85 (1), 77–87 (1999).
83. Yoshida, K., Hirata, T., Akita, Y., Mizukami, Y., Yamaguchi, K., Sorimachi, Y., Ishihara, T., Kawashima, S.: Translocation of protein kinase C- α , δ and ϵ isoforms in ischemic rat heart. *Biochim Biophys Acta.* 1376 (1), 36–44 (1996).

84. Koide, H., Ogita, K., Kikkawa, U., Nishizuka, Y.: Isolation and characterization of the epsilon subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89 (4), 1149–1153 (1992).
85. Goldberg, M., Zhang, H. L., Steinberg, S. F.: Hypoxia alters the subcellular distribution of protein kinase C isoforms in neonatal rat ventricular myocytes. *J Clin Invest*. 99 (1), 55–61 (1997).
86. Hlaváčková, M.: Proteinkinasa C v mechanismu protekce myokardu adaptovaného na chronickou hypoxii: vliv diety o různém složení PUFA. Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie, (2004).
87. Ways, D. K., Cook, P. P., Webster, C., Parker, P. J.: Effect of phorbol esters on protein kinase C-zeta. *J Biol Chem*. 267 (7), 4799–4805 (1992).
88. Hunter, J. C., Korzick, D. H.: Protein kinase C distribution and translocation in rat myocardium: Methodological considerations. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 51 (2), 129–138 (2005).
89. Mackay, K., Mochly-Rosen, D.: Localization, anchoring, and functions of protein kinase C isoenzymes in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 33 (7), 1301–1307 (2001).

SOUHLAS SE ZAPŮJČENÍM

Dávám svolení k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka