

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Katedra fyziologie živočichů



**Analýza transkriptů vybraných genů v myokardu
potkana adaptovaného na chronickou hypoxii**

**Analysis of selected gene transcripts in the rat myocardium
adaptated to chronic hypoxia**

Bc. Dita Kašparová

Diplomová práce

Školitelka: RNDr. Jitka Žurmanová, PhD.

Praha 2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Jitky Žurmanové, PhD., a s použitím citované literatury.

V Praze dne:

Podpis:

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala své školitelce RNDr. Jitce Žurmanové, PhD. za její odborné vedení a mnoho cenných rad, laskavý přístup, velkou ochotu a trpělivost při sepisování této práce. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Janu Neckáři, PhD. za jeho odborné konzultace, které mi byly taktéž velkým přínosem.

V neposlední řadě patří můj velký dík mé rodinně a blízkým přátelům, kteří mě po dobu mého studia vytrvale podporovali.

Diplomová práce byla vypracována s podporou grantových projektů GAAV IAAX 01110901, IAA 601110908, a MSM0021620858.

Abstrakt

Adaptace na chronickou hypoxii je charakterizována různými změnami za účelem udržení metabolické a energetické homeostázy. Po mnoho let je již známo, že lidé a zvířata, přirozeně žijící ve vysokých nadmořských výškách, mají zvýšenou odolnost vůči poškození akutnímu ischemickému poškození srdce. Kardioprotektivní mechanismy aktivované adaptační odpovědí na expozici chronické hypoxii, mohou být výsledkem změny v transkripční regulaci v levé komoře. Zde předládáme výsledky exprese genů ve třech modelech chronicky adaptovaného srdce. Dospělí samci potkana kmene Wistar byli vystaveni 21 dnů buď kontinuální normobarické hypoxii (CCH; 10% O₂) nebo CCH přerušené denní 1-hodinovou reoxygenací (RCH) nebo CCH přerušené denně na 8-hodin (CIH). Kardioprotektivní efekt CCH adaptace ruší rychlá denní reoxygenace, RCH adaptace. Cílem této práce je stanovit myokardiální mRNA expresi 19 kandidátních genů, které jsme rozdělili na tři skupiny: i) Hypoxií indukovaný faktor (HIF1 α) and jeho prolyl a asparaginyl hydroxylasy (PHD a FIH v uvedeném pořadí), ii) izoenzymy kreatin kinázy (CK), které hrají významnou roli v energetické homeostáze srdce iii) a skupina hlavních enzymatických antioxidantů, které udržují přiměřenou hladinu volných kyslíkových radikálů (ROS) v buňce.

Klíčová slova: srdce, hypoxie, kardioprotekce, mRNA, hypoxií indukovaný transkripční faktor, kreatin kináza, oxidativní stress, antioxidantní enzymy

Abstract

Adaptation to chronic hypoxia (CH) is characterized by a variety of functional changes in order to maintain metabolic and energy homeostasis. It has been known for many years that both humans and animals indigenous or adapted to high-altitude hypoxia are more tolerant to an acute ischemic injury of the heart. Cardioprotective mechanisms activated by adaptive responses to chronic hypoxia can be the result of altered transcriptional regulations in left ventricles. Here we report results from the gene expression profiling of adaptive responses in three models of chronically hypoxic heart. Adult male Wistar rats were exposed for 21 days to either continuous normobaric hypoxia (CCH; 10% O₂) or CCH interrupted daily by 1-hour reoxygenation (RCH) or CCH interrupted daily by 8-hour (CIH). Cardioprotective effect of CCH adaptation is abolished by brief daily reoxygenation, RCH adaptation. In the present study, we aimed to determine myocardial mRNA expression of 19 candidate genes divided into three important groups: i) Hypoxia inducible factor (HIF1 α) and its prolyl and asparaginyl hydroxylases (PHDs and FIH respectively, ii) Creatine kinase (CK) isoenzymes which play important role in energy homeostases of heart and iii) the group of main enzymatic antioxidants which maintain appropriate ROS level in the cells.

Key words: Heart, Hypoxia, Cardioprotection, mRNA, Hypoxia inducible factor, Creatine kinase, Oxidative stress, Antioxidant enzymes

Obsah :**Seznam zkratk**

1. Úvod	10
2. Literární přehled.....	12
2.1. Hypoxie.....	12
2.1.1. Chronická hypoxie.....	13
2.1.2. Kardioprotektivní účinek chronické hypoxie	13
2.2. Oxidační stres.....	15
2.2.1. HIF a jeho regulační geny	15
2.2.1.1. Strategie aktivace cílových genů HIF.....	17
2.2.1.2. Regulace HIF.....	18
2.2.2. ROS	20
2.2.2.1. Zdroje ROS	20
2.2.2.2. Funkce ROS v buňce	21
2.2.2.3. Odbourávání ROS v buňce	22
2.2.3. Oxidační a antioxidační enzymy	23
2.2.3.1. Monoamin oxidáza A (MAO A).....	23
2.2.3.2. Kataláza (CAT).....	25
2.2.3.3. Superoxid dismutáza (SOD)	25
2.2.3.4. Akonitáza (ACO).....	26
2.2.3.4. ROS a mechanismy udržení redoxní homeostázy	27
2.2.3.4.1. Glutathionový systém	28
2.2.3.4.2. Thioredoxinový systém.....	32
2.2.4. Enzymy energetického metabolismu.....	37
2.2.4.1. Kreatin kináza.....	37
2.2.4.1.1. Cytosolické CK izoformy	38
2.2.4.1.2. Mitochondriální izoformy	38
3. Cíle diplomové práce	39
4. Metodika	40
4.1. Adaptace potkanů na hypoxii.....	40
4.2. Izolace RNA.....	41
4.2.1. Příprava vzorků	41
4.2.2. Homogenizace srdečního svalu	42
4.2.3. Izolace RNA	42

4.2.4. Precipitace RNA	42
4.2.5. Promývání RNA	43
4.2.6. Rozpouštění RNA.....	43
4.2.7. Měření koncentrace RNA.....	43
4.2.8. Čištění RNA	43
4.3. Reverzní transkripce.....	44
4.4. Real Time RT PCR	44
4.5. PCR	46
5. Výsledky.....	47
6. Diskuze	50
7. Závěr	57
8. Přílohová část	58
9. Internetové zdroje.....	88
10. Použitá literatura	89

Seznam zkratk :

ACO	akonitáza
ADM	adrenomedulin
ANP	atriální natriuretický peptid
AP-1	aktivační protein 1
ASK-1	apoptózou signálně-regulační kináza 1
ATP	adenosintrifosfát
BNIP3	„BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3“
BNIP3L	„BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like“
BNP	B-tyt natriuretického peptidu
CAT	kataláza
CCH	chronická kontinuální hypoxie
CIH	chronická intermitentní hypoxie
CITED2	„Cbp/p300-interacting transactivator 2“
CK B	kreatinkináza - <i>brain</i>
CK M	kreatinkináza - <i>muscle</i>
CK	kreatinkináza
DEPC	diethyl pyrokarbonát – nespecifický inhibitor RNAs
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNTP	deoxynukleotidtrifosfát
<i>Egln</i>	gen kódující PHD
ET-1	endotelin-1
ETS-1	„v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1“
FAD	flavin adenine dinucleotide
FIH	faktor inhibující HIF (asparagynyl hydroxyláza)
FLT1	vaskulární endoteliální růstový faktor receptor 1
FOS	„FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog“
FOSL2	„FOS-related antigen 2“
GLUT1	glukóza transporter 1
GPx	glutathion peroxidáza
GSH	glutathion
GSR	glutathion reduktáza
GSSG	oxidovaný glutathion

GST	glutathion-S-transferáza
HIF	hypoxií indukovaný transkripční faktor
HK2	hexokináza2
HRE	„hypoxia responsive element“
IGFBP	„insulin-like growth factor binding protein“
iNOS	inducibilní NO syntáza
IRE	„iron responsive element“
IREB	„iron-regulatory element binding protein“
IRP	„iron-regulatory protein“
LDH-A	laktát dehydrogenáza A
LV	levá komora srdce
MAO	monoamin oxidáza
mitoCKs	mitochondriální kreatinkináza - <i>sarcomeric</i>
mitoCKu	mitochondriální kreatinkináza - <i>ubiquitus</i>
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MXI1	MAX interaktor 1
N	normoxie
NADP	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NF- κ B	jaderný faktor lehkého polypeptidu κ zesilovače genu v B buňkách
PCr	kreatinfosfát
PDGF	růstový faktor krevních destiček
PFK2	fosfofruktokináza 2
PGK1	fosfoglycerát kináza 1
PHD	prolyl hydroxyláza
PRx	peroxiredoxin
Q10	ubichinon
RCH	chronická hypoxie s reoxygenací
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
RT PCR	real time RT PCR (Polymerase Chain Reaction)
RV	pravá komora srdce
S	septum
SDS	dodecyl sulfát sodný

SOD	superoxid dismutáza
TGF	tumorový růstový faktor
TRX	thioredoxin
TXNRD	thioredoxin reduktáza
<i>Txnrd</i>	gen kódující TXNRD
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

1. Úvod

Pokud se celému tělu nebo jen určité oblasti nedostává takového množství kyslíku, jaké je adekvátní, nazýváme tento stav hypoxií. Je známo, že tento hypoxický stres má v závislosti na své intenzitě za následek mnohé poruchy životních funkcí a je jedním z hlavních příčin srdečního poškození. Přiměřená míra hypoxie však přináší i velmi pozitivní adaptivní účinek pro celý organismus a jednotlivé tkáně. Jedná se především o chronické působení hypoxie, která vede k zefektivnění fyziologických a metabolických mechanismů v reakci na dlouhodobě snížený přísun kyslíku. U myokardu samotného, tak dochází k aktivaci různých signálních drah, které umožní zvýšenou odolnost buněk na nízkou dodávku kyslíku a zároveň snižují rozsah poškození tkáně po krátkodobé ischemii a následné reperfúzi. Dosažené poznatky dokazují, že adaptace na chronickou hypoxií vede u myokardu ke zlepšení postischemické kontraktility srdce, snižuje výskyt srdečních arytmií a celkově snižuje velikost infarktem postižené tkáně. Avšak existují také negativní fyziologické změny, které vedou k plicní hypertenzi a následně k hypertrofii pravé komory.

Hlavním regulátorem transkripce genů umožňující adaptaci buněk na hypoxií je hypoxií indukovaný transkripční faktor (HIF). Je regulován v závislosti na koncentraci kyslíku třemi prolyl hydroxylázami (PHD) a jednou asparaginylní hydroxylázou (FIH1 též HIF1AN). Více než sto cílových genů HIF zasahuje do mnoha životně důležitých oblastí buňky jakými jsou transport kyslíku a glukózy, energetický metabolismus, růstové faktory, apoptóza, homeostáza, transkripční regulátory a posttranslační modifikace, atd. HIF a jeho regulátory se tak stávají nezbytnou součástí výzkumu vlivu chronické hypoxie na myokard.

Mnohé studie poukazují na spojení hypoxie a následného oxidativního stresu s tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS) a jejich významem v buněčné signalizaci. Přebývá názor, že ischemicko-reperfúzní poškození je způsobeno převážně ROS, které vznikají především v mitochondriích a působením monoamino oxidázy A (MAO A) ve vnější membráně mitochondrií. Proto jsou v práci sledovány antioxidační systémy, jejichž ochranná aktivita se může podílet na prevenci buněk proti oxidačnímu stresu a toxickému působení ROS. Jedná se o enzymy, které přímo odbourávají ROS, enzym superoxid dismutáza (SOD), která katalyzuje odbourávání superoxidu ($O_2^{\bullet-}$) na peroxid vodíku (H_2O_2) a kyslík (O_2), a kataláza (CAT), která neutralizuje vzniklý H_2O_2 na vodu a O_2 .

Zajímavým enzymem, který svou aktivitou také ovlivňuje toxicitu buňky v závislosti na množství ROS, je akonitáza (ACO). Jednou z jejích funkcí je regulovat hladiny volného železa v buňce, jehož případná oxidace je pro buňku vysoce toxická. Druhou významnou úlohu v buňce plní v Krebsově cyklu, kde katalyzuje reakci citrátu na izocitrát. Volné radikály mohou inaktivovat akonitázu cestou oxidace železo-sírného klastru, který je pro funkci enzymu nezbytný.

Vnitrobuněčná redoxní homeostáza je udržována glutathionovým (GSH) a thioredoxinovým (TRX) systémem, které plní i antioxidační funkci v odpovědi na oxidační stres. Glutathion působí jako kofaktor několika antioxidačních enzymů (glutathion peroxidáza GPx, glutathion-S-transferáza GST), účastní se transportu přes plazmatickou membránu, podílí se na přímém odbourávání H_2O_2 pomocí GPx a v neposlední řadě regeneruje důležité neenzymatické antioxidanty (vit. C a E, aj.). Vysoké procento redukovaného stavu GSH proti oxidovanému stavu je udržováno aktivitou glutathion reduktázy (GSR). Druhým důležitým enzymatickým antioxidačním systémem, který reguluje redoxní stav buňky v mnoha různých procesech související s produkcí ROS, je thioredoxinový systém. Skládá se z thioredoxinu (TRX) a thioredoxin reduktázy (TXNRD). Oba tyto enzymy mohou katalyzovat regeneraci mnoha antioxidačních molekul včetně ubichinonu (Q10), lipoové kyseliny a askorbové kyseliny, a také působí jako redukční katalyzátory enzymatických reakcí zahrnujících glutathion, peroxiredoxiny, některé transkripční faktory a mnoho dalších substrátů. Mimo jiné také přímo ovlivňuje apoptózu inhibiční vazbou na apoptózu signálně-regulační kinázu 1 (ASK-1).

Produkce ROS v mitochondriích může být ovlivněna aktivitou mitochondriální kreatinkinázy (CK), která je lokalizována v intermembánovém prostoru a na vnější mitochondriální membráně. Produktem jejich katalytické aktivity je ADP, které může být přímo přenášeno ke komplexu dýchacího řetězce a tak stimulovat oxidativní fosforylaci.

2. Literární přehled

2.1. Hypoxie

Hypoxií myokardu rozumíme nerovnováhu mezi dodávkou kyslíku a požadavky na jeho spotřebu. Srdce je aerobní orgán, který vyžaduje stálý přísun kyslíku pro svoji životaschopnost a funkčnost. Je to však velmi flexibilní orgán schopný přizpůsobit se podmínkám sníženého zásobení kyslíkem. Při zpomaleném pulsu se může spotřeba pohybovat kolem 8-15 ml O₂/min/100g tkáně, což je podstatně více než jak je tomu například u mozku (kolem 3 ml O₂/min/100g tkáně). Avšak může také vzrůst na více než 70 ml O₂/min/100g srdeční tkáně při intenzivní zátěži (Giordano 2005). Za anaerobních podmínek není myokard schopen produkovat dostatečné množství energie k udržbě základních buněčných procesů.

Existují čtyři nejběžnější mechanismy vzniku hypoxie v myokardu. i) Ischemická hypoxie, běžně popisována jako ischemie myokardu, je indukována snížením nebo přerušením průtoku v koronárních tepnách. ii) Systémová (hypoxická) hypoxie, též srdeční hypoxie, je způsobena poklesem pO₂ v arteriální krvi při dostatečném průtoku. iii) Anemická hypoxie je pokles transportní kapacity krve pro kyslík při normálním průtoku a iv) histotoxická hypoxie, která vychází ze snížené intracelulárního využití kyslíku při dostatečné saturaci kyslíkem krve i průtoku (tj. způsobeno např. inhibicí oxidativních enzymů kyanidem...) (Ostadal & Kolar 2007).

Termín velice blízký hypoxii, avšak lišící se v metabolické podstatě je pojem ischemie. V pravém slova smyslu znamená nedostatek krve. Avšak většina odborníků dává přednost použití ve smyslu nedostatku kyslíku a substrátu vůči požadavkům tkáně, který vede k anaerobnímu metabolismu a nedostatečnosti kontraktilní funkce (Hearse 1994). Na rozdíl od ischemie, hypoxie je charakterizována sníženou dodávkou kyslíku při zachování koronárního průtoku a zásobení substráty a metabolickými produkty se nemění (Verdouw et al. 1998). Je nezbytné si uvědomit, že ischemie zahrnuje kromě nedostatečné dodávky kyslíku a substrátů též nedostatečný odvod zplodin metabolismu. To vede k poklesu pH, akumulaci produktů glykolýzy a snížení kontraktilní funkce. Na rozdíl od systémové hypoxie, kde je dostatečně odmyván veškerý substrát metabolismu (Ostadal & Kolar 2007). Následkem těchto omezení tedy dochází k ischemickému poškození tkáně. Rozsah ischemického poškození srdce závisí nejen na intenzitě a

trvání hypoxického stimulu, ale také na stupni odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku.

Dalším aspektem je ischemicko reperfúzní poškození tkáně vznikající po obnovení přísunu kyslíku ke tkáním, které je způsobeno obrovským nárůstem volných radikálů kyslíku. V dnešní době se do popředí výzkumu dostávají účinné kardioprotektivní fenomény, jakými jsou např. adaptace na chronickou hypoxii nebo tzv. preconditioning, které snižují míru tohoto poškození.

2.1.1. Chronická hypoxie

Chronická hypoxie je stav, kdy je organismus vystaven hypoxickým podmínkám dlouhodobě a je nucen se na ně adaptovat. Nejběžnějším modelem pro výzkum systémové chronické hypoxie je vysokohorské prostředí, které se dá simulovat laboratorními podmínkami v hypobarických (snížení pO_2 částečným odčerpáním vzduchu) a normobarických (řízená změna složení plynů) komorách. Adaptace v hypobarické komoře se dá považovat za přesný model výškové hypoxie, neboť nízký atmosferický tlak v komoře odpovídá určitému atmosferickému tlaku v dané nadmořské výšce (např. $pO_2 = 8,5$ kPa, 7000 m). Ukázalo se, že k rozvoji změn stačí i každodenní několikahodinové expozice (tzv. intermitentní hypoxie) (Ostadal & Kolar 2007). Tyto modely umožňují studovat prospěšné i nepříznivé adaptivní změny. Negativní dopad expozice chronické hypoxii je znám již dlouho, za nejzávažnější disfunkce lze považovat především rozvoj plicní hypertenze (zvýšený krevní tlak v plicním oběhu) a s tím spojené přetížení pravé komory a její následná hypertrofie (Kolar et al. 1989).

2.1.2. Kardioprotektivní účinek chronické hypoxie

Chronické působení hypoxie, které vede k zefektivnění fyziologických a metabolických mechanismů v reakci na dlouhodobě snížený přísun kyslíku, vyvolává řadu adaptivních změn v myokardu, které jsou ve svém důsledku považovány za protektivní při akutním infarktu myokardu. V 50. letech minulého století bylo zjištěno, že pravděpodobnost vzniku infarktu myokardu je nižší u lidí žijících dlouhodobě ve vysokých nadmořských výškách (konkrétně v Peru, 4000 mnm) (Hurtado 1960). Pozdější studie v simulovaných podmínkách na výškovou hypoxii tuto teorii potvrdily (Kopecky & Daum 1958, Poupa et al. 1966). Dalším významný zlomem ve výzkumu kardioprotektivního působení chronické hypoxie bylo poznání tzv.

preconditioningu, navozeného krátkými epizodami ischemického stresu před samotným ischemickým inzultem, který také prokázal kardioprotektivní účinky v rychlé odpovědi na střídavý hypoxický stres (Murry et al. 1986). Tyto základní poznatky výzkumu kardioprotekce vedly k rozpoutání velkého zájmu o tento jev a dodnes se po celém světě výzkumné skupiny v různých modelech zabývají touto problematikou.

V dnešní době bylo dosaženo velkého posunu ve studiu kardioprotekce a bylo prokázáno, že adaptace na chronickou hypoxii vede k třem pozitivním fyziologickým projevům: i) snížená velikost infarktu, ii) zlepšení postischemických kontraktálních funkcí myokardu, iii) snížení závažných ischemických a reperfúzních arytmí komor. Studie prováděná výzkumnou skupinou Fyziologického ústavu AV ČR na samicích potkana kmene Wistar prokázala, že dlouhodobá adaptace na vysokohorskou intermitentní hypoxii přinesla pozitivní výsledky ve zvýšené toleranci k ischemickému a reperfúznímu stimulu ve formě snížení arytmí srdce a významného snížení velikosti infarktu, které je přímouměrné intenzitě hypoxického stimulu (Neckar et al. 2002). Prokázali také, že ischemický preconditioning měl vyšší efektivitu protekce srdce, než samotná chronická hypoxie, avšak v kombinaci preconditioningu a chronické hypoxie nebylo docíleno takových pozitivních výsledků. Ve svém dalším výzkumu zjistili, že permanentní normobarická hypoxie (10 % O₂, 14-21 dní) má podobný vliv na velikost infarktu jako hypoxie intermitentní výšková (7000 m, 8 h denně, 24-32 expozic) (Neckar et al. 2003, Neckar et al. 2005). V několika případech bylo i potvrzeno zlepšení kontraktálních funkcí pravé i levé srdeční komory po ischemickém stimulu na pokusech in vitro (Zhong et al. 2002, Neckar et al. 2002). Zajímavé zjištění v úloze chronické hypoxie jako aktivátora kardioprotekce je, že tento účinek přetrvává i několik týdnů po ukončení expozice a návratu k normoxickým podmínkám (Neckar et al. 2004).

Navzdory tomu, že kardioprotektivní působení chronické hypoxie je známo již půl století, přesný molekulární mechanismus zvýšené ischemické tolerance není dosud znám. Mechanismy protekce vyvolané chronickou hypoxií jsou stále žhavým tématem výzkumu a v posledních letech se dosahuje velmi přínosných výsledků.

2.2. Oxidační stres

2.2.1. HIF a jeho regulační geny

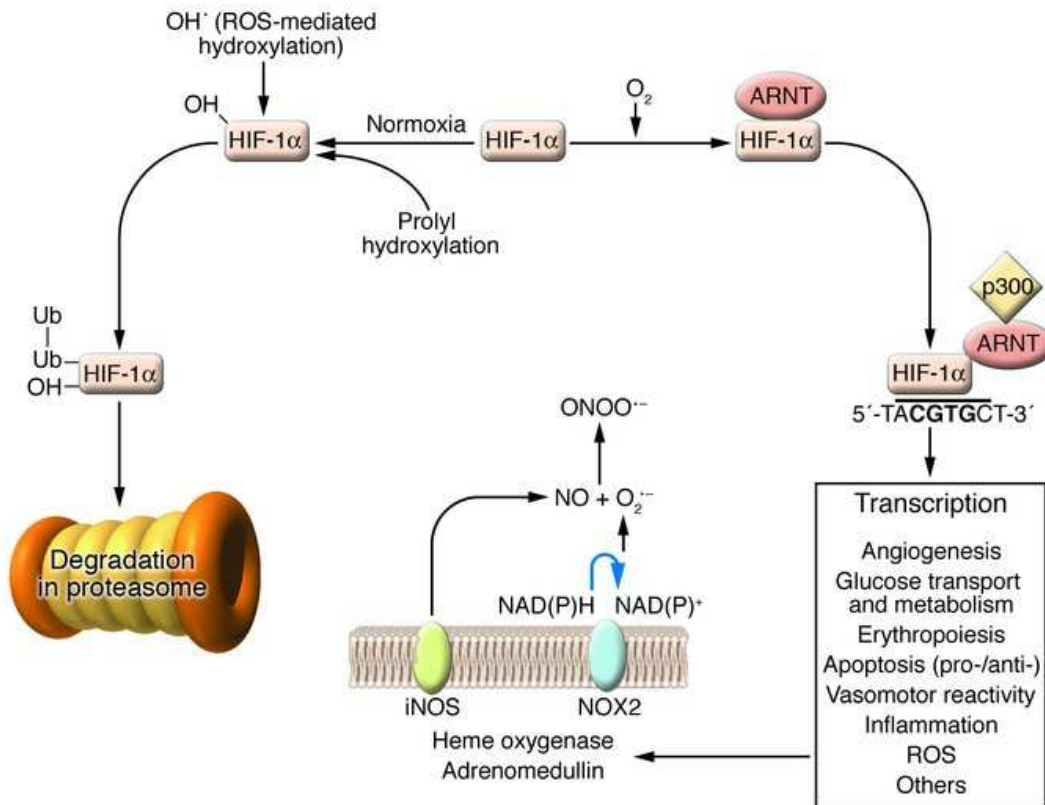
Kyslík patří mezi hlavní determinanty srdeční exprese genů a snižující se pO_2 během hypoxie nebo hypoxií navozené ischemie vede k signifikantním změnám genové exprese v myoardu. Nicméně role kyslíku a procesů s ním spojených má komplexní charakter, může srdci přinášet prospěch, ale i srdeční dysfunkci a smrt. Hladina kyslíku v krvi ovlivňuje expresi genů v srdci přes transkripční faktory citlivé na kyslík, které souvisí s tvorbou ROS a dalšími buněčnými procesy. Normální dodávka kyslíku do myokardu se pohybuje přibližně mezi 30-50 mmHg (Matschke et al. 2005). Naproti tomu nedostatek kyslíku, při hypoxii srdce, kompenzuje změnou exprese klíčových genů pro přežití (Huang et al. 2004).

Hlavním regulátorem signálních drah, které vedou k adaptaci savčího organismu na hypoxický stimulus i dlouhotrvající stres, je hypoxií indukovaný transkripční faktor HIF. U HIF proteinu jsou známy tři HIF α podjednotky (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) a tři HIF β podjednotky (HIF1 β , ARNT2, ARNT3), přičemž nejvíce prozkoumaným proteinem je HIF-1 α (Wang et al. 1995). Lokalizace jednotlivých podjednotek se liší jak v místě exprese, tak v místě proteinové aktivity (Jain et al. 1998). Obecně je známo, že HIF α se vyskytuje za normoxických podmínek především v cytoplazmě a během hypoxického stimulu se translokuje do jádra, kde tvoří dimer s přítomným HIF β . Heterodimer HIF α/β se váže na hypoxia response elements (HREs) cílových genů a tím ovlivňuje jejich transkripci (Semenza et al. 1997).

Snížený parciální tlak kyslíku a mitochondriální produkce ROS stabilizuje kyslíkem regulovanou HIF-1 α podjednotku a HIF-1 heterodimer pak může zahájit transkripci více než stovky cílových genů související se změnou metabolismu a adaptačních mechanismů v hypoxii. Cílové geny ovlivňují dodávku kyslíku tím, že působí v oblasti angiogeneze (VEGF, VEGF receptor FLT1, angiopoetin atd.), vazoaktivních faktorů (ET-1, iNOS, ADM, ANP, BNP, hemoxygenase-1(HO-1)) a metabolismu hemu (HO-1). HIF-1 ovlivňuje růstové faktory (PDGF, TGF, IGF1) i apoptózu (BNIP3, BNIP3L). Dále aktivuje transkripční regulátory (FOS, FOSL2, ETS-1, CITED2, MXI1) a posttraslační modifikace extracelulární matrix (lysyl oxidase, procollagen prolyl hydroxylase alfa podjednotky, procollagen lysyl hydroxylase 2,

tkáňový inhibitor metalloproteasy1). Cílovým genem HIF1 je též carbonanhydráza IX a inhibitor aktivátoru plasminogenu, kteří udržují homeostázu. V neposlední řadě HIF1 reguluje klíčové geny transportu glukosy a glykolytické dráhy (GLUT1, PGK1, PFK2, LDH-A, aldolázaC) a tím ovlivňuje energetický metabolismus buňky. Delece HIF-1 specifického pro myocyty významně ovlivnilo vaskularizaci srdce, snížilo hladiny ATP i PCR a ovlivnilo toky vápenatých iontů v normoxickém srdci (Huang et al. 2004). Výsledky pokusů na HIF-2 α ^{-/-} myších ukázaly mnohočetné orgánové patologie (retinopatii, srdeční hypertrofii, jaterní steatózu, myopatii kosterních svalů, ztrátu pohyblivosti spermií), biochemické abnormality (mitochondriální anomálie, hypoglykémie, laktózová acidóza, pozměněný Krebsův cyklus, snížená oxidace mastných kyselin) a změny v genové expresi. U části pokusných zvířat však tyto poruchy nebyly letální a zvířata se dožila dospělosti. Docházelo také ke snížení exprese primárních antioxidantů (katalázy, glutathion peroxidázy 1 a superoxid dismutáz (SOD)) a nárůstu reaktivních forem kyslíku (ROS), o jejichž významu v buněčné signalizaci bude pojednáno později. Podání SOD v prenatálním i postnatálním stádiu pak vedlo k eliminaci mnohých negativních důsledků HIF-2 α deficiencie a zdá se tedy, že HIF-2 α hraje důležitou roli při homeostázi ROS (Scortegagna et al. 2003).

V průběhu hypoxie dochází k rozvinutí respirační alkalózy vzhledem k hyperventilaci, stejně tak snížení tepové frekvence a tlaku krve. Zůstává nejasné, jaké změny pH mohou ovlivňovat aktivaci HIF. Zvýšená produkce kyseliny mléčné v hypoxickém prostředí a následné snížení pH ukázalo aktivaci HIF tím, že byla neutralizována schopnost von Hippel-Lindau ubiquitinovou ligázou (pVHL) degradovat HIF (Mekhail et al. 2004).



Obr. 1: Genová regulace HIF-1 α .

HIF-1 α je rychle hydroxylován za normoxických podmínek specifickými prolyl hydroxylázami (PHD). Alternativní cestou hydroxylace může údajně být ROS. Hydroxylovaný HIF reaguje s VHL, hlavním členem E3 ubiquitin ligasového komplexu. Tato ubiquitinylace směřuje HIF-1 α k destrukci v proteozomu. Během hypoxie (snížení O₂) je HIF-1 α stabilizován a dochází k heterodimerizaci s ARNT, která formuje HIF-1 α na aktivní komplex, schopný vázat se na HRE v širokém souboru genů zahrnutých v biologických procesech souvisejících s kardiovaskulárními funkcemi. Aktivace transkripce iNOS je zde ukázána jako příklad, jak HIFem zprostředovaná exprese genů může ovlivnit generaci ROS (Giordano 2005).

2.2.1.1. Strategie aktivace cílových genů HIF.

Přítomnost HIF ve všech orgánech je klíčová pro embryonální vývoj a jejich fyziologickou funkci (Cramer et al. 2003). Hypoxie vede k akumulaci kyslíkem regulované podjednotky HIF 1 α a 2 α s následnou aktivací jeho cílových genů (Rosenberger et al. 2002). Vhodné experimentální podmínky pro stabilizaci HIF α in vivo je vytvoření hypoxického prostředí do 8% obsahu kyslíku na jednu až pět hodin u potkana (Rosenberger et al. 2002) a nebo 6% kyslíku na jednu až dvanáct hodin u myši (Stroka et al. 2001). Obecně je nutné dosáhnout koncentrace kyslíku nižší než 9%

k indukci HIF 1 α funkce. HIF 1 α byl též detekován, u zvířat při expozici mírnější hypoxii 15-18% O₂ (Stroka et al. 2001). Podle zkušeností Bernhardt et al. 4-6 hodin 8% O₂ je dostatečné k akumulaci HIF 1 α (Bernhardt et al. 2007).

2.2.1.2. Regulace HIF

Fyziologickým stimulem k aktivaci systému HIF je nedostatek kyslíku, který následně redukuje aktivitu hydroxyláz, jejichž hlavním úkolem je snižovat hladinu HIF v normoxických podmínkách. HIF proteiny jsou regulovány čtyřmi hydroxylázami citlivými na kyslík, a to jednou asparaginyl hydroxylázou (FIH, též HIF1AN) a třemi PHD. Všechny tyto hydroxylázy jsou členy 2-oxoglutarát závislé dioxygenázové rodiny a katalyzují hydroxylaci HIF α . Zprostředkovávají tak změny v buněčné koncentraci kyslíku na HIF α hladiny, a to následně vede k silné akumulaci a aktivitě HIF α podjednotky v hypoxii oproti degradaci a represi během normoxie. HIF- α asparaginylová hydroxylace je katalyzována faktorem inhibujícím HIF- α , tzv. FIH1 (též HIF1AN). FIH1 hydroxyluje HIF-1 α na 'Asp-803' v C-terminální transaktivační doméně (CAD) (Lando, Peet, Whelan et al. 2002). Funguje jako kyslíkový senzor, který v normoxických podmínkách hydroxylací předchází interakci HIF-1 s transkripčními koaktivátory jako jsou Cbp/p300 (Ema et al. 1999). FIH je tak zahrnut v represi transkripce skrze interakci s HIF1A, VHL a histonovými deacetylázami (Lando, Peet, Gorman et al. 2002).

Druhou skupinou hydroxyláz regulujících hypoxií indukovaný faktor HIF v závislosti na koncentraci O₂ jsou již zmíněné PHD. Tyto, na kyslík citlivé enzymy hydroxylují za normoxických podmínek HIF 1 α a 2 α podjednotky na dvou rozdílných prolinových zbytcích. Následkem toho dochází k interakci HIF s VHL a vede k masivní proteosomální degradaci (Ivan et al. 2001). Z rodiny PHD byly charakterizovány tři hlavní hydroxylázy schopné hydroxylovat HIF, a to PHD1 (HPH3/EGLN2), PHD2 (HPH2/EGLN1) a PHD3 (HPH1/EGLN3) (Ivan et al. 2002). V nedávné studii byl popsán čtvrtý typ PHD, označované jako transmembránová doména (P4H-TM) (Koivunen et al. 2007).

Všechny tři typy PHD hydroxylují HIF 1 α na Pro-402 a Pro-564 a HIF 2 α a jako koofaktory mají 2-oxoglutarát (2-OG), Fe (II) a askorbát. Číslo u značení genu není vždy shodné s označením příslušného enzym, tj. enzym PHD1 odpovídá genu *Egln2*, gen k enzymu PHD2 se značí *Egln1* a PHD3 má označení genu *Egln3*. PHD1 a PHD3

se vyskytují v jádře a cytoplazmě a PHD2 pouze v cytosolu. Všechny PHD mohou hrát roli v regulaci buněčného růstu a PHD3 navíc hráje roli v regulaci apoptózy v neuronálních buňkách, podporuje buněčnou smrt cestou kaspázového mechanismu (Epstein et al. 2001). PHD3 je hypoxií aktivován v kardiomyocytech hypoxií, na rozdíl od zbylých dvou izoform (Cioffi et al. 2003a).

Za hypoxických podmínek jsou tyto dva senzory kyslíku inaktivovány a dochází ke stabilizaci HIF, vytvoření heterodimeru s HIF β podjednotkou, a tím vzniku transkripčního komplexu, schopného regulovat expresi velkého množství genů zahrnutých v adaptaci na hypoxii.

2.2.2. ROS

Koncem 50. let 20. století byly radikály a antioxidanty pro klinické a biologické vědy téměř neznámé, avšak chemici o nich věděli již několik let ve spojení s radiací, s polymerní a spalovací technologií (Gutteridge & Halliwell 2000). V roce 1954 Gerschman a kolektiv propojili toxické účinky zvýšené hladiny kyslíku v důsledku ionizační radiace a navrhli myšlenku, že toxické účinky kyslíku jsou následkem formace volných radikálů (Gerschman et al. 1954). Následně roku 1956 v pojetí D. Harmana byly volné radikály charakterizovány jako prvky hrajících významnou roli v procesech stárnutí, a tím zařazeny jednou pro vždy do biologických dějů (Harman 1956). Následovala celá řada výzkumných prací potvrzujících důležitost volných radikálů a mechanismů jejich odbourávání v živých systémech, kdy jedním ze stěžejních objevů v roce 1969 byl popis enzymu superoxid dismutázy (SOD) (McCord & Fridovich 1969).

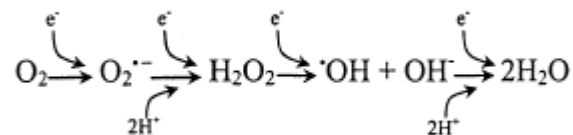
2.2.2.1. Zdroje ROS

Oxidační reakce jsou nezbytnou součástí normálního metabolismu, kde kyslík je konečným elektronovým akceptorem v systému elektronového toku oxidativní fosforylace produkující ATP (Davies 1995). Problém nastává tehdy, když se elektronový spád a energetická produkce rozpojí a začnou vznikat volné elektronové radikály neboli reaktivní kyslíkové částice již zmíněné ROS (Nohl et al. 2005).

Všechny živé organismy produkují ROS během svých fyziologických procesů a v odpovědi na externí stimuly. Přesněji ROS jsou nepřetržitě produkovány uvnitř buňky jako produkty mitochondriálního elektronového transportu nebo jako bioprodukty enzymů xantinoxidázy, lipoxygenázy a cyklogenázy (Szocs 2004). Mimoto mohou být ROS generovány jako následek intracelulárního metabolismu různých sloučenin, toxinů a léčiv přes cytochrom P450, monooxygenázy nebo při vystavení různým environmentálním faktorům, jako jsou nadměrné koncentrace solí železa nebo UV radiace (Ichihashi et al. 2003). Další zdroje ROS jsou makrofágy a neutrofilové obsahující enzymy, jako je NADPH oxidázový komplex schopný generovat superoxidové radikály a hydrogen peroxidy (Rosen et al. 1995). Dle posledních poznatků, je za vysokou formaci ROS v kardiomyocytech zodpovědná mitochondrie a její dýchací řetězec, který je často označován jako hlavní zdroj generace ROS. Velká

většina kyslíku doručeného do mitochondrií, je redukována na vodu v komplexu IV. Avšak elektrony procházející jednotlivými částmi respiračního řetězce mohou být kyslíku dodány na různých místech, a v těchto případech redukce není kompletní. Výsledkem je vznik částečně redukovaných forem, speciálně superoxidového aniontu ($O_2^{\bullet-}$). Superoxidový radikál vzniká především v I. a III. komplexu respiračního řetězce a za normálních podmínek je okamžitě odbouráván na peroxid vodíku (H_2O_2) enzymem SOD (Murphy 2009). Nejnovější poznatky ukazují, že významným producentem ROS v srdci je enzym monoamin oxidáza A působící ve vnější mitochondriální membráně (Di Lisa et al. 2009).

Jak bylo řečeno kyslík je redukován na vodu. Aby byla redukce kyslíku na vodu kompletní, je zapotřebí 4 elektronů. Tento proces nastává následně, když O_2 přijme jeden elektron. Z toho plyne, že O_2 redukce nevyhnutelně naznačuje formaci z části redukovaných meziproductů. Přidáním prvního elektronu vzniká superoxidový anion ($O_2^{\bullet-}$) a následně přidáním jednoho elektronu se z něj stává H_2O_2 . Dále redukce následujícího elektronu vede ke vzniku hydroxylového radikálu ($\bullet OH$) a ten akceptováním dalšího elektronu vytváří H_2O (Pryor et al. 2006), jak ukazuje následující rovnice (Nordberg & Arnér 2001) :



2.2.2.2. Funkce ROS v buňce

ROS jsou známy, jako sloučeniny hrající v buňce dvojí roli, benefiční a toxickou. Nadprodukce ROS (vznikající buď v mitochondriálním dýchacím řetězci nebo nadměrnou stimulací NADP(H)) vede k oxidativnímu stresu, škodlivému procesu, který může být důležitým mediátorem poškození buněčných struktur, zahrnující lipidy a membrány, proteiny a DNA (Valko et al. 2007), následně ztrátě buněčných funkcí a nakonec k apoptóze nebo nekróze. ROS mohou vést k akutnímu nekrotickému poškození. H_2O_2 indukuje apoptózu v několika odlišných lidských tumorových liniích (Lennon et al. 1991). Radikály produkované během apoptózy přímo ovlivňují signální kaskády aktivací nebo inhibicí významných transkripčních faktorů (např. NF- κ B, AP-1,

aj.) nebo nepřímo ovlivněním signalizace změnou redoxního stavu v buňce (glutathione (GSH) a thioredoxin (Trx)). Vysoké množství volných radikálů, zahrnujících reaktivní formy kyslíku a mnoho dalších nežádoucích škodlivých bioproduktů z reakcí s tkáňovými makromolekulami, přesněji lipidy, může způsobit akutní poškození, pokud není dostatečně funkční antioxidační ochrana. Tento antioxidační systém se aktivuje nejen v případech prevence stresu, ale i v údržbě funkčnosti specifických transkripčních faktorů (Kern & Kehrer 2005).

2.2.2.3. Odbourávání ROS v buňce

Hladina ROS a následné toxicity jsou výsledkem jejich buněčné koncentrace a účinnosti ochranných systémů, které zahrnují preventivní a reparační mechanismy, fyzickou a antioxidační obranu. Nejvíce účinnou strategií je odstraňování ROS, která je enzymaticky katalyzována SOD a peroxidázami (Leopold Flohé & Fulvio Ursini 2008, Fridovich 1995). Skrze reakci SOD je O_2 transformován na H_2O_2 , který je potom redukován na vodu peroxidázami včetně katalázy a glutathion peroxidázy. Redukce oxidovaných molekul může být též katalyzována thioredoxinem a peroxyredoxinem (Zhao et al. 2009).

Systém enzymatické ochrany je paralelní s neenzymatickými antioxidačními mechanismy jako jsou vitaminy A, E a C, ubiquinone, urate, lipoová kyselina a glutation, flavonoidy a jiné (Giordano 2005). Enzymatické antioxidanty zahrnují SOD, CAT, GPx. Za normálních podmínek jsou tyto mechanismy v rovnováze a napomáhají přežívání organismu (Valko et al. 2007).

Na druhou stranu, existuje benefiční funkce ROS nastává při přiměřeně nízkých, koncentracích a zahrnuje fyziologické procesy v buněčné odpovědi na poškozující agens, jako je například obrana proti infekčním činitelům, funkce v mnoha buněčných signálních drahách a indukce mitogenetické odpovědi. Je až ironií jak mnoho ROS-mediátorových reakcí ve skutečnosti chrání buňku proti ROS-indukovaným oxidativním stresem a znovu obnovují a udržují redoxní rovnováhu, tedy, redoxní homeostázu. Například během růstu, ROS uvnitř buněk hrají roli druhého přenašeče v nitrobuněčných kaskádách, které indukují a udržují onkogenetický fenotyp rakovinových buněk, ale mohou také indukovat buněčné stárnutí a apoptózu a mohou proto fungovat jako anti-tumorové prvky (Valko et al. 2007).

Rovnováha mezi oxidativními a antioxidantními intracelulárními systémy je proto životně důležitá pro buněčné funkce, regulace a adaptace na různé vzrůstající podmínky.

Ze zpracovaných poznatků vyplývá, že reaktivní formy kyslíku resp. oxidativní stres hrají hlavní roli v iniciaci a progresy kardiovaskulární dysfunkcí spojených s onemocněními jako jsou hyperlipidémie, diabetes mellitus, hypertenze, ischemická onemocnění srdce a chronické srdeční selhání. ROS produkované migrujícími zánětlivými buňkami stejně jako srdečními buňkami (endoteliální buňky, srdeční hladké svalové buňky, adventitia fibroblasts) mají jasný funkční efekt na jednotlivé typy buněk. To se odráží v buněčném růstu, apoptóze, migraci, expresi prozánětlivých genů a regulaci matrix. ROS regulací vaskulárních buněčných funkcí může hrát centrální roli v normální vaskulární fyziologii a může podstatně přispívat k vývoji srdečních onemocnění (Taniyama & Griendling 2003).

2.2.3. Oxidační a antioxidační enzymy

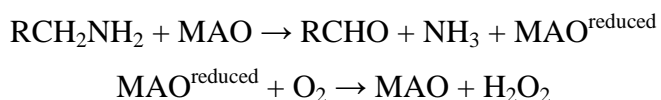
Kyslík patří mezi fyziologické molekuly, které mohou být při relativně vyšší koncentraci toxické. Jeho metabolismus je řízen specifickými antioxidačními a oxidačními systémy a provázen produkcí ROS, které jsou v malém množství prospěšné a mohou hrát důležitou roli v buněčných regulačních funkcích. Avšak za určitých okolností, které nejsou zatím zcela definovány, dochází k deregulaci jejich koncentrace a nárůstu jejich aktivity, která vede k okamžité reakci s biologickými molekulami a vytvářejí další více či méně reaktivní deriváty.

2.2.3.1. Monoamin oxidáza A (MAO A)

Tento enzym je kódován na chromozomu 10 *Mao a* (Grimsby et al. 1991). MAO A je monomer s kovalentně navázaným kofaktorem FAD (Edmondson et al. 2004) a integruje do buněčných membrán, především do vnější mitochondriální membrány. Nejvíce se vyskytuje v srdci, játrech, plicích, štítné žláze, ledvinách a cévách (Son et al. 2008). Její hlavní funkcí je katalýza oxidace (degradace) aminů neurotransmiterů jako je dopamin, serotonin, adrenalin. Při této reakci kyslík přesouvá aminovou skupinu z původní molekuly monoaminu a vzniká aldehyd a amoniak. Existuje také druhá izoforma tohoto enzymu, MAO B. Obě izoformy se od sebe liší

substrátovou specifitou a inhibiční citlivostí (Edmondson et al. 2004). Jakákoli inhibice obou izoformem nebo naopak vzrůst jejich aktivity může způsobit nebo přispět k různým neurologickým defektům např. Alzheimerova, Huntingtonova či Parkinsonova choroba, deprese, poruchy osobnosti, aj.), ale i kardiovaskulárním poruchám (Di Lisa et al. 2009). Mutace genu *Mao a*, která způsobí defekt tohoto enzymu je spojována s mentálními poruchami, tzv. Brunner syndrome (Brunner et al. 1993).

Jak již bylo řečeno, MAO A se vyskytuje především ve vnější mitochondriální membráně, kde podle nejnovějších poznatků produkuje spolu s p66^{shc} velká množství ROS, konkrétně H₂O₂. Navázání aminové skupiny k enzymu předchází navázání kyslíku k danému enzymu. Z toho vychází katalytická činnost MAO A, kdy v prvním kroku se redukcí navázaného kofaktoru FAD získává aldehyd a amoniak spolu s redukovaným MAO A. V druhém kroku pak dochází k opětovné oxidaci MAO A s doprovodnou produkcí hydrogen peroxidu (H₂O₂).



(Di Lisa et al. 2009)

Vzniklý aldehyd je okamžitě metabolizován na odpovídající kyselinu pomocí aldehyd dehydrogenázy. Porucha tohoto systému může vést ke zvýšenému množství aldehydových prvků a jejich hromadění.

Bylo prokázáno, že MAO A hraje důležitou roli v srdečním poškození během postischemické reperfuze. Za normálních podmínek v myocytech jsou ROS produkované enzymem MAO odbourávány antioxidantními systémy. Avšak působením patologických stimulů, kterými může být postischemická reperfuze, dojde ke spuštění signálních drah, při kterých dochází k uvolnění katecholaminů z endogenních zásobáren. Ty jsou tak schopny významně přispívat ke katabolické činnosti MAO A. Následkem tohoto nedochází k růstu hladiny ROS v mitochondriích natolik, že jejich produkce převáží nad obrannými antioxidantními systémy a to následně vede ke kontraktilem disfunkcím, otvírání propustných tranzitních pórů, buněčné smrti a srdečnímu selhání (Di Lisa et al. 2009).

2.2.3.2. Kataláza (CAT)

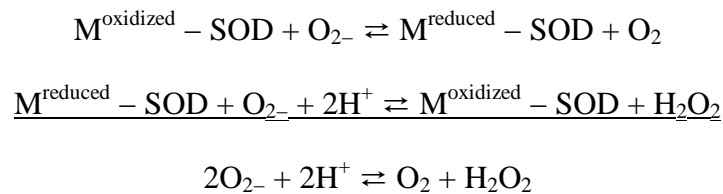
Enzym kataláza je kódován genem *Cat*, nachází se na 11 chromosomu. Struktura proteinu představuje tetramer skládající se ze 4 polypeptidových řetězců a 4 hemových skupin (Quan et al. 1986). Z buněčných kompartmentů se enzym vyskytuje hlavně v membráně peroxizomu všech buněk vystavených kyslíku, kde představuje klíčový enzym chránící buňku před oxidativním stresem (Chelikani et al. 2003). Databáze EntrezGene uvádí přítomnost mRNA v dalších buněčných kompartmentech - v mitochondriích, lysosomech, Golgiho komplexu, endoplazmatickém retikulu, plazmatické membráně a cytosolu. Kataláza se nachází v buňkách téměř všech orgánů s přísunem kyslíku. Ve zvýšené koncentraci proti ostatním tkáním pak v kostní dřeni, srdci, játrech, plicích a kůži. Hlavní funkcí tohoto enzymu je katalýza reakce přeměny peroxidu vodíku na vodu a kyslík, a tím zmírňuje jeho toxické účinky v buňce (Chelikani et al. 2003). Dalšími funkcemi s touto reakcí spojenými jsou například UV protekce v epitelu pokožky (Rezvani et al. 2007), vazba NADP a NADPH, negativní regulace apoptosy (Putnam et al. 2000), atd.

2.2.3.3. Superoxid dismutáza (SOD)

Izoformy SOD tvoří všudypřítomnou rodinu antioxidantních enzymů primárně působících jako katalyzátory při odbourávání kyslíkových radikálů v buňce (Zelko et al. 2002). Podle charakteru navázaného kofaktoru byly rozlišeny tři typy SOD. Pokud je jako kofaktor navázána měď, jedná se o intracelulární dimer, označovaný jako CuZn-SOD (SOD1) a nacházející se v cytoplazmě, jaderných kompartmentech a lysosomech (Crapo et al. 1992). Jako SOD2 je označován enzym vytvářející tetrametr, který je lokalizován v mitochondriích a vázající mangan v katalytickém centru (Barra et al. 1984). Poslední známá SOD je extracelulární nedávno popsáný tetramer vázající také měď a zinek a označován jako Ec-SOD (SOD3) (Culotta et al. 2006).

Jak již bylo uvedeno, rodina těchto enzymů působí jako jedna z hlavních antioxidantních složek pro buňku. Chrání citlivý redukční systém buňky před poškozením tím, že „neutralizují“ nepřiměřené množství superoxidových aniontů na kyslík a peroxid vodíku. Právě metalové klastry, navázané v aktivním centru enzymu, katalyzují v prvním kroku oxidaci jednoho elektronu a v druhém kroku redukci druhého elektronu superoxidového aniontu a tím uzavírají proces jeho odbourání na výsledný H_2O_2 a O_2 .

Všechny izoformy SOD vyžadují přechod redoxního aktivního kovu do aktivního místa pro uskutečnění katalytického odbourání kyslíkových radikálů. Metaloenzymatická reakce odbourání kyslíkových radikálů je vyjádřena následující řadou reakcí :



(Culotta et al. 2006)

2.2.3.4. Akonitáza (ACO)

Zajímavým enzymem, který svou aktivitou také ovlivňuje toxicitu buňky v závislosti na množství ROS, je akonitáza (ACO).

Je to enzym, který se v savčích buňkách vyskytuje ve dvou izoformách. ACO1 se vyskytuje převážně v cytosolu a cytoplazmě a je kódován genem *Aco1* na chromosomu 9. Druhá izoforma ACO2 se nachází mitochondriální matrix a je kódována genem *Aco2* na 22 chromosomu (Mirel et al. 1998). Oba typy mají společné rysy. Obsahují navázaný kofaktor $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$, účastní se metabolických procesů Krebsova cyklu, váží ionty železa, aj. Avšak liší se od sebe nejen intracelulární lokalizací, ale i mírou funkce ve dvou různých metabolických procesech.

Izoforma ACO1 je též nazývána jako “iron-regulatory protein 1” (IRP1) nebo “iron-regulatory element binding protein 1” (IREB1). Její hlavní funkcí je schopnost vázat se na mRNA přes “iron-responsive elements” (IREs), který se nachází na 5' UTR (5' nepřekládaná oblast) mRNA pro ferritin a 3' UTR (3' nepřekládaná oblast) mRNA pro transferinový receptor a tím regulovat translaci ferritinu a transferinového receptoru, tak že v nízké koncentraci Fe^{3+} se nachází v optimální konformaci pro vazbu na IREs s výsledkem represe translace mRNA pro ferritin a inhibice degradace mRNA pro transferrinový receptor, který je jinak odbouráván velmi rychle. Takto udržuje ACO1 buněčnou homeostázu iontů železa (Dupuy et al. 2006, Wang et al. 2007).

Hlavní funkce ACO2 je katalytická, kdy v Krebsově cyklu převádí citrát na isocitrát. Obsahuje v aktivním místě pyramidový $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ klastr se třemi atomy železa navázanými na cysteinových zbytcích, anorganický siřný atom a čtyři nestabilní atomy železa (Fe- α). Tento Fe- α se liší tím, že není vázaný na proteinový cystein, ale na hydroxylovou skupinu substrátu a vody (Beinert et al. 1996). Nestabilní Fe- α se uvolní

velmi rychle po oxidaci $[4Fe4S]^{2+}$ klastru v blízkosti superoxidu a o něco pomaleji v přítomnosti peroxinitritu a $\bullet NO$ (Flint et al. 1993), a to inaktivuje enzym. Bylo tak prokázáno, že tato železo-sírná větev je vysoce citlivá na zvýšenou hladinu kyslíkových radikálů (O_2^-) v mitochondriích (Gardner & Fridovich 1992).

2.2.3.4. ROS a mechanismy udržení redoxní homeostázy

Volné radikály a reaktivní diamagnetické látky odvozené od radikálů operují v nízkých, ale přesto v měřitelných koncentracích. Jejich koncentrace je závislá na rovnováze systémů zajišťujících jejich produkci a odbourávání. Každá buňka je charakterizována specifickou koncentrací elektronů (neboli redoxním stavem) produkovaných v mnoha buněčných kompartmentech. Je zřejmé, že redoxní stav buňky a jeho oscilace determinují v určitém směru funkční vlastnosti buněčného prostředí (Schafer & Buettner 2001). V posledních letech není redoxní stav popisován pouze jako poměr redoxních páru jako jsou GSSG/GSH, $Asc^{\bullet-} / AscH^-$, aj. ale je již chápán v mnohem obecnějším kontextu celkového redox stavu buněčného prostředí. Redoxní stav buňky je udržován ve velmi úzkém rozmezí blízko normálních hodnot, podobně jako je udržováno stálé pH buňky v biologických systémech. V patologických stavech může docházet k výkyvům na obě strany. Výkyv o 30 mV znamená v redoxním stavu 10-ti násobnou změnu v poměru mezi redukčními a oxidačními elementy (Schafer & Buettner 2001).

Vnitrobuněčná redoxní homeostáza a redoxní odbourávání je podloženo primárně aktivitou glutathion (GSH) a thioredoxin (TRX). Glutathion (2GSH/GSSG) je prezentován jako hlavní buněčný redoxní tlumič, a proto je považován za reprezentativního indikátora redoxního prostředí buňky (Dröge 2002, Schafer & Buettner 2001). Při zvýšeném oxidativním stresu, množství GSSG roste, což způsobuje obratem nárůst smíšených disulfidů. Signifikantní počet proteinů zahrnutých v signalizaci, mající kritické thiolové skupiny, jako receptory, protein kinázy a některé transkripční faktory, mohou být pozměněny ve svých funkcích formací se smíšenými disulfidy. Z toho pohledu se zdá být GSSG jako nespecifická signální molekula. Vysoké procento redukovaného stavu GSH a TRX proti oxidovanému stavu je udržováno aktivitou glutathion reductázy (GSR) a thioredoxin reductázy (TXNRD). Oba tyto thiolové systémy působící jako „redox pufr“ mají ochranný efekt v případě rostoucího oxidativního stresu v intracelulárním prostoru. TRX a GSH jsou spolu s antioxidantními

funkcí v buňce též zahrnutý v buněčné signalizaci (Dröge 2002, Thannickal & Fanburg 2000).

2.2.3.4.1. Glutathionový systém

Glutathion je hlavní thiolový antioxidant a redoxní tlumič nacházející se v cytosolu (1-11 mM), jádře (3-15 mM) a v mitochondriích (5-11 mM). Terciární struktura vytváří tripeptid (Masella et al. 2005) a v buňce se nachází buď v redukovaném stavu (GSH) a nebo v oxidované formě jako glutathion disulfid (GSSG). Glutathion je syntetizován v cytosolu sekvenční činností glutamát-cysteinové ligázy a glutathion syntetázy kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu. Přítomnost v mitochondrii vyžaduje membránový transport pomocí dvou mitochondriálních elektroneutrálních antiportních přenašečů, které mají kapacitu pro transport GSH do mitochondrie. Jedná se o dikarboxylát přenašečový protein a 2-oxoglutarát přenašečový protein. Bylo prokázáno, že přísadek externího GSH je okamžitě transportován do mitochondrií až do 8mM GSH koncentrace v mitochondriální matrix (Shen et al. 2005).

Intranukleární GSH udržuje redoxní stav rozhodujících protein sulfhydrylů nezbytných pro obnovu a expresi DNA. Oxidovaná forma glutathionu se akumuluje v buňce a poměr GSH/GSSG je dobrým měřítkem oxidativního stresu. Vysoká hladina GSSG může oxidací zničit funkci mnoha buněčných enzymů (Nogueira et al. 2004, Jones et al. 2000).

Existuje několik cest, kterými glutathion plní svou antioxidantní úlohu v obraně proti oxidačnímu stresu. i) Může sloužit jako kofaktor detoxikačních enzymů (např. glutathion peroxidázy (GPx), glutathion transferázy (GST), aj.). ii) účastní se aminokyselinového transportu přes plazmatickou membránu. iii) GSH se podílí na přímém odbourávání hydroxylových radikálů a singletového kyslíku; detoxikuje peroxid vodíku a lipidové peroxidy katalytickou činností glutathion peroxidázy. iv) GSH je schopný regenerovat důležité antioxidanty jako například vitamín C a E zpět do jejich aktivní redukované formy. Redukuje tokoferolový radikál vitamínu E buď přímo nebo nepřímo cestou redukce semidehydroaskorbátu na askorbát. Regenerační kapacita glutathionu je úzce spojena s redoxním stavem páru glutathion disulfidu a dvojitého glutathionu (GSSG/2GSH) (Pastore et al. 2003).

Buněčný cyklus je charakterizován kolísáním redoxního stavu buňky zprostředkovaným především změnami intracelulární koncentrace glutathionu

(Kern & Kehrer 2005). Glutathion hraje významnou roli v ochraně buňky před apoptózou. Úbytek GSH, činící vnitřní prostředí buňky více oxidované, byl zaznamenán jako průvodní je v počátku apoptózy. Obecně, více redukované vnitřní prostředí (udržované zvýšeným množstvím GSH a TRX) buňky stimuluje proliferaci a nepatrný posun k mírně oxidovanému prostředí směřuje k buněčné diferenciaci. Další posun k více oxidovanému prostředí buňky vede k apoptóze a nekróze. Apoptóza je indukována mírnými oxidačními stimuly a nekróza je indukována intenzivními oxidativními efekty (Voehringer et al. 2000). Je tedy patrné, že redoxní prostředí je kritický determinant spouštění apoptózy. Dosavadní studie indikují, že mechanismy, kterými GSH, TRX a Ref 1 udržují intracelulární redoxní útlum, mohou být příhodně použity ve výzkumu směřujícím k protekci proti karcinomu a terapeutických léčiv (Evens 2004).

Glutathion peroxidázy (GPx), významné antioxidační enzymy hojně rozšířené v savčích buňkách, kde existují čtyři izoformy (GPx1-GPx4) obsahující selenocystein (Ursini et al. 1995). GPx1 a GPx4 (fosfolipidové peroxidázy) jsou cytosolické formy hojně ve všech tkáních (Mates et al. 1999, de Haan et al. 1998). GPx1 chrání hemoglobin v erytrocytech před oxidativním poškozením. Dále GPx2 (tzv. gastrointestinální GPx) chrání savce před toxicitou organických peroxidů, vznikajících při zažívání, například hydroperoxidové linoleové kyseliny, avšak nikoliv fosfotidyl cholinu. GPx3 (tzv. extracelulární nebo plasmatická GPx) chrání buňky a enzymy před oxidativním poškozením a jsou výhradně exprimovány v gastrointestinálním traktu a v ledvinách. Je zajímavé, že GPx3 může být katalyticky regenerována thio-redoxinovým systémem a TRX-R se zdá mít velice podobný expresní vzorec v ledvinách jako má GPx3 (Rundlöf et al. 2000). GPx4 byl shledán jako zajímavý enzym nutný pro normální rozvoj samčí fertility s trojí funkcí ve spermatických buňkách v průběhu zrání i zralosti, též má svoji roli v ochraně proti peroxidům lipidů vznikajících v zažívacím traktu a chrání buňky před apoptózou (Ursini et al. 1999).

Všechny glutathion peroxidázy mohou katalyzovat redukci peroxidu vodíku s použitím glutathionu jako substrátu. Mohou také redukovat jiné peroxidázy (např. lipidové peroxidázy v buněčných membránách) na alkoholy.



Katalytický mechanismus redukce hydroperoxidu pomocí GPx zahrnuje oxidaci aktivního místa selenolátu (Se^-) na kyselinu selenovou (SeOH). Na základě přidání jedné molekuly GSH, je kyselina selenová transformována na adiční sloučeninu selenylsulfid s glutathionem (Se-SG), který může být regenerován na aktivní selenolát a glutathion disulfid (GSSG) přidáním druhé molekuly GSH. V této reakci jsou dvě molekuly GSH oxidovány na GSSG, který může být následně redukován glutathion reductázou (GSR), který je hlavním savčím reduktantem GSSG.

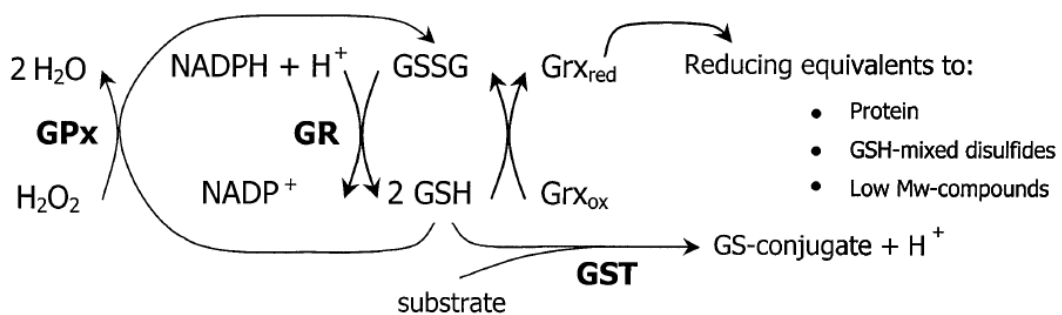
GSR je homodimerický flavoprotein s navázaným FAD kofaktorem a je členem disulfidové oxidoreduktázové rodiny (Savvides & Karplus 1996). Redukuje GSSG na redukovanou formu GSH za pomoci NADPH. Z každého GSSG a NADPH vzniknou dvě molekuly redukovaného GSH, který může dále plnit svou antioxidační funkci odbouráváním ROS v buňce (Krohne-Ehrich et al. 1977). Aktivita GSR je užívána jako indikátor oxidativního stresu.

Vedle udržování redukovaného cytosolického prostředí, GSH také napomáhá elektrofilnímu odbourávání přes glutathion S-transferázu (GST), která zprostředkovává konjugační reakce a následně eliminace konjugátu exportními pumpami přes žluč a ledviny (Keppler 1999). GST patří mezi hlavní detoxikační enzymy buňky. Katalyzuje konjugaci mnoha hydrofóbních a elektrofilních komponent s GSH (Hayes & Pulford 1995). Všechny eukaryotické buňky obsahují tuto cytosolickou a membránově vázanou super rodinu izoenzymů, kdy jednotliví zástupci plní rozmanité katalytické funkce i nekatalytické vazebné vlastnosti. Cytosolické enzymy jsou kódovány nejméně pěti vzdáleně příbuznými genovými rodinami (označené jako třída alfa, mu, pi, sigma nebo theta GST) (Wilce & Parker 1994), na rozdíl od membránově vázaných enzymů, tj. mikrosomální GST a leukotrien C4 syntáza, které jsou kódovány jednotlivými geny a oba geny jsou jednotlivě odvozeny od cytosolických *Gst* (Sheehan et al. 2001). Je očividné, že velikost exprese GST je klíčový faktor určující citlivost buňek na široké spektrum toxicých látek (Douglas 1987).

Mnoho studií ukazuje, že GSH je rychle exportován z buněk, u kterých byla vyvolána apoptóza. Proto tedy snížení GSH, jak je vidět u elektrofilního poškození, může způsobit toxické interakce s dalšími důležitými a méně početnými entitami v buňce. Doplnění buněk GSH nezabrání apoptóze, velmi pravděpodobně vzhledem k rapidnímu exportu GSH z buňky, což je podloženo zjištěním, že snížení procesu exportu snižuje apoptózu (Ghibelli et al. 1998). Z druhé strany, antioxidanty mohou poskytovat protekci proti apoptóze zpomalením oxidativních procesů vedoucích k

absenci adekvátního GSH (Slater et al. 1995). Podobně vzrůst množství oxidovaných lipidů, což může doprovázet ztrátu GSH, může spustit apoptotický aparát jako odpověď buňky na poruchu, která nastala. Podobně jako je jeho nezaměnitelná funkce kofaktoru pro glutathion peroxidázu, je GSH zahrnut v redukcí lipidových hydroperoxidáz (které indukují apoptózu) na alkoholy (neindukující apoptózu). Tento fakt naznačuje, že ztráta GSH může ulehčit, ale ne způsobit, nástup apoptózy.

Další skupina proteinů blíže příbuzná GSH jsou glutaredoxiny (Grx) s funkcemi překrývajícími thioredoxiny. Hlavní kvalitativní rozdíl mezi Grx a TRX je, že Grx mohou být redukovány GSH a jsou schopny redukovat GSH smíšené protein disulfidy formovány při oxidativním stresu, což může hrát důležitou roli v celkové buněčné antioxidační obraně (Holmgren 2000).



Obr. 2 : Glutathionový asociovaný antioxidační systém

Peroxid vodíku je redukován GPx oxidací dvou molekul GSH za vzniku GSSG, který může být následně redukován GSR za spotřeby NADPH. GSH také redukuje Grx, které tak mohou redukovat mnoho substrátů. Specifická vlastnost Grx je, že mohou redukovat GSH smíšené protein disulfidy jako jsou glutathionylátové proteiny. GST katalyzuje konjugaci GSH s jinými molekulami, a tím funguje jako intermediální krok v detoxikaci rozmanitých toxických substancí (Nordberg & Arnér 2001).

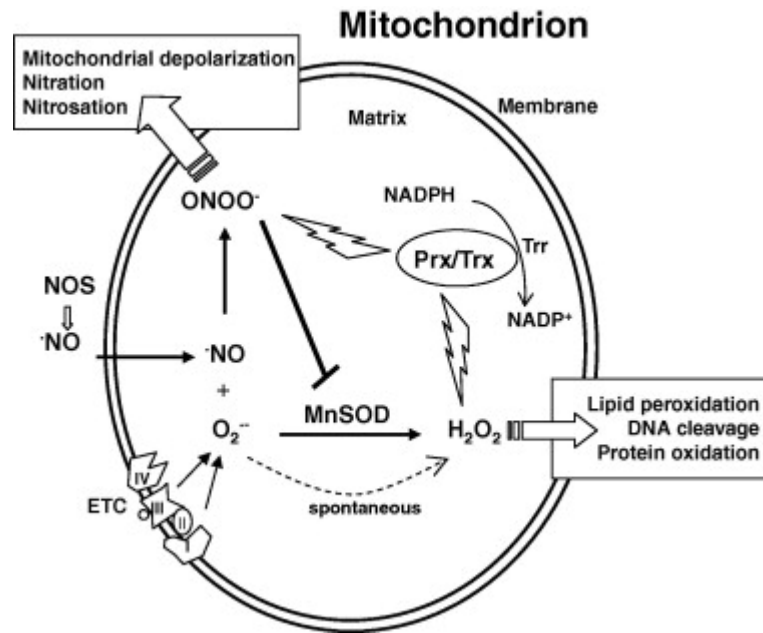
Závěrem lze říci, že, vyčerpání GSH může způsobit apoptózu, což je pozorováno u mnoha xenobiotik, ale samostatně se zdá být nedostačující k indukci masivní apoptózy pokud rozsáhla spotřeba není udržována po dlouhé časové periody. Avšak typická vysoká koncentrace GSH v buňkách jasně demonstruje jeho velmi důležitou roli v mnoha buněčných procesech.

2.2.3.4.2. Thioredoxinový systém

Thioredoxinový systém se skládá z thioredoxin reductázy (TXNRD) ve spojení s thioredoxinem (TRX) a tvoří tak všudypřítomný oxidoreduktivní systém s antioxidační a redukčně regulační rolí v savčích i prokaryotických buňkách .

Thioredoxiny jsou 12kD proteiny s dvěma redoxně aktivními cysteiny, které katalyzují redukcí disulfidových můstků v mnoha proteinech (Holmgren 1985). TRX je redukován z NADPH skrze flavoenzym thioredoxin reductázu (TXNRD) a společně tvoří thioredoxinový systém (Holmgren & Björnstedt 1995). TRX jsou kódovány několika geny (*Txn*). Nejznámější je gen *Txn1* kódující cytosolickou izoformu. *Txn2* je genem pro mitochondriální izoformu, která v cytosolu obsahuje N-terminální mitochondriální 60 aminokyselin dlouhou signální sekvenci (Spyrou et al. 1997), a ta je po vstupu do intermembránového prostoru odštěpena, čímž hraje důležitou roli v mitochondriálním membránovém potenciálu a protekci proti oxidanty indukované apoptóze (Damdimopoulos et al. 2002). TXN 3 také SpTRX (sperm-specific TRX) je exprimován výhradně ve spermatozoidech a je to první tkáňově specifický protein z této rodiny enzymů (Vizuite et al. 2001).

Všechny TRX izoformy mají zachované -Cys-Gly-Pro-Cys- aktivní místo podstatné pro jeho hlavní funkci protein disulfid oxidoreduktázy (Holmgren 1985). U savců mají extracelulární formy TRX cytokininový efekt. TRX je specifický elektronový donor pro mnoho peroxiredoxinů, velice důležitých pro redukcí peroxidů (Chae et al. 1999), tyto peroxiredoxiny se proto též nazývají thioredoxin peroxidasy.



Obr. 3. Model mechanismu protekce peroxiredoxin/thioredoxinového systému proti ROS a NOS v mitochondrii.

Komplex I a III v dýchacím řetězci mitochondrie jsou hlavními zdroji superoxidu ($O_2^{\bullet-}$), který je enzymem Mn-SOD spontánně dismutován na H_2O_2 . Oxid dusný (NO) generovaný z cytosolické syntázy oxidu dusného (NOS) může difundovat do mitochondriálního matrix a reagovat s $O_2^{\bullet-}$ za vzniku peroxinitritu ($ONOO^-$), který inaktivuje Mn-SOD a tím zvýší generaci ROS. Mitochondriální peroxiredoxin (PRX) spolu s redukováným ekvivalentem (NADPH) poskytovaným thioredoxinem, eliminují jak $ONOO^-$ tak hydroperoxydy (Pedrajas et al. 2010).

Dále také redukováný TRX redukuje disulfid v proteinech a peptidech jako je např. glutathion disulfidech (GSSG) (Nordberg & Arnér 2001). Tím zajišťuje jednu z cest regenerace důležitého antioxidantního systému. Mimoto redukce TRX předchází apoptóze cestou inhibičního navázání apoptózové signálně-regulační kinázy 1 (ASK-1), přičemž toto navázání je ztraceno, pokud je TRX oxidován (Saitoh et al. 1998). Exprese TRX je aktivována oxidačním stresem, což může vyvolat skrze něho odpověď jiných antioxidantních faktorů (Taniguchi et al. 1996).

Databáze Gene card uvádí, že bylo identifikováno mnoho substrátů thioredoxinu zahrnujících ribonukleázy, choriogonadotropiny, koagulační faktory, glukokortikoidní receptor a insulin. Mezi substráty TRX patří i některé transkripční faktory zahrnující p53, NF- κ B a AP-1. AP-1 je aktivační protein 1 regulující expresi genů v odpovědi na mnohým stimuly zahrnující cytokininy, růstový faktor, stres, bakteriální a virální

infekce. Jeho aktivita ovlivňuje procesy kterými jsou diferenciace, proliferace a apoptóza (Ameyar et al. 2003).

AP-1 upreguluje transkripci genů vázajících TPA DNA response element a váže se na DNA sekvenci skrze základní aminokyselinový regionu, po konformační změně, kdy se vytvoří dimerická struktura cestou „leucin zipper“. Regulace AP-1 navázáním na DNA je dále mediátorován endonukleázou Ref-1. Ref-1 zvyšuje AP-1 DNA navázání spolu s redukováním TRX (Hirota et al. 1997).

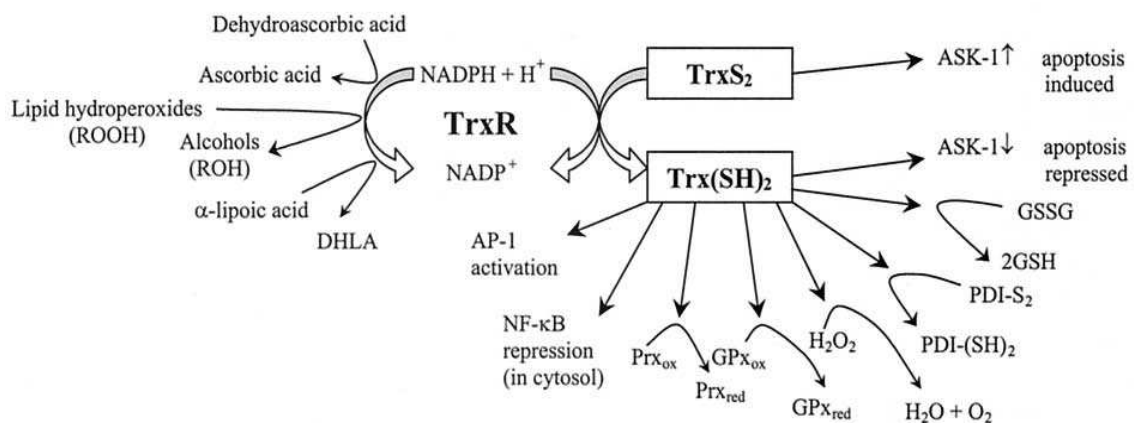
Dalším cílovým faktorem je NF- κ B (NF-kappaB), proteinový komplex, který je transkripčním regulátorem aktivovaným mnoha extra a intracelulárními podněty, jako jsou cytokiny, ROS, UV, bakteriální a virální produkty, podobně jako AP-1. Aktivovaný NF- κ B se translokuje z cytoplazmy do jádra a stimuluje exprese genů různých fyziologických funkcí, jakými jsou zánětlivé reakce, růstová kontrola, apoptóza a jako jediný transkripční faktor eukaryotických buněk přímo odpovídá na oxidativní stres v určitých typech buněk (Schreck et al. 1991). Aktivace NF- κ B je přímo inhibována redukováním TRX v cytosolu a jinými antioxidanty (Galter et al. 1994).

Druhým podstatným členem thioredoxinového systému je thioredoxin reduktáza (TXNRD). TXNRD vyšších eukaryot je 112±130 kDa homodimerní seleno-dependentní flavoprotein se širokou substrátovou specifitou redukující i nedisulfidové (Arnér & Holmgren 2000). TXNRD patří do rodiny pyridine nukleotide oxidoreduktáz (Gasdaska et al. 1996). Tento protein redukuje thioredoxin v přítomnosti NADPH stejně jako jiné substráty a hraje roli v metabolismu selenu a protekci oxidativnímu stresu. Tento homodimerní enzym používá FAD jako kofaktor a jednotlivé podjednotky obsahují selenocysteinový zbytek, který je podstatný pro katalytickou aktivitu (Nordberg & Arnér 2001). TXNRD má stejně jako TRX několik izoform. Databáze EntrezGene uvádí tři známé izoformy lišící se lokalizací. TXNRD1 je kódována genem *Txnr1* a jedná se o cytosolickou izoformu. V mitochondrii se vyskytuje druhá izoforma TXNRD2 dlouhá 524AA kódována genem *Txnr2*. Třetí izoforma se pravděpodobně vyskytuje v největším počtu buněčných komponent, a to cytoplasmě, jádře, mikrozomech a endoplazmaticém retikulu a je kódována genem *Txnr3*.

Díky reaktivitě TXNRD je enzym inhibován mnoha klinickými elektrofilními sloučeninami zahrnujícími nitrosomočovinu, thioglukósozlatnan, platinové sloučeniny a deriváty kyseliny retinové aj. (Nordberg & Arnér 2001). Vlastnosti TXNRD v kombinaci s funkcemi TRX staví tento systém jako střed buněčné thiol redoxní kontroly a antioxidační obrany. TXNRD katalyzuje regeneraci několika antioxidačních

komponent zahrnujících vit C a vit E (Buettner 1993), selenové substance, lipoové kyseliny (Arnér et al. 1996) a ubichinon (Q10) (Xia et al. 2001) - stává se tak významným antioxidačním systémem ROS.

TXNRD vykazuje rozsáhlou substrátovou specificitu, a mělo by být zdůrazněno, že fyziologické efekty buněčné TXNRD aktivity jsou úzce spojeny s různými buněčnými funkcemi TRX, přesto TXNRD může zastávat funkce nesouvisející s tímto TRX.



Obr. 4. Schéma hlavních fyziologických funkcí savčího thioredoxinového systému.

Redukce hydrogen peroxidu a regenerace aktivního místa glutathion peroxidázy jsou reakce, které mohou být také přímo katalizovány TXNRD. Redukce hydrogen peroxidu, závislá na thioredoxinovém systému, může být také vysoce efektivní ve spojení s peroxiredoxíny a také glutathion peroxidázami, ačkoli ty tuto funkci plní i bez spojení s thioredoxinovým systémem cestou GSH a GR (Nordberg & Arnér 2001).

Redukovaný thioredoxin předchází apoptóze přes inhibiční vazbu na ASK-1, přičemž v oxidovaném stavu se tato vazba ruší. To se projevuje v klinické praxi, kdy například TRX chrání čočku před oxidativním stresem a kataraktem (Reddy et al. 1999), inhibuje reperfuční arytmiie v modelu srdce (Aota et al. 1996) a extracelulárně působí na cytokiny, chemotaxe a další imunofunkce a zvyšuje se v séru u revmatitidy (Yoshida et al. 1999).

Expese TRX je indukována oxidativním stresem (Taniguchi et al. 1996) a dalšími faktory působícími na antioxidační responsivní element v TRX promotoru (Kim et al. 2001). Zvýšená expese TRX může vést k zvýšení redukce intracelulárních proteinů a dalších biomolekul jako součásti antioxidační obrany. Antioxidační efekt

TRX může působit i nepřímo tak, že obecně TRX reguluje signálně transdukční vlastnosti ROS snahou redukovat intracelulární S-S vazby indukované ROS a přímým snižováním ROS (Sen 2000). V případě transkripčních faktorů, TRX a dalších antioxidantů bylo shledáno zesílení AP-1 aktivace skrze jejich antioxidační potenciál (Arrigo 1999). Avšak je zajímavé, že oxidanty mohou též aktivovat AP-1 (Sen & Packer 1996). Aktivace dalšího transkripčního faktor NF- κ B je inhibována redukováním TRX v cytosolu a dalšími antioxidanty (Schenk et al. 1994). Oxidativní stres translokuje TRX do jádra, kde reguluje vazbu AP-1 a NF- κ B na DNA (Wei et al. 2000), což si vysvětlují tak, že snížení aktivity redukováním TRX brání translokaci do jádra, avšak oxidativní stres způsobuje přesun TRX do jádra, stejně tak přesun NF- κ B, a tak přítomnost TRX v jádře zesiluje vazbu NF- κ B na DNA. TRX působí extracelulárně i intracelulárně. Jeho intranukleární působení spočívá v regulaci NF- κ B, kdy redukce klíčových cystein zbytků zvyšuje vazbu na DNA po jeho translokaci do jádra (Matthews et al. 1992). TRX též zvyšuje vazbu na DNA u AP-1 přes Ref-1 v jádře (Wei et al. 2000).

Expres TRX je zvýšena následkem snížené hladiny redukováného TRX a zvýšením celkového oxidativního stresu (Das et al. 1999). Sekrece je pravděpodobně zesílena při zvýšené koncentraci intracelulárních ROS a udržování TRX v oxidované formě (Arnér 1999). TRX a TRX80 aktivují specifické cytokiny a chemokiny a tím zvyšují imunologickou odpověď na inhibici TXNRD (Yodoi & Tursz 1991). Zvýšená exprese reduktázy. Pokud buňky přežívají intenzivní oxidativní stres, tak zvyšují exprese nově syntetizované TXNRD a tím udržují fyziologickou homeostázu. Zvýšená exprese reduktázy byla zjištěna pod vlivem peroxidu, DNCB, kalcium ionoforů, PMA, IL-1beta, lipopolysacharidy a vitamin D3 (Rundlöf et al. 2001). Snížená aktivita reduktázy snižuje regeneraci mnoha svých substrátů a tím celou antioxidační kapacitu. Mnoho známých inhibitorů reduktázy inaktivují enzym v nízkých koncentracích a bylo provedeno mnoho studií na buňkách nebo in vitro. Snížení aktivity reduktázy zvyšuje produkci ROS a mezi dalšími efekty poškozují funkci PRX (Finkel 1998). Dalším následkem je snížení hladiny redukováného glutathionu a zvýšená oxidace intracelulárního prostředí (Nordberg & Arnér 2001).

2.2.4. Enzymy energetického metabolismu

2.2.4.1. Kreatin kináza

Kreatinkináza (CK) vytváří v buňce důmyslně propojený systém, který na jedné straně zajišťuje rychlou regeneraci ATP v místech jeho spotřeby (blízko ATPáz), na druhé straně v místech produkce ATP zajišťuje tvorbu dostatečně velké zásobárny kreatinfosfátu (PCr) a tím udržuje energetickou homeostázu v excitabilních tkáních v okamžiku náhlého požadavku na vysokou dodávku energie (Saks et al. 2007). V kardiomyocytech se vyskytují všechny čtyři izoformy CK; dvě cytosolické (CK M - *muscle* a CK B - *brain*), které vytváří v srdci funkční homo- i hetero- dimery. CKM dimer se váže v M-linii sarkomery (Hornemann et al. 2003), kde regeneruje ATP pro činnost myosinové ATPázy, přímo odebírá produkty ADP a H⁺ ionty a tím udržuje její vysokou aktivitu. Dále existují dvě mitochondriální izoformy (mitoCKs-*sarcomeric*, mitoCKu-*ubiquitus*), které v intermembránovém prostoru mitochondrií vytváří dimerické až oktamerické struktury, asociované s adeninovým translokátorem (ANT) a napěťově závislým aniontovým kanálem (VDAC) (Speer et al. 2005). V tomto strategickém umístění mitoCK má významnou úlohu ve stimulaci buněčného dýchání přímou dodávkou ADP v komplexu dýchacího řetězce (Brdiczka et al. 2006). Tento regulační mechanismus tak přímo ovlivňuje potenciál na vnitřní mitochondriální membráně, který souvisí s produkcí ROS v komplexech I a zvláště III (O'Gorman et al. 1996). Proto je mitoCK považována za důležitého kandidáta, který by se mohl podílet na kardioprotektivním mechanismu adaptace na chronickou hypoxii. Další funkcí mitoCK je uvolnění PCr, získaného z ATP dýchacího řetězce, do cytosolu. PCr je, ve srovnání s ATP, zhruba 6krát více a vzhledem k tomu, že je malou molekulou, může snáze difundovat k místům spotřeby energie. Důležitou funkcí celého tohoto systému je udržení vysokého poměru ATP/ADP v místech spotřeby energie pro optimální funkci ATPas (Ventura-Clapier et al. 2004).

2.2.4.1.1. Cytosolické CK izoformy

V cytoplasmě srdečního svalu se vyskytují dvě izoformy CK, dominantně se vyskytuje svalová izoforma CKM (43,1kD) je kódována genem *ckm* lokalizovaným na 19. tému chromozomu. Mozková izoforma CKB (42,6 kD) je zastoupena v řádově menším množství a vytváří CKBB homodimery v srdci a mnoha jiných tkáních, nejvíce však v mozku. CKMB heterodimery se tvoří pouze v srdečním svalu. Jak uvádí databáze EntrezGene, gen *Ckb* je lokalizován na 14-tém chromozomu. CKMM dimer se na rozdíl od CKB izoformy váže N-koncem do M4, M4' zóny M-linie sarkomery, kde interaguje s myomesinem (Hornemann et al. 2003). Dále asociuje dále poblíž Na/Katpázy na sarkolemě a Ca ATPázy na membráně sarkoplasmatického retikula (Rossi et al. 1990). V těchto místech plní svoji funkci přednostní dodávky ATP a současně odebírá ADP a H⁺ ionty. U CKB nebyly dosud prokázány žádné vazebné schopnosti se subcelulárními strukturami.

2.2.4.1.2. Mitochondriální izoformy

Mitochondriální izoformy existují tři, z toho dvě jsou lokalizované na chromozomu 15, tzv. všudypřítomné (*mitoCK-ubiquitous*) značené CKMT1 (kyselý typ) a CKMT2 (kyselý typ) a jedna na chromozomu 5 značená CKMT2 (*mitoCK-sarcomeric*, bazický typ). Vyskytují se jako dimery, které postupně vytvářejí oktamer vázaný na kardiolipin vnitřní membrány mitochondrií v intermembránovém prostoru. ANT, se kterým CK kolokalizuje, je též ukotven na kardiolipinu (Epanand et al. 2007). MitoCK v této oblasti se váže na fosfolipidy vnější membrány a VDAC (Speer et al. 2005) a tak vytváří virtuální spoj vnitřní a vnější membrány.

Kreatinkinázový systém je vysoce kompartmentalizovaný spolu s hexokinázou (HK) a adenylát kinázou (AK), což umožňuje lokální regulaci pH a významných energetických poměrů, jako je poměr ATP/ADP, ADP/AMP či PCr/PCr+Creatin.

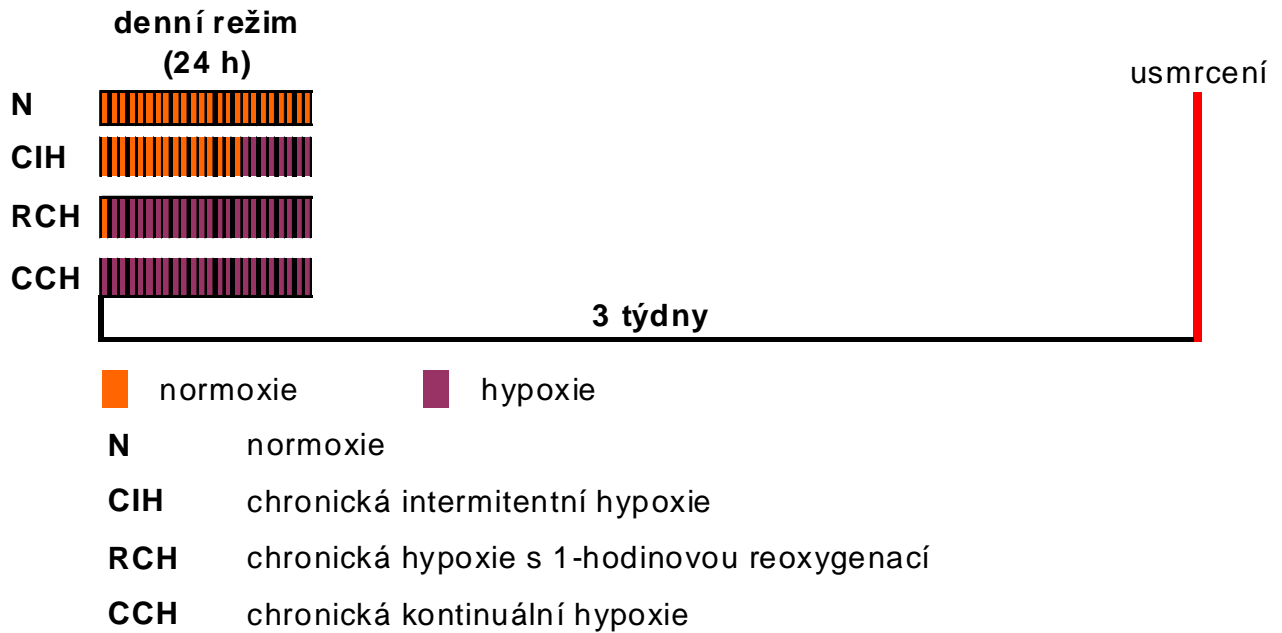
3. Cíle diplomové práce

1. Závést metodu izolace RNA ze srdeční tkáně a RNA čištění.
2. Navrhnout vhodné primery a optimalizovat Real Time RT PCR pro vybraných 20 genů.
3. Změřit hladiny mRNA vybraných genů pomocí Real Time RT PCR v levé komoře srdce u potkanů, kteří byli adaptováni na chronickou hypoxii podle tří protokolů: tj. kontinuální, intermitentní s 8 hodinovou reoxygeací a s 1 hodinovou reoxygeací.

4. Metodika

4.1. Adaptace potkanů na hypoxii

K pokusům byli použiti laboratorní potkani kmene Wistar, kteří byli adaptováni na chronickou hypoxii v normobarické komoře s obsahem kyslíku 10% což odpovídá 5 000 m.n.m. dle následujícího protokolu po dobu tří týdnů.



Každá jednotlivá skupina obsahovala 5 jedinců. Hmotnosti jednotlivých zvířat a srdcí jsou uvedeny v Přílohové části, str. 83, tab. 24.

První skupina byla označena N, jednalo se o kontrolní zvířata, která nebyla vystavena hypoxii. Druhá skupina označena CIH (chronická intermitentní hypoxie) měla denní režim nastaven tak, že potkani byli vždy 16 hodin v hypoxické komoře a na zbylých 8 hodin byli vyjmuti ven do normoxických podmínek. Třetí skupina nazvána RCH (chronická hypoxie s 1-hodinovou reoxygenací) byla v hypoxické komoře 23 hodin denně a vždy ve stejnou denní dobu na 1 hodinu vyjmuta do normoxických podmínek a poté opět vrácena do komory. Poslední čtvrtá skupina označena CCH (chronická kontinuální hypoxie) byla v hypoxické komoře po celou dobu trvání adaptačního procesu (3 týdny).

Po uplynutí třítydenní adaptační doby byly všechny skupiny ve stejnou dobu usmrceny a na ledu byly odebrány vzorky k pozdějšímu zpracování viz. kap. Příprava vzorků.

Pro veškeré práce byla použita ultračistá voda, buď miliporeQ voda dvakrát klávkovaná nebo DEPC ošetřená (firma Roche nebo Fermentas). Dále již jen voda. Veškerý použitý plast byl též vysoké čistoty, určen pro PCR, tj bez DNAs, RNAs a pyrogenů. Tkáně byly skladovány v tekutém dusíku a všechny vzorky v -80°C , pokud není uvedeno jinak.

4.2. Izolace RNA

4.2.1. Příprava vzorků

Potkani byli usmrceni cervikální dislokací. Následně bylo na ledu operativně vyjmuto srdce, vloženo do kádinky s chlazeným fyziologickým roztokem a ponecháno po dobu dvou až tří úderů, aby došlo k úplnému vyprázdnění komor od krve. Poté bylo srdce zváženo a na ledu rozděleno na levou komoru (LV), pravou komoru (RV) a septum (S). Jednotlivé části byly buď zváženy čerstvé před vložením do 1,5 ml Eppendorf zkumavky (dále jen zkumavky) (první odběry - chronické expozice) a nebo ihned zmrazeny v tekutém dusíku a následně zváženy (druhé odběry - akutní expozice). V prvních odběrech byla tkáň všech experimentálních skupin vložena přímo do Trizolu v předvážených zkumavkách a stříhány na ledu chirurgickými nůžkami. Druhá experimentální skupina byla homogenizována v tekutém dusíku viz. níže. Srovnání reprodukovatelnosti zpracování je zhodnoceno v Přílohové části str.85, tab. 26.

Hmotnosti jednotlivých částí srdce jsou uvedeny v Přílohové části, str. 84, tab. 25.

Vzorky byly buď okamžitě zpracovány v dalším postupu nebo byly uloženy v -80°C k pozdějšímu použití.

Dále byly připraveny dle počtu vzorků 2 ml zkumavky, do kterých byly vloženy vždy tři malé a tři velké skleněné kuličky a 0,5 ml Trizolu. Zkumavky byly zváženy a hodnoty zapsány, aby se později dala stanovit přesná hmotnost svalové tkáně vzorku.

4.2.2. Homogenizace srdečního svalu

Jednotlivé vzorky uložené v tekutém dusíku byly rozdrceny na jemný prášek ve vychlazené keramické třecí místičce s tekutým dusíkem. Poté byly velmi rychle, aby nedošlo k rozmrznutí svaloviny, přeneseny vychlazenou kovovou špachtličkou do připravené zkumavky s 0,5 ml Trizolu a několika skleněnými kuličkami, tak aby její hmotnost dosáhla 80-120 mg. Ihned byla zakapána dalším 0,5 ml Trizolu, takže výsledné množství Trizolu bylo 1 ml. Zkumavka byla po několika sekundách, kdy se vyrovnaly teploty svaloviny a tekutiny, uzavřena a dynamicky protřepána rukou, aby se celý vzorek promísil s tekutinou a krátce centrifugována. Vzorek ve zkumavce byl znovu zvážen, a byla stanovena hmotnost přidané svaloviny. Popřípadě se mohlo malé množství doplnit.

Vzorky byly dále homogenizovány ve vychlazených kyvetách homogenizátoru (MIXER MM200, Retsch) po dobu 15 minut při frekvenci 30 Hz. Následovala centrifugace po dobu 10 minut při 11000 g. V této fázi je nutné odebrat supernatant, který je možné uložit v -80°C k pozdějšímu zpracování a nebo pokračovat rovnou s izolací RNA.

4.2.3. Izolace RNA

K supernatantu odebranému od sedimentu po homogenizaci bylo přidáno 200 μl destilovaného chloroformu. Zkumavka se dynamicky protřepala a nechala inkubovat 3 minuty při pokojové teplotě. Poté byl vzorek znovu centrifugován 15 minut při 12000 g. Ze vzniklých tří fází byla odebrána nejsvrchnější průhledná vrstva, obsahující převážně RNA.

4.2.4. Precipitace RNA

Odebraná fáze byla vložena do nové čisté zkumavky a bylo k ní přidáno 500 μl destilovaného izopropanolu, opět dynamicky promícháno a ponecháno při pokojové teplotě inkubovat 10 minut. Následovala centrifugace 10 minut při 11000 g. Od vzniklého sedimentu byl odebrán supernatant.

4.2.5. Promývání RNA

K sedimentu byl přidán 1 ml 75% EtOH. Zkumavka byla lehce promíchána pomalým chodem třepačky a znovu centrifugována 5 minut při 7500 g. Ethanol byl odebrán a zkumavka se sedimentem po dobu 5-10 minut vysušována při teplotě 40°, aby se odpařil zbytek EtOH.

4.2.6. Rozpouštění RNA

RNA sediment byl rozpuštěn v 100 μ l RNase-free vody a inkubován 10 minut při 50-60°C.

4.2.7. Měření koncentrace RNA

Koncentrace a kvalita RNA byla stanovena spektrofotometricky na spektrofotometru určeného pro měření malých objemů (1 μ l) Nanodrop (Lab Mark) 1 μ l vzorku byl 10x zředěn pomocí 0,5% SDS (1:9) a roztok SDS byl použit jako blank. Poměr absorbance při 260 a 280 nm je používán jako měřítko čistoty DNA a RNA. Poměr odpovídající 1,8 je obecně přijímán jako čistá DNA. Poměr 2,0 - 2,2 je obecně přijímán jako čistá RNA. Pokud je toto číslo nižší, než je uvedeno, indikuje přítomnost proteinů, fenolů nebo dalších kontaminantů, které silně absorbují v/nebo blízko 280 nm (manual NanoDrop Technologies, 2007).

Malé změny v pH roztoku mohou způsobit kolísání poměru 260/280 (Wilfinger et al. 1997). Kyselé roztoky mohou snižovat poměr až o 0,2 - 0,3, zatímco alkalické roztoky mohou tento poměr o uvedené hodnoty zvyšovat. Důležitým faktorem je též iontová síla roztoku.

Výsledky měření koncentrace byly použity k přepočtu nanášky pro následné čištění RNA.

4.2.8. Čištění RNA

Čištění vzorků bylo provedeno dle protokolu DNA-freeTM Kit Applied Biosystems Ambion. Principem metody je smísení adekvátního množství vzorku s DNAsou a následná inaktivace DNAsy precipitací. Zvolili jsme protokol, který předpokládal vstupní množství do čištění 10 μ g RNA. Dle naměřených údajů koncentrace vzorků byl spočítán objem vzorku, RNA nutný pro jednu reakci čištění,

nanesen a doplněn do 50 μ l Nuclease-free vodou tak, aby finální množství RNA bylo 10 μ g. Dále bylo postupováno dle protokolu. Bylo přidáno 5 μ l 10X DNase I Buffer a 1 μ l rDNase I, lehce promícháno a inkubováno 20-30 minut při 37°C. Poté byl přidán 5 μ l DNase Inactivation Reagent a za občasného promíchávání špičkou bylo inkubováno 5 minut při pokojové teplotě. Na závěr byly vzorky centrifugovány 5 minut při 10000 g. Od sedimentu byl opatrně odebrán supernatant obsahující RNA a vložen do čisté zkumavky a označen jako RNA „clean“. Tato čistá RNA byla znovu měřena stejným postupem na Nanodropu jako v případě nepročištěné RNA a stanovena koncentrace.

4.3. Reverzní transkripce

Reverzní transkripce převádí RNA na cDNA, která je stabilnější a vhodná pro PCR reakci. Na reverzní transkripci byl použit protokol RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit od společnosti (Fermentas). Do reakce vždy vstupovalo množství 1 μ g RNA. Z předchozího měření koncentrace bylo vypočítáno množství pročištěné RNA, které bylo vloženo do reakce a doplněno do 11 μ l vodou a 1 μ l oligo (dT)₁₈ primeru (0.5 μ g/ μ l). Následovala inkubace při 70°C 5 minut. Poté byly vzorky zchlazeny na ledu a bylo pokračováno přidáním 4 μ l reaction buffer, 1 μ l RiboLockTM RNase inhibitor (20u/ μ l), 2 μ l 10 mM DNTP mix a 1 μ l RevertAidTM H Minus M-MuLV RT (200U/ μ l) promícháno, lehce zcentrifugováno a inkubováno po dobu 60 minut při 42°C. Reakce byla ukončena zahříváním při 70°C 10 minut. Pak byly vzorky zchlazeny na ledu a označeny jako cDNA pro pozdější použití.

4.4. Real Time RT PCR

Primery a sondy použity při Real Time RT PCR reakci byly navrženy využitím databáze UPL Library Roche, jejich názvy a sekvence jsou uvedeny v přílohou části (viz. Přílohou část str.86-87, tabulka 27). Primery byly objednány u firmy Eurogentec (Belgie) v lyofilizované podobě, čištěné odsolením. Byl naředěn zásobní roztok do 500 μ M koncentrace a zamrazen v -20°C. Používané roztoky primerů byly ředěny na 5 μ M koncentraci a též zamrazeny v -80°C. Próby byly použity přímo ze zásobních roztoků.

PCR reakce byla provedena podle návodu Light Cyclecr 480 Probes Master Mix (Roche), kdy na jednu reakci s objemem 10 μ l byly jednotlivé reagenty smíchány v následujícím poměru :

reagent	[μ l]
H2O	3,1
MixRoche	5,0
primer (R+T)	0,8
proba	0,1
cDNA	1,0

Před použitím každého nového primeru byl ověřen specifický produkt pomocí iQTM Syber green Bio-Rad Kitu a křivky tání.

Pro stanovení efektivity PCR reakce byly provedeny kalibrační křivky šesti až deseti násobným ředěním pro každý primer.

Samotná PCR reakce byla provedena na cykléru LightCycler[®] 480 Real-Time PCR dle protokolu na obrázku č. 5, byly použity destičky s počtem jamek 384, objem reakce 10 μ l.

Obr. č. 5 : Nastavení protokolu cykléru.

název programu:	Preinkubace		
počet cyklů	1		
podmínky průběhu :			
teplota [°C]	acquisition mode	čas [hh:mm:ss]	rychlost vzrůstu [°C/s]
95	none	00:10:00	4,8
název programu:	Amplifikace - kvantifikace		
počet cyklů	50		
podmínky průběhu:			
teplota [°C]	acquisition mode	čas [hh:mm:ss]	rychlost vzrůstu [°C/s]
95	none	00:00:10	4,8
60	single	00:00:30	2,5
72	none	00:00:01	4,8
název programu:	Zchlazení		
počet cyklů	1		
podmínky průběhu:			
teplota [°C]	acquisition mode	čas [hh:mm:ss]	rychlost vzrůstu [°C/s]
40	none	00:00:30	2,5

4.5. PCR

Testování primerů (Bustin et al. 2009)

- a) Pro každý primer byla stanovena křivka tání pomocí SyberGreen BioRad (fluorescenční proby, která se váže nespecificky na ds DNA). Tato křivka určuje počet PCR produktů daného primery a byl tedy dále používán pouze takový primer, který měl pouze jeden produkt.
- b) Dále byla proměřena kalibrační křivka, která dává hodnotu účinnosti reakce (efektivitu E) pro každý pár primerů nutnou pro kvantifikaci
- c) Všechny vzorky PCR reakce byly měřeny v triplicátech a nelišily se o více než 0,5 Cp (hodnota Cp značí počet cyklů).
- d) Hladina analyzovaného transkriptu byla normalizována k hladině transkriptu referenčního genu GAPDH s ohledem na efektivitu pro každý gen takto (Klusonová et al. 2009)

Normalizované množství = $(1+E)^{CT}$ referenční transkript/ $(1+E)^{CT}$ sledovaný transkript

Statistické hodnocení

Výsledné hodnoty normalizovaného množství byly testovány na normalitu rozložení, kterou převažná většina z nich nesplnila. Proto, byl pro hodnocení použit nepárový neparametricky Mann-Whitney test (statistický program GrandPad Prison5). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM (standart error median), $p < 0,05$, $n=5$.

5. Výsledky

Výsledky přináší relativní hladiny mRNA vybraných genů, které byli rozděleny do tří sjednocujících skupin. i) HIF a jeho regulační geny, ii) oxidoredukční systémy a iii) enzymy energetického metabolismu.

První sledovaná skupina genů, HIF a jeho regulační geny, je centrálním regulátorem buněčných reakcí za sníženého přísunu kyslíku. HIF samotný aktivuje více než sto cílových genů, které se podílejí na adaptaci na hypoxii. U HIF-1 α podjednotky je známa účast hypoxické stimulace. Dle našich výsledků dosáhla hladina mRNA v normoxii hodnoty $1,364 \pm 0,088$, a ta se změnila na hranici signifikantnosti pouze u RCH na hodnotu $1,172 \pm 0,151$ (viz. Přílohová část str. 58, graf 1a, tabulka 1b). V ostatních adaptacích nedošlo k žádné signifikantní změně. Významným regulátorem HIF za normoxických podmínek je FIH1 (asparagynyl-hydroxyláza). Její hladina mRNA oproti normoxii ($0,36 \pm 0,044$) se signifikantně snížila ve dvou expozicích hypoxie RCH ($0,254 \pm 0,054$) a CCH ($0,2425 \pm 0,051$) (viz. Přílohová část str. 59, graf 2a, tabulka 2b). V CIH se hladina významně nezměnila.

Dalšími regulátory HIF na úrovni proteinu jsou prolyl-hydroxylázy (PHD), inaktivovány za hypoxie. Zabývali jsme se izoformou PHD3 (gen *Egln3*) indukovanou hypoxií v kardiomyocytech a všudypřítomnou PHD1 (gen *Egln2*). Zatímco u PHD3 se oproti normoxické hodnotě ($4,948 \pm 0,491$) hladina mRNA signifikantně nezměnila v žádné z expozic (viz. Přílohová část str. 61, graf 4a, tabulka 4b), *Egln2* dosáhlo v normoxii hodnoty $17,218 \pm 1,131$ a signifikantně se zvýšila hodnota u CCH na $22,526 \pm 2,763$ (viz. Přílohová část str. 60, graf 3a, tabulka 3b). U expozice RCH a CIH se oproti normoxii hladiny signifikantně nezměnily. Porovnání průměrů hodnot mRNA obou izoform v jednotlivých expozicích ukazuje majoritní zastoupení všudypřítomné PHD1 oproti PHD3 v srdci (viz. Přílohová část str. 81, graf 24).

Do oxidoredukčních systémů jsme zařadily enzymy, které jsou přímými (SOD Mn, SOD Cu, CAT) i nepřímými (ACO, TXNRD, GSR, GST) odbourávači ROS, ale i enzym, který je dle nejnovějších poznatků významným producentem ROS (MAO A). Poslední zmiňovaný enzym MAO A byl v nedávné době identifikován jako podstatný producent ROS v mitochondriích. Naše měření poskytlo výsledky, které uvádí relativní hladinu mRNA v normoxii $7,452 \pm 1,522$ a ostatních expozicích se hladiny signifikantně nezměnily (viz. Přílohová část str. 62, graf 5a, tabulka 5b).

Prvním důležitým antioxidačním enzymem je SOD (superoxid dismutáza). Cytoplazmatická izoforma, SOD Cu, dosáhla v normoxii relativní hodnoty mRNA $13,716 \pm 1,522$ a v ostatních expozičních nedošlo k signifikantní změně (viz. Přílohová část str. 64, graf 7a, tabulka 7b). Avšak mitochondriální izoforma, SOD Mn, která měla relativní hladinu mRNA v normoxii $8,408 \pm 0,419$, se signifikantně snížila v CCH na hodnotu $6,62 \pm 1,283$ a v RCH na $7,218 \pm 0,390$. V CIH se hodnota signifikantně nezměnila (viz. Přílohová část str. 65, graf 8a, tabulka 8b). Naše výsledky ukazují, že porovnání průměrů hodnot mRNA obou izoform v srdci je vyjádřen dominantním zastoupením SOD Cu (viz. Přílohová část str. 81, graf 25). U enzymu CAT (kataláza) jsme naměřili normoxickou hodnotu $0,296 \pm 0,027$, a ta se signifikantně zvýšila v CCH na hodnotu $0,444 \pm 0,050$. V CIH a RCH se hodnota opět signifikantně nezměnila (viz. Přílohová část str. 63, graf 6a, tabulka 6b).

Náš první enzym, působící nepřímo na regulaci hladiny ROS je ACO (akonitáza). ACO1, cytoplazmatická izoforma, se oproti normoxické hodnotě hladiny mRNA ($0,942 \pm 0,069$) nezměnila v žádné z hypoxických expozičních (viz. Přílohová část str. 66, graf 9a, tabulka 9b). Stejně tak tomu je i s druhou mitochondriální izoformou ACO2, která má v normoxii hodnotu $34,77 \pm 2,829$ a v CCH, CIH a RCH se signifikantně nezměnila (viz. Přílohová část str. 67, graf 10a, tabulka 10b). Porovnání průměrů hodnot mRNA obou izoform ukazuje zcela majoritní zastoupení mitochondriální ACO2 (viz. Přílohová část str. 82, graf 26) Z glutathionového systému námi vybraná GSR (glutathion reduktáza) měla naměřenu relativní hladinu mRNA v normoxii $3,408 \pm 0,296$. Ta se signifikantně snížila v RCH ($2,616 \pm 0,293$) a v CCH ($3,008 \pm 0,095$). V CIH se hladina významně nezměnila (viz. Přílohová část str. 68, graf 11a, tabulka 11b). Druhým námi zvoleným zástupcem tohoto systému je GST (glutathion-S-transferáza), jehož hladina v normoxii ($0,938 \pm 0,082$) se v žádné z hypoxických expozičních nezměnila (viz. Přílohová část str. 69, graf 12a, tabulka 12b). Z thioredoxinové komplexu jsme zvolili TXNRD (thioredoxin reduktázu), resp. izoformu cytoplazmatickou TXNRD1 (gen *Txnrd1*) a mitochondriální TXNRD2 (gen *Txnrd2*). TXNRD1 měla v normoxii hodnotu $0,64 \pm 0,041$ a v ostatních expozičních změna signifikantní nebyla (viz. Přílohová část str. 70, graf 13a, tabulka 13b). Stejně tak tomu bylo u druhé izoformy TXNRD2, kdy hodnota v normoxii byla $2,526 \pm 0,309$ a ostatní expoziční tuto hodnotu signifikantně nezměnily (viz. Přílohová část str. 71, graf 14a, tabulka 14b). Porovnání průměrů hodnot mRNA obou izoform ukazuje

dominantní zastoupení mitochondriální TXNRD2 oproti cytosolické izoformě (viz. Přílohová část str. 82, graf 27).

Poslední sjednocující skupina, týkající se enzymů energetického metabolismu, zahrnuje dvě mitochondriální izoformy, mitoCKu (mitochondriální kreatinkinázu - *ubiquitus*), mitoCKs (mitochondriální kreatinkináza - *sarcomeric*), a dvě cytosolické izoformy CK M (kreatinkináza - muscle) a CK B kreatinkináza - brain. MitoCKu dosáhla relativní hladiny mRNA v normoxii $2,3 \cdot 10^{-5} \pm 0,00001$ a nezměnila se signifikantně v žádné jiné expozici (viz. Přílohová část str. 72, graf 15a, tabulka 15b). U mitoCKs měla hladina v normoxii hodnotu $92,44 \pm 6,444$ a došlo k signifikantnímu snížení v RCH o přibližně 17% na hodnotu $77,96 \pm 5,079$. V CIH a CCH se hladina významně nezměnila (viz. Přílohová část str. 73, graf 16a, tabulka 16b). U cytosolické izoformy CK M jsme naměřili normoxickou hodnotu hladiny mRNA $102,81 \pm 9,542$. Ta se signifikantně snížila o 20% u RCH expozice na hodnotu $82,796 \pm 8,01$. Ve zbylých dvou expozicích k významné změně nedošlo (viz. Přílohová část str. 74, graf 17a, tabulka 17b). U druhé cytosolické izoformy CK B byla normoxická hodnota $2,125 \pm 0,414$ a z našich výsledků vychází signifikantní posun u dvou expozic. V CIH se hladina mRNA snížila o 53% na hodnotu $1,008 \pm 0,292$. V RCH došlo také ke snížení na hodnotu $1,057 \pm 0,062$, tj. přibližně o 50%. V CCH nedošlo k významné změně hladiny mRNA (viz. Přílohová část str. 75, graf 18a, tabulka 18b).

6. Diskuze

Tato práce měla za cíl poskytnout screening vybraných genů, souvisejících s oxidoredukčními systémy a týkajících se kardioprotektivních účinků různých expozičních chronické hypoxie. Pokusy byly prováděny na dospělých samcích potkanů kmene Whistar. Chronická hypoxie byla navozena v normobarické hypoxické komoře, kde bylo množství O_2 sníženo na 10%. Byly vytvořeny čtyři experimentální skupiny s různým časovým rozvrhem expozice hypoxie: i) normoxická (N), ii) chronická kontinuální hypoxie (CCH - 10% O_2 , 24 h denně, 21 expozičních), iii) chronická intermitentní hypoxie (CIH - 10% O_2 , 8 h denně, 21 expozičních), iv) reoxygenační chronická hypoxie s hodinovou reoxygenací (RCH - 10% O_2 , 23 h denně, 21 expozičních). Ne u všech těchto expozičních je zcela znám kardioprotektivní účinek. Nejvíce prozkoumaným modelem je chronická intermitentní výšková (hypobarická) hypoxie, která snižuje velikost infarktu, srdečních arytmií a zlepšuje obnovu kontraktilních funkcí myokardu. Kontinuální chronická hypoxie navozená v normobarické komoře má pozitivní vliv na velikost infarktu, avšak bylo prokázáno, že nepřináší antiarytmický účinek. Objevem posledního roku laboratoře Fyziologického ústavu AV je zjištění, že jednohodinová reoxygenace zhašší veškeré kardioprotektivní účinky (ústní sdělení J. Neckář).

Výsledky přináší relativní hladiny mRNA vybraných genů, které byli rozděleny do tří sjednocujících skupin. i) HIF a jeho regulační geny, ii) oxidoredukční systémy a iii) enzymy energetického metabolismu. Hladiny mRNA byly vztaženy k housekeeping genu GAPDH. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (standard error median), $p < 0,05$, $n=5$.

První sledovaná skupina zahrnuje, HIF, který má nezatupitelnou úlohu v buněčné odpovědi myokardu na ischemické poškození, a hydroxylázy, které regulují jeho hladinu na proteinové úrovni cestou kyslík dependentní proteolýzy v normoxii. V hypoxii naopak dochází ke stabilizaci jeho alfa podjednotky inhibicí hydroxyláz a HIF ve formě α/β dimeru získá svoji transkripční aktivitu, kdy může ovlivnit až stovky genů (Wang et al. 1995). Z literatury vyplývá, že efekt CIH a CCH v akumulaci HIF se liší v následujících aspektech: i) intenzita a trvání, CIH je více účinná v růstu HIF 1 α proteinu než CH (Yuan et al. 2005), ii) CIH udržuje zvýšený HIF i po návratu do normoxie, zatímco u CH dochází k jeho poklesu již po 10 min návratu do normoxických podmínek (Yuan et al. 2008). Naše výsledky ukázali, že se jeho mRNA hladina

signifikantně nelišila od normoxie ($1,364 \pm 0,088$) v CIH ani CCH (viz. Přílohová část str. 58, graf 1a, tabulka 1b). V RCH je trend ke snížení o 15% ($1,172 \pm 0,151$) ($p=0,055$). Stroka et al. potvrdili na myších (které, jsou k hypoxii více odolné než potkani), že v normoxii je exprese HIF rozdílná v různých orgánech (HIF je přítomný v mozku, ledvinách, srdci, svalech i játrech) a v srdci je v podstatě nejnižší společně s ledvinami; jeho kinetika se též v jednotlivých orgánech velmi liší. Nárůst exprese je spíš záležitost akutní; v játrech a ledvinách dosahuje maxima po jedné hodině hypoxie a navrácí se k normě po 4 hodinách, avšak v mozku dosahuje maxima až po 5h a po 12h klesne k původním hodnotám (Stroka et al. 2001). Aktivace transkripce HIF v akutní fázi hypoxie vysvětluje, proč jsou naše výsledky v chronické expozici v CIH a CCH nezměněny. RCH patrně přináší jiný typ stresu, na který je obtížné se adaptovat (nemá protektivní efekt), a proto může být trend exprese HIF opačný. Je velmi pravděpodobné, že po dlouhodobé adaptaci na CCH a CIH se buňky nacházejí již v rovnovážném stavu a proto "turn over" této mRNA se neliší od kontrol.

Naše výsledky lze v současné době srovnat s odpovídajícími literárními údaji jen sporadicky, neboť o expresi existuje poměrně málo informací na velmi nesourodých modelech. Většina prací uvádí zvýšení HIF 1 mRNA po krátkém a silném hypoxickém stimulu na buněčných kulturách. Na primární kulturu z neonatálních kardiomyocytů byl aplikován anoxický stimulus, trvající 20 min a po něm následovala 36 h hypoxie (1-2% O_2), který též zvýšil expresi HIF1. Stejně tak silný krátkodobý hypoxický stimulus 6,5-7,5% O_2 po dobu 0,5 až 2 hodiny vyvolal zvýšenou expresi HIF1 α (Wiener et al. 1996). In vitro studie na HL-1 buňkách ukazuje zvýšení HIF1mRNA (včetně proteinu) v reakci na 1% po dobu 12 a 24 (Nguyen & Claycomb 1999). Weiner et al. ukázali, že HIF 1 mRNA se nezvýšila v LV u potkan po 60 min 7% O_2 expozice (Wiener et al. 1996).

Avšak existují i studie adaptační, které popisují zvýšení HIF exprese u srdce při adaptaci na 10% O_2 , avšak není zřejmé, zda se jedná o hypobarickou či normobarickou hypoxii. Forkel et al (2003) uvádějí zvýšení exprese HIF 1 u srdce v adaptaci stejné nadmořské výšky, avšak pouze po dobu dvou týdnů (pp normobarická – hematokrit 63%) (Forkel et al. 2004). Při adaptaci 3 týdny na 10% O_2 hypoxii (z práce není jasné, zda jde o normobarickou či hypobarickou expozici) došlo též ke zvýšení HIF 1 mRNA zhruba o 15% (Lam et al. 2008)

Nemělo by se též opominout, že případná potřeba doplnění či zvýšení hladiny mRNA se může realizovat nepravidelně a v podstatě pulsně (o tom svědčí akutní

studie). Tudíž by byla náhoda v chronické expozici zastihnout tuto epizodu. Zajímavé by bylo změřit HIF v hypobarii, neboť ta poskytuje silnější hypoxický stimulus než normobarická hypoxie při stejné koncentraci O₂ a má silný kardioprotektivní charakter.

Jak již bylo řečeno, významným regulátorem HIF za normoxických podmínek jsou specifické hydroxylázy. Recentní studie (Bao et al. 2010) ukázala, že inhibice těchto hydroxyláz lokálně zvyšuje HIF1 α , který aktivuje abiogenezi a remodelaci srdce, což zlepšuje celkovou srdeční funkci před ischemickým poškozením. V naší práci jsme stanovili expresi tří hydroxyláz souvisejících s regulací HIF1 α v srdci (asparagynyl-hydroxyláza FIH1 a EGLN1, EGLN3). Hladina mRNA FIH1 v naší práci ($0,36 \pm 0,044$) signifikantně klesla oproti normoxii ve dvou expozicích hypoxie (RCH, CCH,) o 27 a 33% v uvedeném pořadí, (viz. Přílohová část str. 59, graf 2a, tabulka 2b), což svědčí o významné funkci této hydroxylázy v regulaci HIF v hypoxickém srdci. In vitro práce na buňkách HEK293 a Hep3B ukázali, že mRNA FIH1 se snižuje v hypoxii (1% O₂), což je v souladu s našimi výsledky získanými s 10x nižší hypoxií (Mahon et al. 2001).

Dalšími regulátory HIF na úrovni proteinu jsou prolyl-hydroxylázy (PHD), které jsou inaktivovány za hypoxie. Hladina mRNA PHD3 (gen *egln3*) se oproti normoxické hladině ($4,948 \pm 0,491$) signifikantně nezměnila v žádné z expozic (viz. Přílohová část str. 61, graf 4a, tabulka 4b). V buněčných studiích se hovoří o zvýšení PHD3 mRNA po 4 h vysoce hypoxického stimulu (1% O₂) u lidských kardiomyocytů, zatímco EglN2 mRNA se nezměnila (Cioffi et al. 2003). U 8 týdenních potkanů aklimatizovaných v normobarických komorách na 8% O₂ po dobu 8 h (perfúze srdce, infarkt) rostla mRNA PHD3 po ischemickém zásahu (Willam et al. 2006).

Množství všudypřítomné PHD1 (*egln2*) v našich experimentech dosáhlo v normoxii hodnoty $17,218 \pm 1,131$ a signifikantně se zvýšila o 30% u CCH na $22,526 \pm 2,763$ (viz. Přílohová část str. 60, graf 3a, tabulka 3b). U expozice RCH a CIH se oproti normoxii hladiny signifikantně nezměnily.

Úloha oxidativního stresu v ischemicko/reperfúzním poškození srdce je považována za velmi významnou. Na druhé straně Kolář et al. nedávno prokázali, že podání NAC (N-acetyl cystein) snižující GSH/GSSH poměr (a tedy míru oxidativního stresu), zcela potlačilo kardioprotektivní účinek hypobarické CIH (Kolar et al. 2007).

Tento nálezn přinesl potřebu zmapovat antioxidační systém v myokardu za různých adaptací (včetně RCH, která kardioprotektivní mechanismy hypoxie potlačuje), neboť se zdá, že přiměřená míra oxidativního stresu souvisí s aktivací kardioprotektivních mechanismů. Vybrali jsme tedy do počátečního screeningu mRNA

hlavních antioxidačních enzymů zástupce, které jsou přímými (SOD Mn, SOD Cu, CAT) i nepřímými (ACO, TXNRD, GSR, GST) odbourávači ROS.

SOD (superoxid dismutáza) je důležitým antioxidačním enzymem a její aktivace je spojována nejen se zvýšením odolnosti vůči I/R poškození a oxidativnímu stresu, ale je spojována i se zánětlivými procesy či aktivovanými heat shock proteiny při tělesné zátěži (Hamilton et al. 2001, Shiro Hoshida et al. 2002). Cytoplazmatická izoforma, SOD Cu nebyla v našich modelech změněna (viz. Přílohová část str. 64, graf 7a, tabulka 7b). Avšak mitochondriální izoforma, SOD Mn se v CCH snížila o 22% ($6,62 \pm 1,283$) proti normoxii ($8,408 \pm 0,419$), k poklesu došlo též v RCH o 14% ($7,218 \pm 0,390$). V nové skupině zvířat však k těmto poklesům nedošlo, tak je nezbytné tyto výsledky ještě opakovat na další skupině. V literatuře se uvádí měření SOD aktivity většinou v kontextu navozeného stresu podáním H_2O_2 v krátkých časových usecích. Výzkumná skupina Yamashita et al. prováděla měření exprese a aktivity SOD Mn na neonatálních myocytech potkana in vitro, které vystavila 1h hypoxii pomocí hypoxického roztoku (>94% N, 5% CO_2 , 1% O_2) a následné reoxygenaci. V reoxygenaci došlo ke zvýšení aktivity, která nad normoxickými hodnotami přetrvávala až 36 h, a dále ke zvýšení exprese, která vyvrcholila 20-40 minut po hypoxickém stimulu (Yamashita et al. 1994). Podobných výsledků zvýšení exprese SOD Mn po promývání H_2O_2 dosáhla i skupina Röhrdanz et al. (Röhrdanz & Kahl 1998). Avšak u perfundovaného srdce po 30 minutovém promývání H_2O_2 k nárůstu SOD Mn mRNA nedošlo (Csonka et al. 2000). Nejblíže našim podmínkám adaptace na hypoxii byl výzkumný projekt, prováděný na prasatech. V LV došlo ke zvýšení aktivity a exprese mitochondriální SOD Mn po adaptaci na hypobarickou CIH (5000m, 6h/den, 28 expozic), avšak u cytosolické SOD Cu při stejných podmínkách k žádným změnám exprese ani aktivity nedošlo (Guo et al. 2009).

CAT je druhým přímým odbourávačem v metabolické dráze ROS. Její aktivita byla již několikrát potvrzena jako hlavní determinant v buněčné obraně proti H_2O_2 toxicitě v různých typech buněk (Yamada et al. 1991, Spitz et al. 1992, Kasugai & Yamada 1992), stejně tak, jako její zvýšená exprese v odpovědi na H_2O_2 (Tate et al. 1995, Clerch et al. 1991). Z našich měření vyplývá signifikantní zvýšení hladiny mRNA proti normoxii ($0,296 \pm 0,027$) v CCH o 50% na hodnotu $0,445 \pm 0,055$, což potvrzuje kardioprotektivní působení CCH a s tím koreluje naše signifikantní snížení v RCH o 7% ($0,2025 \pm 0,068$), kdy RCH je známa jako zhášec kardioprotekce. V již zmíněném studiu na guinejských prasatech (Guo et al. 2009), byla též měřena aktivita a exprese CAT v

srdci, přičemž hypobarická CIH hladinu CAT mRNA indukovala, stejně jako její aktivitu. Avšak naše výsledky změnu hodnoty v normobarické CIH nepotvrdily (viz. Přílohová část str. 63, graf 6a, tabulka 6b). Jak ukazují některé další studie, krátkodobý hypoxický stimulus *in vitro* může vyvolat dokonce snížení exprese a aktivity CAT (Röhrdanz & Kahl 1998), ale také nemusí (Csonka et al. 2000). Je tedy opět velmi podstatné, jaký model byl k pokusu využit a za jakých podmínek.

ACO je významným regulátorem homeostázy železa (tzn. poměr redukované a oxidované formy) a nepřímo zasahuje do regulace hladiny ROS v buňce. Homeostáza železa je vedle kyslíku, významným regulačním faktorem aktivity hydroxyláz, jak PHD, tak FIH, neboť redukovaná forma Fe^{2+} je jejich přímým kofaktorem společně s ascorbátem. Z toho plyne, že přiměřeně zvýšený oxidativní stres snižuje aktivitu hydroxyláz a tím aktivuje HIF, který je ve zvýšené míře je toxický. Zde můžeme hledat kardioprotektivní působení přiměřeného hypoxického stimulu, který utlumí působení hydroxyláz a aktivuje HIF, který se podílí na rozvoji angiogeneze, metabolické adaptaci a remodelaci myokardu podporující jeho viabilitu v hypoxii. Cytoplazmatická izoforma, ACO1, se oproti normoxické hodnotě hladiny mRNA ($0,942 \pm 0,069$) nezměnila v žádné z hypoxických expozic (viz. Přílohová část str. 66, graf 9a, tabulka 9b). Stejně tak tomu je i s druhou mitochondriální izoformou ACO2, která má v normoxii hodnotu $34,77 \pm 2,829$ a v CCH, CIH a RCH se významně nezměnila (viz. Přílohová část str. 67, graf 10a, tabulka 10b).

Co se týká GSR, tak jediná studie o expresi GSR v modelu hypoxie byla provedena výzkumnou skupinou Farias et al., kdy byly stanoveny hladiny aktivity a exprese proteinu ve varlatech a nadvarlatech u krys adaptovaných na hypobarickou intermitentní hypoxii (4600m) (96 h hypoxie – 96 h normoxie po dobu 32 dnů). Výsledky přinesly redukcii aktivity a významné snížení exprese CAT mRNA (Farias et al. 2010). Z našich výsledků vyplývá podobný závěr, kdy dochází u GSR k významnému snížení v RCH ($2,616 \pm 0,293$) o 23% oproti normoxii ($3,408 \pm 0,296$) a stejně tak v CCH o 13% ($3,008 \pm 0,095$). V CIH se hladina významně nezměnila (viz. Přílohová část str. 68, graf 11a, tabulka 11b). Výsledky skupiny Sarada et al. *in vitro* na myších buňkách (neuroblastoma), které byly ošetřeny selenem a následně exponovány v hypoxickém roztoku (3% O_2 , 92% N_2 and 5% CO_2) po dobu 48 h, přinesly zajímavé výsledky, propojující glutathionový systém s funkcí SOD. Po ošetření buněk selenem a následné hypoxii došlo ke zvýšení GSH, aktivity GSR a GPx a stejně tak SOD aktivity. Buňky vystavené pouze hypoxii (bez ošetření) nezvýšily aktivitu ani jednoho

z uvedených enzymů. Z výsledků vyplývá, že dostatečný přísun selenu zajišťuje odpovídající aktivitu GSR a PRx, které udržují optimální redukční stav buňky (Sarada et al. 2008). V tomto optimálním vnitrobuněčném prostředí může SOD působit jako ochranný element. Naopak příliš vysoký oxidativní stres v tomto případě naopak snižuje její aktivitu. Tyto výsledky jsou v souladu s našimi nálezy, kdy se SOD mRNA Mn/Cu hladiny nemění v normobarické expozici, avšak SOD Cu signifikantně klesá v hypobarické hypoxii (neuvedený výsledek v práci).

Druhým námi zvoleným zástupcem tohoto systému je GST (glutathion-S-transferáza), jehož hladina v normoxii ($0,938 \pm 0,082$) se v žádné z hypoxických expozic nezměnila (viz. Přílohová část str. 69, graf 12a, tabulka 12b).

Z thioredoxinové komplexu jsme zvolili TXNRD (thioredoxin reduktázu), resp. izoformu cytoplazatickou TXNRD1 (gen *Txnrd1*) a mitochondriální TXNRD2 (gen *Txnrd2*). *Txnrd1* měla v normoxii hodnotu $0,64 \pm 0,041$ a v ostatních expozicích změna nebyla signifikantní (viz. Přílohová část str. 70, graf 13a, tabulka 13b). Stejně tak tomu bylo u druhé izoformy *Txnrd2*, kdy hodnota v normoxii byla $2,526 \pm 0,309$ a ostatní expozice tuto hodnotu signifikantně nezměnily (viz. Přílohová část str. 71, graf 14a, tabulka 14b).

Izoformy CK jsou nedílnou součástí energetického metabolismu srdce a mitochondriální CK je v této práci zmiňována v kontextu udržení potenciálu na mitochondriální membráně přímou dodávkou ADP komplexu V dýchacího řetězce a s tím souvisejícího snížení produkce ROS. Námi sledovaná skupina zahrnuje obě mitochondriální izoformy, mitoCKu (mitochondriální kreatinkinázu - *ubiquitus*), mitoCKs (mitochondriální kreatinkináza - *sarcomeric*), a obě cytosolické izoformy CK M (muscle) a CK B (brain). V souvislosti se srdcem byly publikovány údaje získané metodou Northern blotting, které uvádějí, že ze čtyř izoform pouze mitoCKu není v srdci exprimována (Anflous et al. 1997). Tuto informaci jsme potvrdily u všech expozic (viz. Přílohová část str. 72, graf 15a, tabulka 15b) pomocí Real Time RT PCR. Naměřené hodnoty mRNA pro CK izoformy ukázali několik zajímavých skutečností. Majoritní exprese dosáhly izoformy CK M ($102,81 \pm 9,542$) a mitoCKs ($92,44 \pm 6,444$) a obě izoformy se v normoxii i v ostatních expozicích vzájemně od sebe nelišily. Současně v součtech jejich exprese došlo k signifikantnímu poklesu ve všech typech expozice (CIH, RCH a CCH) o 13%, 17% a 15% v uvedeném pořadí (viz. Přílohová část str. 77, graf 20a, tabulka 20b). V odpovídajících homogenátech byla změřena aktivita (není součástí práce), která naopak stoupla téměř na dvojnásobek ve všech

expozicích. To se dá vysvětlit tím, že CK je regulována na úrovni exprese, fosforylace pomocí AMPK (Ponticos et al. 1998) a ubiquitinylace (Zhao et al. 2007). Rostoucí aktivita tedy jednoznačně souvisí s útlumem fosforylace či degradace proteinu, o tom rozhodne WB analýza. Podstatné sdělení na úrovni mRNA je tedy, že exprese majoritních izoform v cytosolu a mitochondriích je v poměru CK M/mitoCKs velmi blízkém jedné, který jen mírně poklesl a je velmi stabilní ve všech expozičních hypoxie. Pokles exprese je tedy rovnoměrný u obou izoform (viz. Přílohová část str. 78, graf 21a, tabulka 21b). U obou izoform došlo k signifikantnímu poklesu u RCH. U CK M o 19,5% na hodnotu $82,796 \pm 8,009$ a u mitoCKs o cca 17% ($77,96 \pm 5,079$). Tyto nálezy mohou nasvědčovat o stejně řízené transkripční aktivitě u genu pro CK M a mitoCKs. Zde bych si dovolila zmínit naše (ve výsledcích neuvedené nálezy) na všech adaptacích, kde je trend zvýšení transkripce u HK2 v RCH (viz. Přílohová část str. 76, graf 19a, tabulka 19b) na hranici signifikance, který jde proti snížení mitoCKs. To by v ohledu přímé dodávky ADP do mitochondrií při asociaci s ANT mohlo svědčit o funkčním spojení, tedy vzájemném zastoupení, těchto dvou enzymů. Tyto nálezy je však nutné studovat na proteinové úrovni a v prostorovém kontextu jeho působení v buňce, zvláště pak asociace HK2 s vnější mitochondriální membránou (Wilson 2003).

Podíváme-li se na poměr průměrů dvou cytosolických izoform CK M a CK B dosahuje v normoxii hodnoty 48 (položeno 100%), v CIH a RCH dochází k jeho o růstu 70% a 60% v uvedeném pořadí. V CCH poměr průměrů klesá o 14% pod normoxickou hodnotu (viz. Přílohová část str. 79, graf 22a, tabulka 22b). Tato skutečnost přivádí pozornost na úlohu CK B izoformy, která je dominantním genem v embryonálním srdci a její exprese je snížena v dospělosti na dobře detekovatelnou úroveň. Exprese je indukována v dospělosti v případě patologických stimulů, jako je ischemie, hypertofie a srdeční selhání (pro přehled Ventura-Clapier et al. 2004). V naší práci však k indukci exprese nedochází a k růstu poměru naopak dochází jejím poklesem v RCH a CIH. V CCH, kde je prokázána kardioprotekce se neliší od normoxie (viz. Přílohová část str. 75, graf 18a, tabulka 18b).

7. Závěr

Závěrem lze říci, že:

1. Byla zavedena metoda izolace mRNA ze srdeční tkáně včetně vhodného čištění mRNA.
2. Byly navrženy optimální primery pro 20 genů
3. Byly změřeny hladiny mRNA vybraných genů ve třech typech adaptace na chronickou hypoxii a rozděleny do tří skupin podle své fyziologické úlohy. Měření přinesla tyto nálezy:

i) HIF1 α snižuje svoji expresi pouze v adaptaci na RCH podle Z výsledků dále vyplývá, že jeho regulace v hypoxii obecně by mohla být ovlivněna převážně cestou FIH, jehož exprese poklesla ve všech adaptacích. V CCH došlo též k poklesu u PHD1. PHD3 na úrovni mRNA neprokázala žádné změny na těchto modelech.

ii) U oxidačních a antioxidačních systémů naše výsledky ukázali největší změny v expresi mRNA u CAT, a to dvojnásobným zvýšením exprese v CCH. Podobný trend již nenastal u žádného z antioxidačních enzymů a naopak došlo ke snížení exprese v RCH a CCH u SOD Mn a GSR.

iii) Izoformy kreatin kinázy vykazaly změny v expresi u všech zástupců, kromě mitoCKu, jejíž hladina se blíží nule. RCH významně snížila expresi všech tří izoform, přičemž u CK B došlo navíc k signifikantnímu poklesu v CIH.

Expresce ostatních sledovaných mRNA se nezměnily, což svědčí o tom, že kontinuální chronická adaptace na hypoxii vytváří rovnovážný stav, kdy se již hladina na úrovni proteinu dynamicky nemění a dochází tak k vyváženým podmínkám aktivace exprese a odbourávání proteinu.

8. Přílohová část

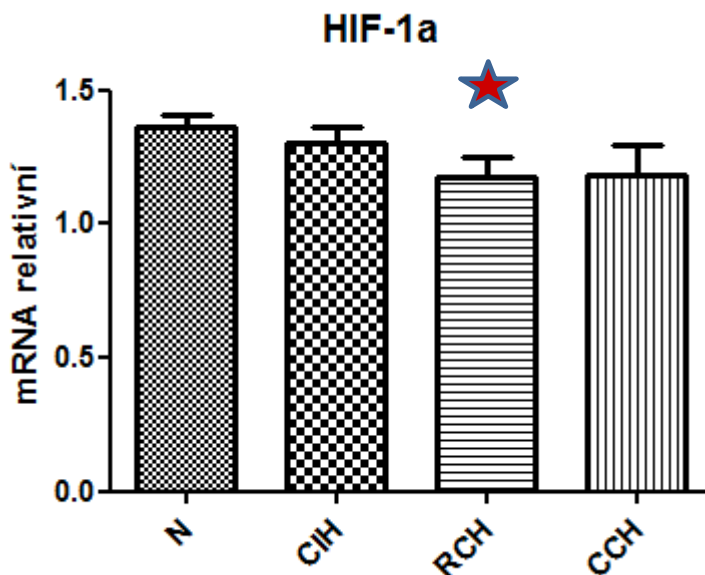
V příloze jsou uvedeny grafy a tabulky pro čtyři experimentální stavy :

N normoxie

CIH chronická intermitentní hypoxie

RCH chronická hypoxie s 1-hodinovou reoxygenací

CCH kontinuální chronická hypoxie

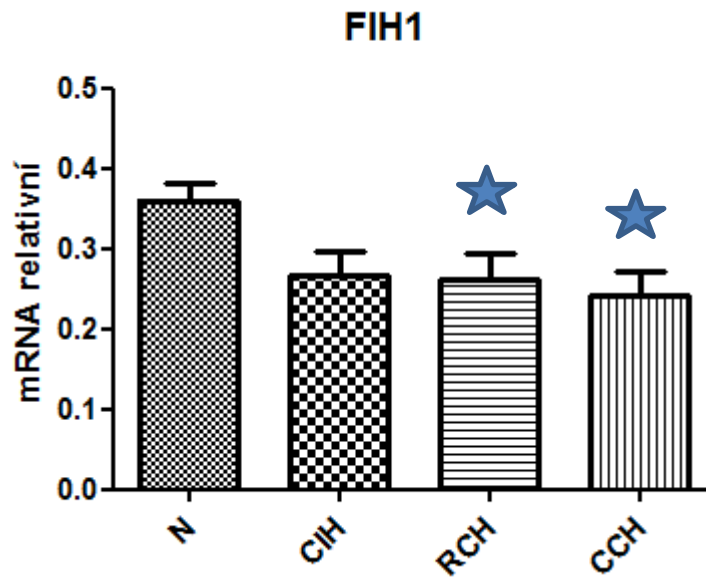


Graf č. 1a : Relativní hladiny mRNA v LV potkana genu HIF-1 α (★ p=0,06).

Tab č. 1b : Relativní hodnoty mRNA v jednotlivých experimentálních skupinách.

N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

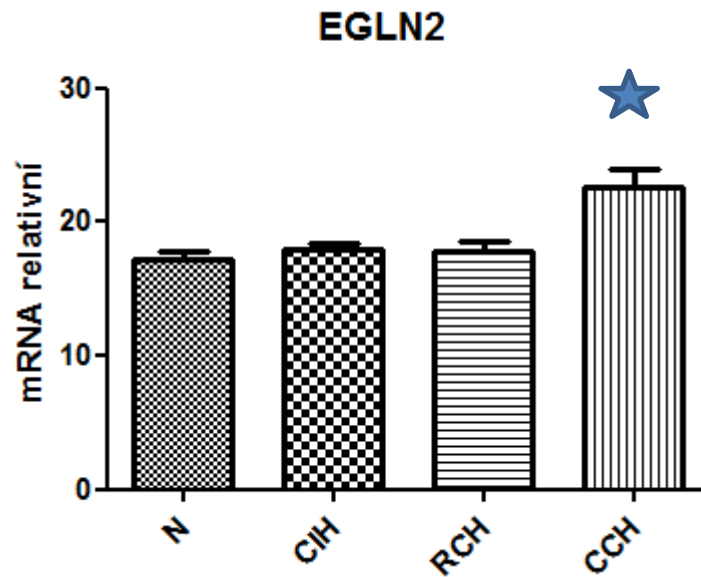
EXP	HIF-1 α			
	N	CIH	RCH	CCH
	1,3	1,51	1,44	1,36
	1,31	1,34	1,06	1,23
	1,46	1,23	1,02	1,44
	1,48	1,16	1,11	1,07
	1,27	1,26	1,23	0,8
PRUM	1,364	1,3	1,172	1,18
SMODCH	0,088	0,120	0,151	0,228



Graf č. 2a : Relativní hladiny mRNA v LV potkana genu FIH1 (★ $p < 0,05$).

Tab č. 2b : Relativní hodnoty mRNA v jednotlivých experimentálních skupinách.
N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

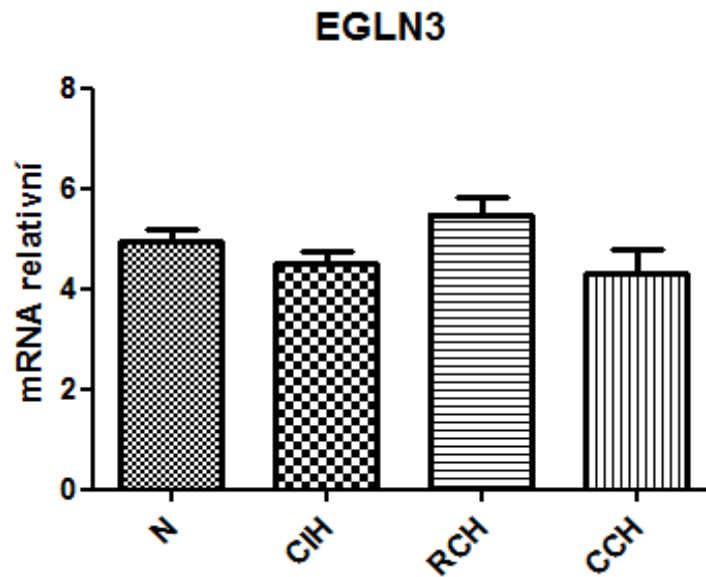
EXP	FIH1			
	N	CIH	RCH	CCH
	0,34	0,27	0,26	0,25
	0,30	0,27	0,16	0,32
	0,40	0,35	0,30	0,22
	0,34	0,23	0,24	0,18
	0,42	0,22	0,31	0,22
PRUM	0,360	0,268	0,254	0,2425
SMODCH	0,044	0,046	0,054	0,051



Graf č. 3a : Relativní hladiny mRNA v LV potkana genu EGLN2 (★ $p < 0,05$).

Tab č. 3b : Relativní hodnoty mRNA v jednotlivých experimentálních skupinách.
N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

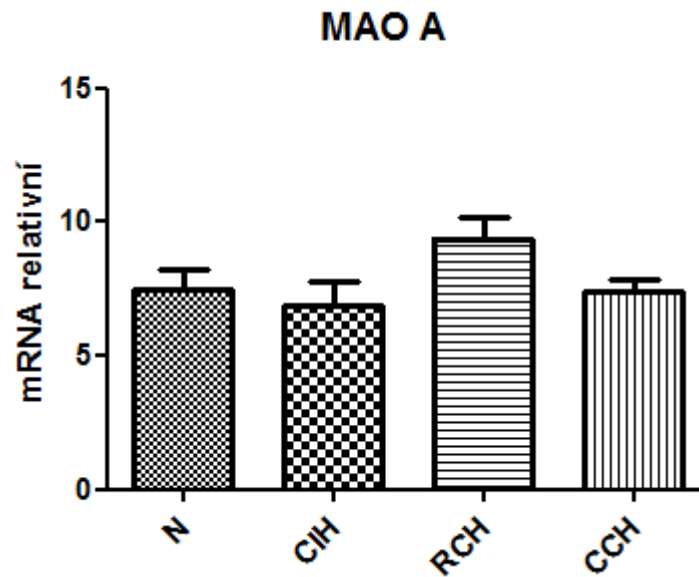
EXP	EGLN2			
	N	CIH	RCH	CCH
	17,59	19,2	19,03	21,47
	18,6	16,85	15,7	23,35
	15,15	17,08	15,95	20,68
	17,47	17,29	18,87	19,64
	17,28	19,24	19,16	27,49
PRUM	17,218	17,932	17,742	22,526
SMODCH	1,131	1,061	1,570	2,763



Graf č. 4a : Relativní hladiny mRNA v LV potkana genu EGLN3 (★ $p < 0,05$).

Tab č. 4b : Relativní hodnoty mRNA v jednotlivých experimentálních skupinách.
N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

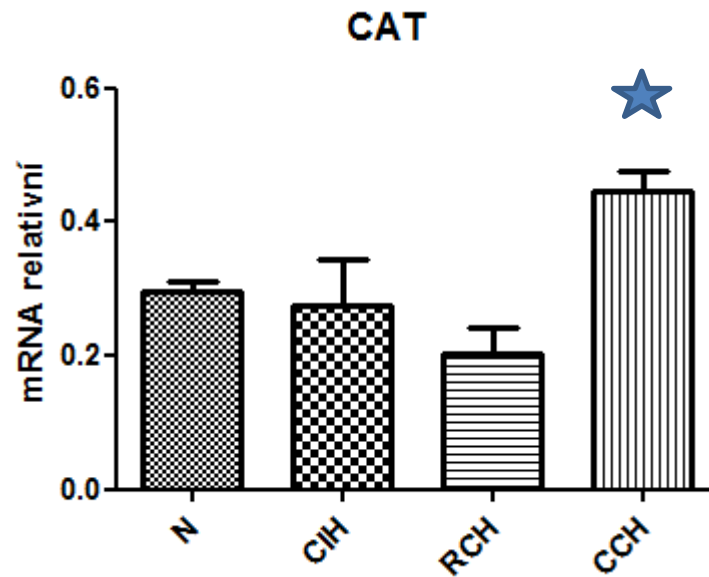
EXP	EGLN3			
	N	CIH	RCH	CCH
	4,71	5,44	5,76	4,75
	4,79	4,41	4,55	4,75
	5,78	3,93	4,72	5,4
	5,14	4,58	6,15	3,96
	4,32	4,08	6,25	2,6
PRUM	4,948	4,488	5,486	4,292
SMODCH	0,491	0,529	0,716	0,961



Graf č. 5a : Relativní hladiny mRNA v LV potkana genu MAO A (★ $p < 0,05$).

Tab č. 5b : Relativní hodnoty mRNA v jednotlivých experimentálních skupinách.
N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

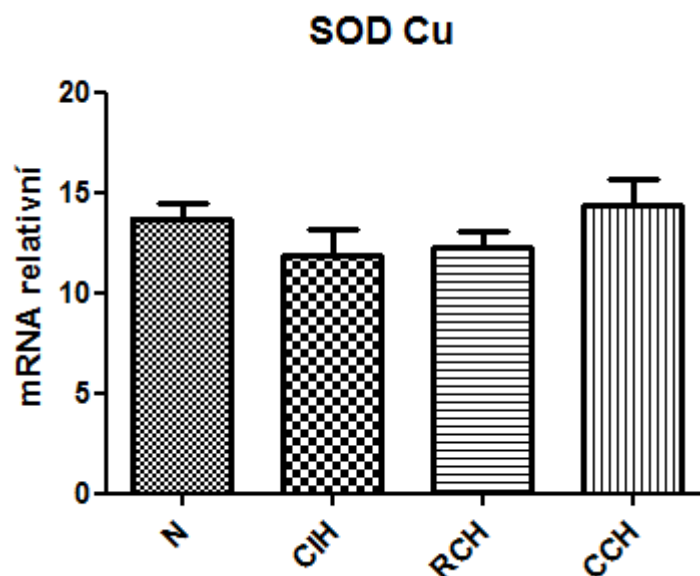
EXP	MAO A			
	N	CIH	RCH	CCH
	8,45	5,25	7,69	7,16
	5,23	5,49	10,59	6,11
	9,07	5,62	7,17	7,78
	8,47	8,1	10,62	8,96
	6,04	9,79	10,83	7,04
PRUM	7,452	6,85	9,38	7,41
SMODCH	1,522	1,796	1,603	0,941



Graf č. 6a : Relativní hladiny mRNA v LV potkana genu CAT (★ $p < 0,05$).

Tab č. 6b : Relativní hodnoty mRNA v jednotlivých experimentálních skupinách.
N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

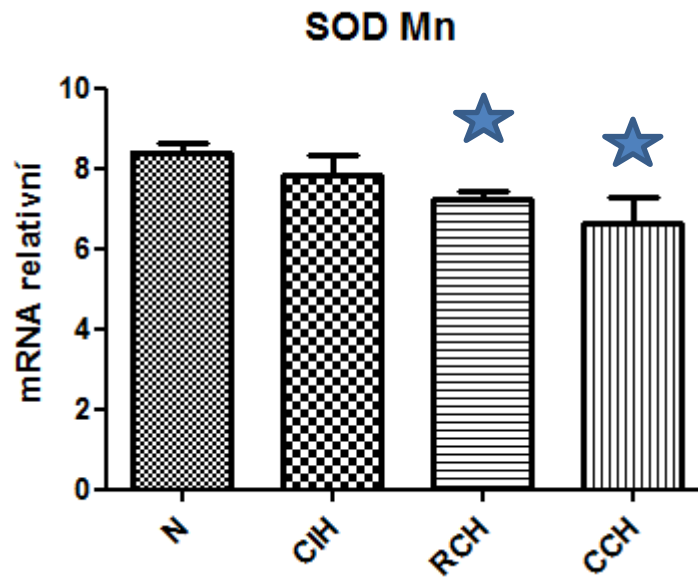
EXP	CAT			
	N	CIH	RCH	CCH
	0,26	0,22	0,20	0,44
	0,32	0,15	0,31	0,51
	0,33	0,14	0,21	0,49
	0,3	0,4	0,14	0,39
	0,27	0,47	0,15	0,39
PRUM	0,296	0,276	0,202	0,444
SMODCH	0,027	0,135	0,060	0,050



Graf č. 7a : Relativní hladiny mRNA v LV potkana genu SOD Cu (★ p<0,05).

Tab č. 7b : Relativní hodnoty mRNA v jednotlivých experimentálních skupinách.
N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

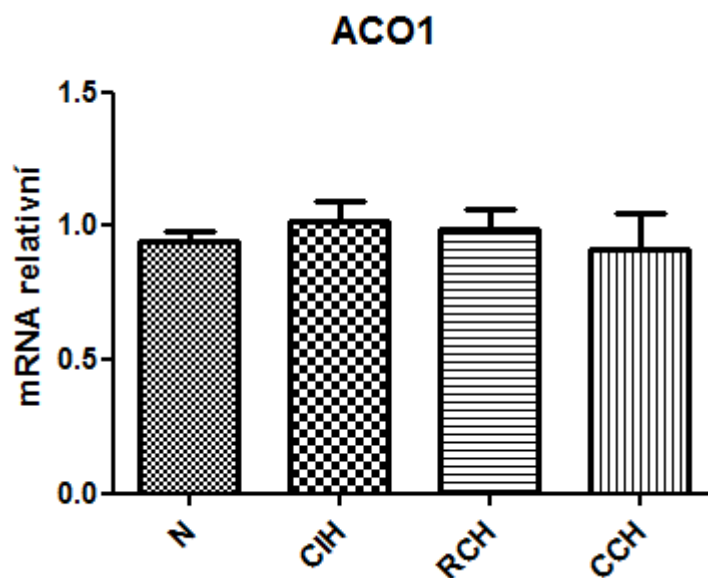
EXP	SOD Cu			
	N	CIH	RCH	CCH
	13,9	16,71	12,4	12,8
	13,35	11,34	14,88	16,68
	12	11,31	10,26	13,96
	12,84	10,4	11,13	10,65
	16,49	9,81	12,61	17,72
PRUM	13,716	11,914	12,256	14,362
SMODCH	1,522	2,466	1,567	2,570



Graf č. 8a : Relativní hladiny mRNA v LV potkana genu SOD Mn (★ $p < 0,05$).

Tab č. 8b : Relativní hodnoty mRNA v jednotlivých experimentálních skupinách.
N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

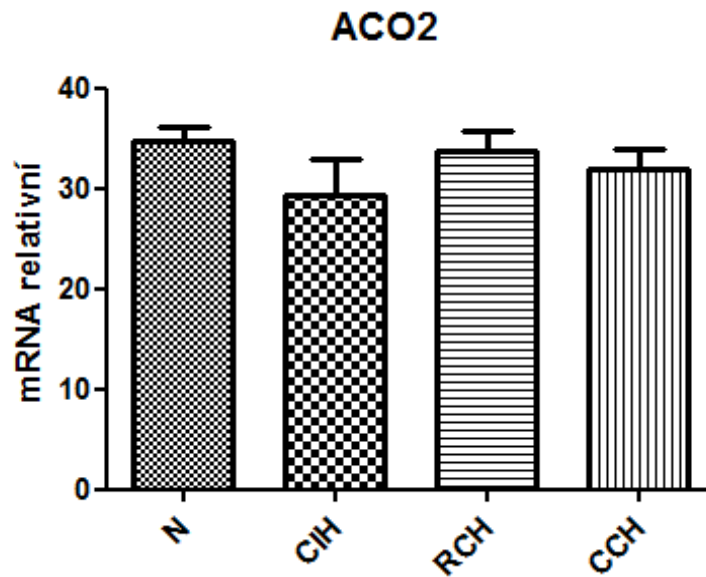
EXP	SOD Mn			
	N	CIH	RCH	CCH
	8,25	9,81	7,9	6,62
	7,98	7,6	6,91	7,94
	8,1	7,08	6,78	8,04
	8,56	7,55	7,19	5,85
	9,15	7,11	7,31	4,65
PRUM	8,408	7,83	7,218	6,62
SMODCH	0,419	1,013	0,390	1,283



Graf č. 9a : Relativní hladiny mRNA v LV potkana genu ACO1 (★ p<0,05).

Tab č. 9b : Relativní hodnoty mRNA v jednotlivých experimentálních skupinách.
N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

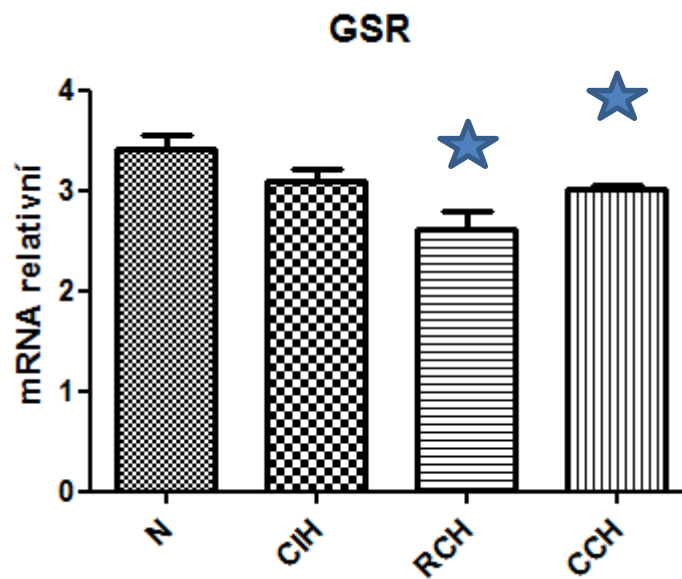
EXP	ACO1			
	N	CIH	RCH	CCH
	1,06	1,27	1,18	1,06
	0,91	0,89	0,72	1,01
	0,95	0,88	0,91	1,13
	0,94	1,1	1,07	0,99
	0,85	0,94	1,04	0,37
PRUM	0,942	1,016	0,984	0,912
SMODCH	0,069	0,149	0,158	0,275



Graf č. 10a : Relativní hladiny mRNA v LV potkana genu ACO2 (★ p<0,05).

Tab č. 10b : Relativní hodnoty mRNA v jednotlivých experimentálních skupinách.
N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

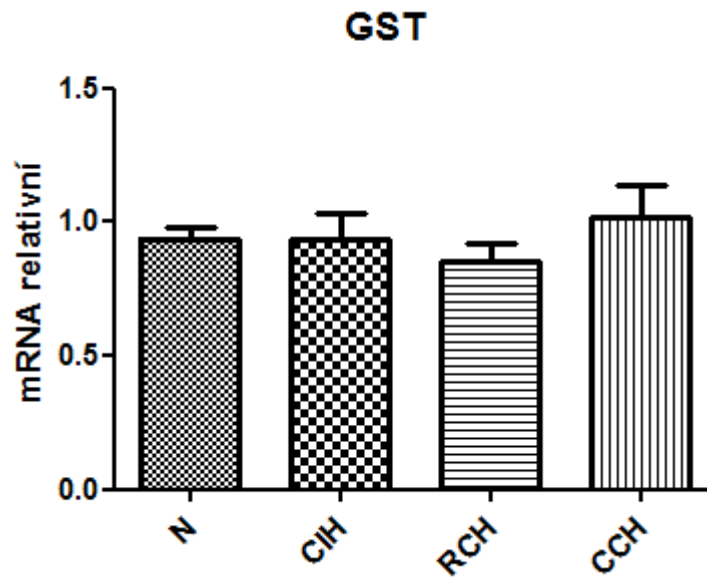
EXP	ACO2			
	N	CIH	RCH	CCH
	33,62	43,29	34,64	31,45
	31,36	26,90	26,22	35,94
	35,13	20,72	33,67	33,72
	39,88	37,50	37,51	26,27
	33,86	32,29	36,73	31,80
PRUM	34,77	32,14	33,754	31,84
SMODCH	2,829	7,886	4,013	3,210



Graf č. 11a : Relativní hladiny mRNA v LV potkana genu GSR (★ p<0,05).

Tab č. 11b : Relativní hodnoty mRNA v jednotlivých experimentálních skupinách.
N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

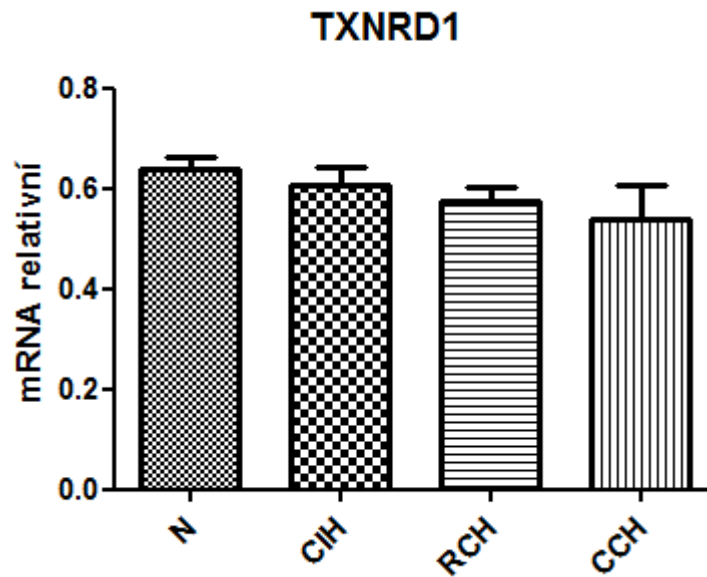
EXP	GSR			
	N	CIH	RCH	CCH
	3,68	2,99	2,62	2,94
	3,25	2,76	2,11	2,94
	3,3	3,21	2,74	3,17
	3,81	3,52	2,85	2,98
	3	2,96	2,76	3,01
PRUM	3,408	3,088	2,616	3,008
SMODCH	0,296	0,259	0,293	0,095



Graf č. 12a : Relativní hladiny mRNA v LV potkana genu GST (★ p<0,05).

Tab č. 12b : Relativní hodnoty mRNA v jednotlivých experimentálních skupinách.
N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

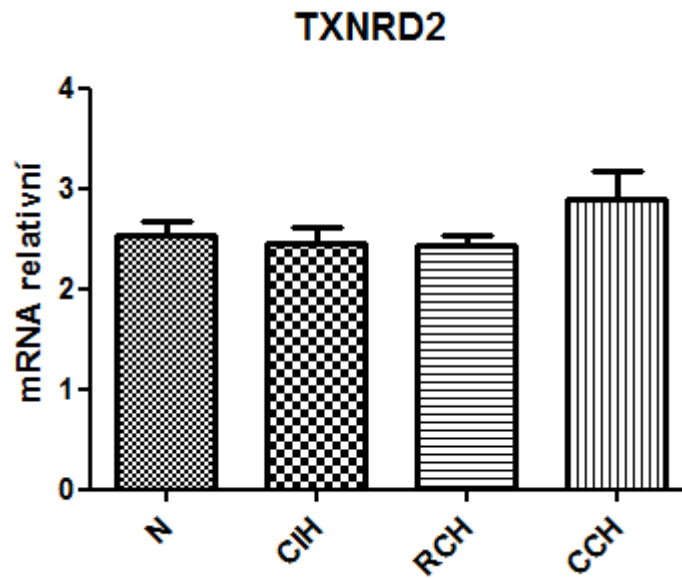
EXP	GST			
	N	CIH	RCH	CCH
	1,00	1,20	0,72	0,83
	0,98	1,04	0,88	1,47
	0,80	1,00	0,74	0,86
	0,89	0,79	1,07	1,04
	1,02	0,64	0,86	0,88
PRUM	0,938	0,934	0,854	1,016
SMODCH	0,082	0,197	0,125	0,238



Graf č. 13a : Relativní hladiny mRNA v LV potkana genu TXNRD1 (★ p<0,05).

Tab č. 13b : Relativní hodnoty mRNA v jednotlivých experimentálních skupinách.
N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

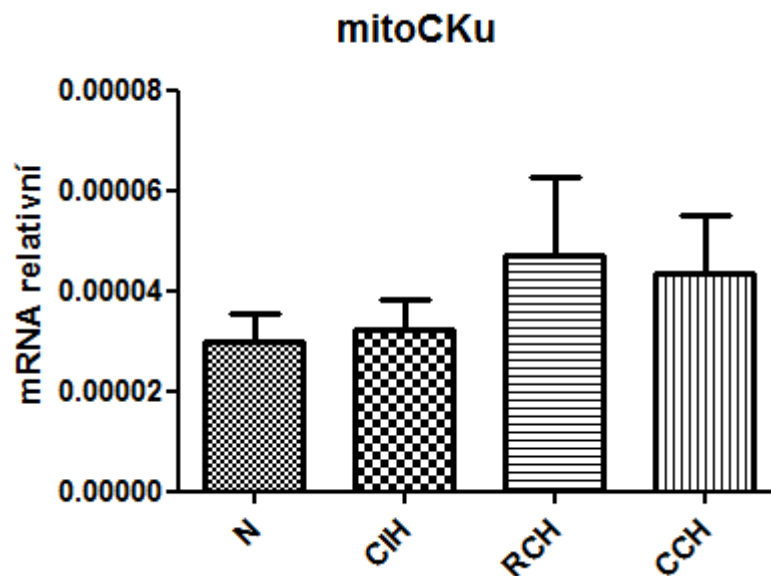
EXP	TXNRD 1			
	N	CIH	RCH	CCH
	0,66	0,73	0,64	0,63
	0,62	0,55	0,53	0,67
	0,59	0,55	0,52	0,61
	0,71	0,65	0,56	0,48
	0,62	0,55	0,63	0,30
PRUM	0,64	0,606	0,576	0,538
SMODCH	0,041	0,073	0,050	0,135



Graf č. 14a : Relativní hladiny mRNA v LV potkana genu TXNRD2 (★ $p < 0,05$).

Tab č. 14b : Relativní hodnoty mRNA v jednotlivých experimentálních skupinách.
 N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

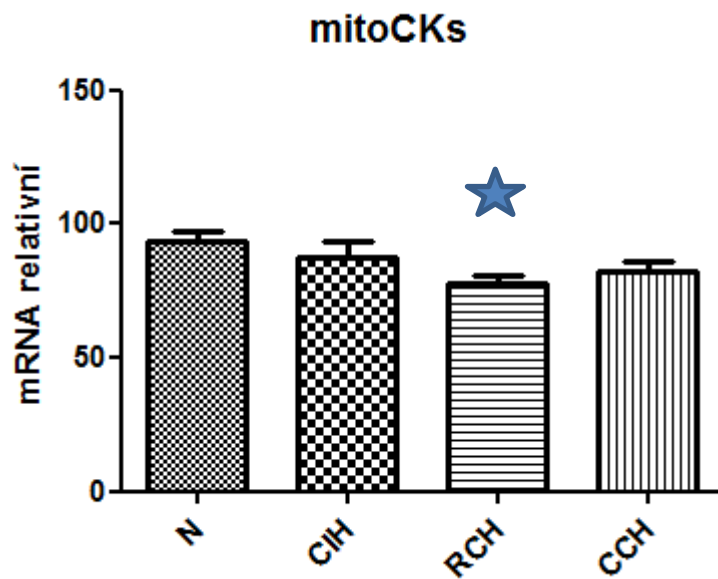
EXP	TXNRD 2			
	N	CIH	RCH	CCH
	2,42	3,08	2,54	2,53
	2,25	2,32	2,66	2,93
	2,43	2,19	2,16	2,44
	2,40	2,34	2,23	3,67
	3,13	2,34	2,58	2,63
PRUM	2,526	2,454	2,434	2,893
SMODCH	0,309	0,318	0,200	0,485



Graf č. 15a : Relativní hladiny mRNA v LV potkana genu mitoCKu (★ $p < 0,05$).

Tab č. 15b : Relativní hodnoty mRNA v jednotlivých experimentálních skupinách.
N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

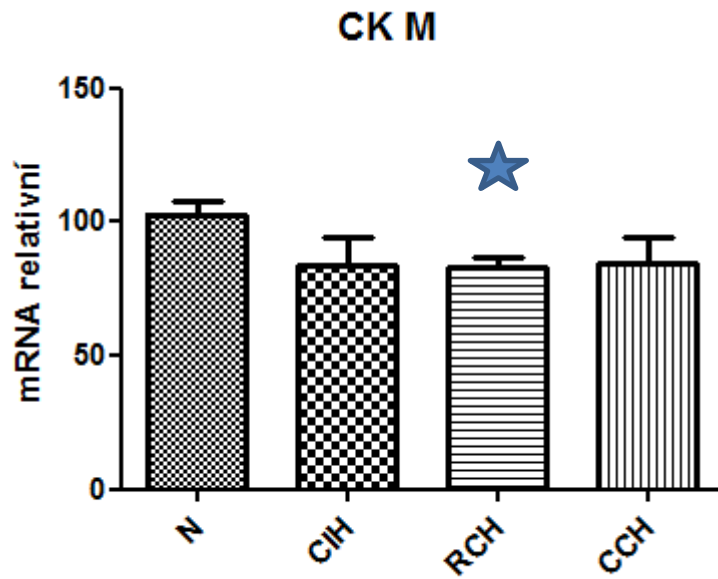
EXP	mitoCKu			
	N	CIH	RCH	CCH
	0,000029	0,000054	0,000029	0,000016
	0,000028	0,000029	0,000107	0,000082
	0,000029	0,000019	0,000041	0,000049
	0,000017	0,000032	0,000041	0,000048
	0,000045	0,000028	0,000017	0,000022
PRUM	0,0000298	0,0000324	0,000047	0,0000434
SMODCH	0,00001	0,00001	0,00003	0,00002



Graf č. 16a : Relativní hladiny mRNA v LV potkana genu mitoCKs (★ $p < 0,05$).

Tab č. 16b : Relativní hodnoty mRNA v jednotlivých experimentálních skupinách.
N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

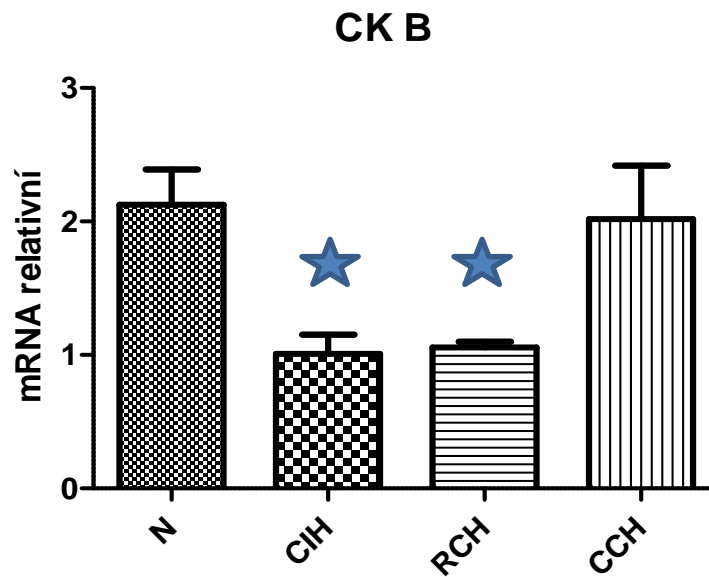
EXP	mitoCKs			
	N	CIH	RCH	CCH
	87,22	108,67	80,47	76,24
	98,58	87,20	83,46	96,61
	86,89	87,22	68,47	80,80
	101,06	84,04	77,91	70,46
	93,43	72,09	79,50	85,37
PRUM	93,44	87,84	77,96	81,90
SMODCH	6,444	11,808	5,079	8,861



Graf č. 17a : Relativní hladiny mRNA v LV potkana genu CK M (★ $p < 0,05$).

Tab č. 17b : Relativní hodnoty mRNA v jednotlivých experimentálních skupinách.
N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

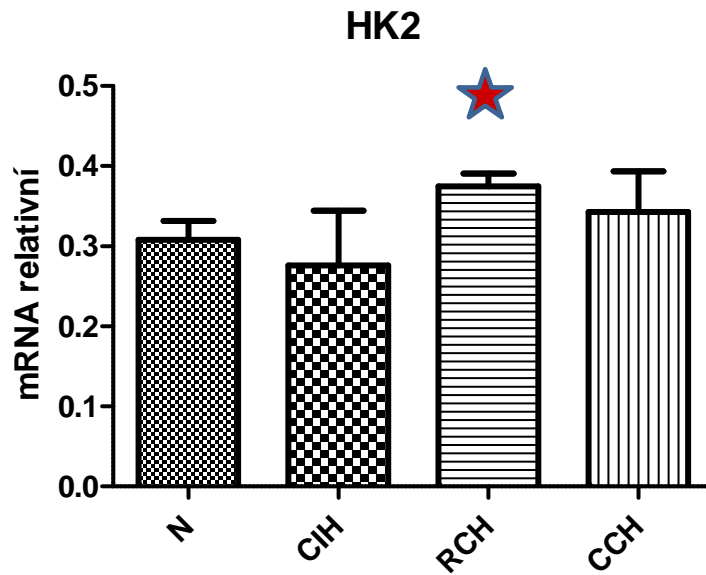
EXP	CK M			
	N	CIH	RCH	CCH
	119,23	103,10	95,24	60,47
	102,04	66,46	80,42	108,25
	99,24	53,43	83,27	101,50
	89,72	103,51	84,75	91,41
	103,80	92,35	70,30	59,02
PRUM	102,81	83,77	82,796	84,13
SMODCH	9,542	20,283	8,009	20,624



Graf č. 18a : Relativní hladiny mRNA v LV potkana genu CK B (★ $p < 0,05$).

Tab č. 18b : Relativní hodnoty mRNA v jednotlivých experimentálních skupinách.
N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

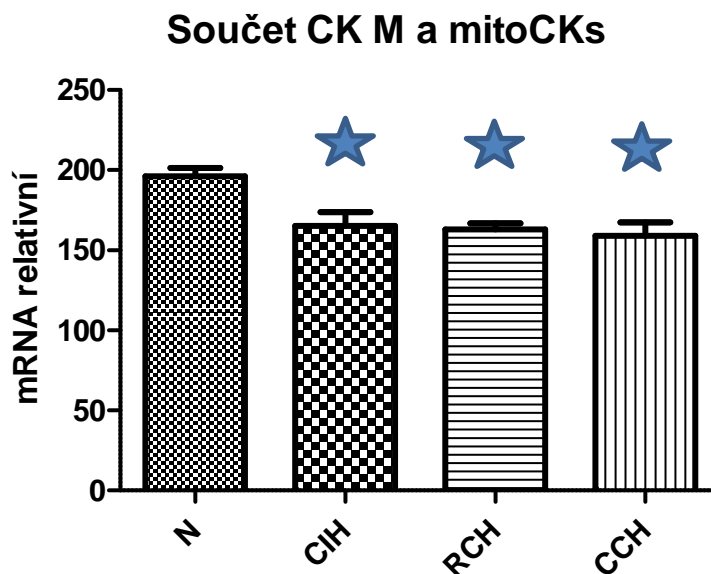
EXP	CK B			
	N	CIH	RCH	CCH
	2,88	1,48	1,10	1,05
	2,00	0,83	1,01	2,39
	1,62	0,60	1,04	2,78
	2,00	1,06	1,14	1,07
	2,126	1,07	0,99	2,81
PRUM	2,125	1,008	1,057	2,02
SMODCH	0,414	0,292	0,062	0,798



Graf č. 19a : Relativní hladiny mRNA v LV potkana genu HK2 (★ p=0,06).

Tab č. 19b : Relativní hodnoty mRNA v jednotlivých experimentálních skupinách.
N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

EXP	HK2			
	N	CIH	RCH	CCH
	0,27	0,44	0,38	0,34
	0,25	0,13	0,41	0,40
	0,30	0,11	0,36	0,43
	0,38	0,41	0,34	0,20
	0,34	0,29	0,39	0,34
PRUM	0,308	0,276	0,376	0,342
SMODCH	0,047	0,137	0,024	0,079



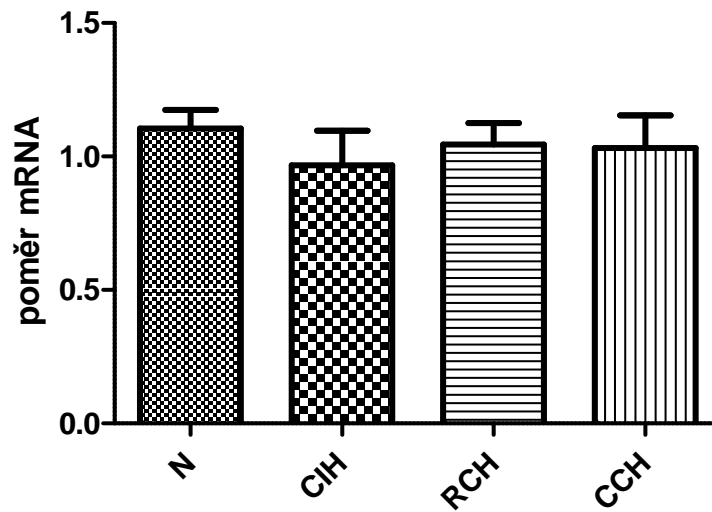
Graf č. 20a : Suma relativních hodnot mRNA majoritních izoforem CK M a mitoCKs (★ p< 0,05)

Tab č. 20b : Suma relativních hodnoty mRNA CK M a mitoCKs.

N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

EXP	SUMA CK M a mitoCKs			
	N	CIH	RCH	CCH
	206,45	180,5	175,71	136,71
	200,62	153,66	163,88	170,2
	200,3	140,65	151,74	182,3
	176,61	187,55	162,66	161,87
	197,23	164,44	160,77	144,39
PRUM	196,242	165,36	162,952	159,094
SMODCH	10,259	17,146	7,671	16,654

Poměr izoforem CK M a mitoCKs

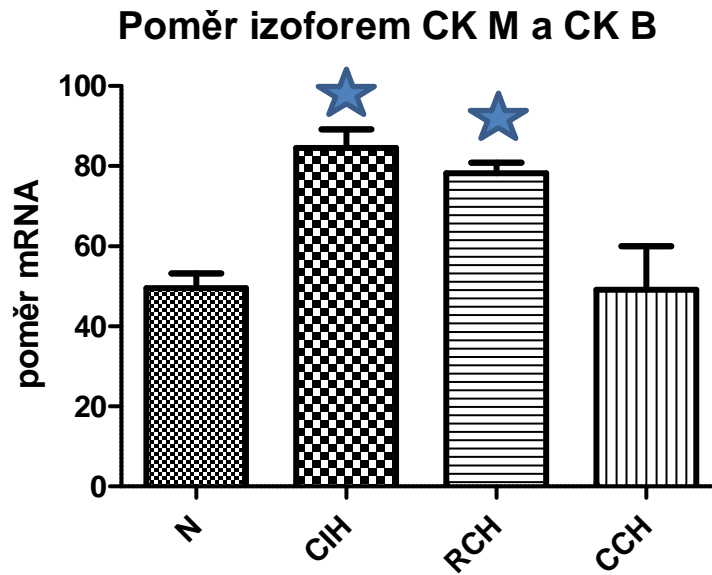


Graf č. 21a : Poměr relativních hodnot mRNA majoritních izoforem CK M a mitoCKs (★ $p < 0,05$)

Tab č. 21b : Poměr relativní hodnoty mRNA CK M a mitoCKs.

N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

EXP	POMĚR CK M a mitoCKs			
	N	CIH	RCH	CCH
	1,367	0,949	1,184	0,793
	1,035	0,762	0,964	1,120
	0,982	0,613	1,216	1,256
	1,033	1,232	1,088	1,297
	1,111	1,281	0,777	0,691
PRUM	1,106	0,967	1,046	1,032
SMODCH	0,137	0,259	0,160	0,246

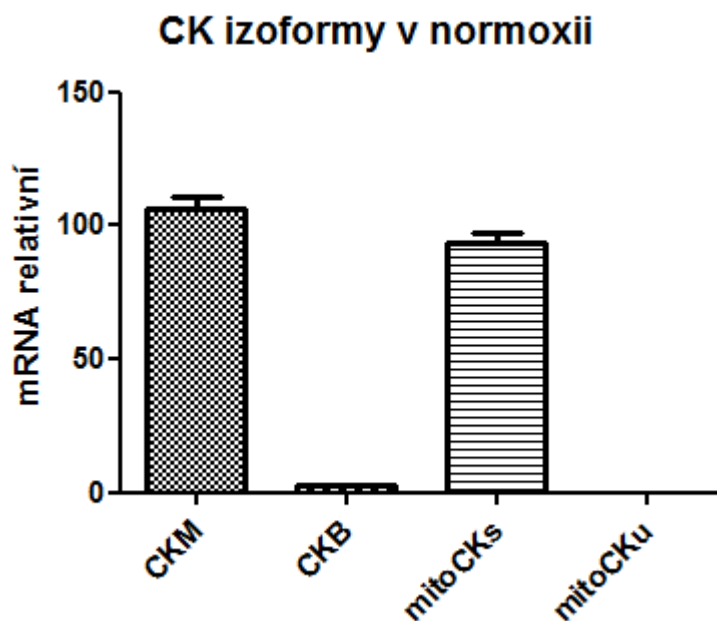


Graf č. 22a : Poměr relativních hodnot mRNA cytosolických izoforem CK M a CK B (★ < 0,05).

Tab č. 22b : Poměr relativní hodnoty mRNA CK M a CK B.

N-normoxie, CIH-chronická intermitentní hypoxie, RCH- chronická hypoxie s reoxygenací, CCH - kontinuální chronická hypoxie

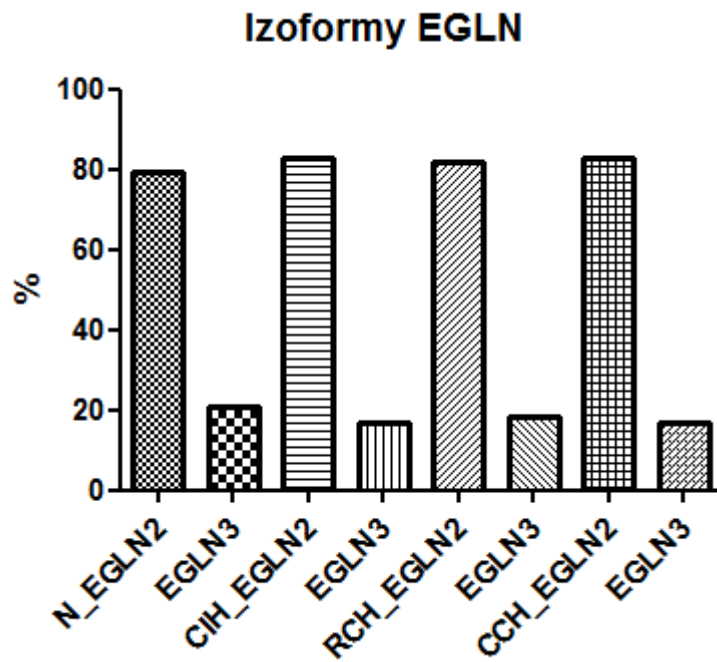
EXP	POMĚR CK M a CK B			
	N	CIH	RCH	CCH
	41,399	69,662	86,190	57,590
	51,020	80,072	79,624	45,293
	61,259	89,050	80,067	36,511
	42,201	97,651	74,342	85,430
	51,900	86,308	71,010	21,004
PRUM	49,556	84,549	78,247	49,166
SMODCH	7,283	9,345	5,214	21,699



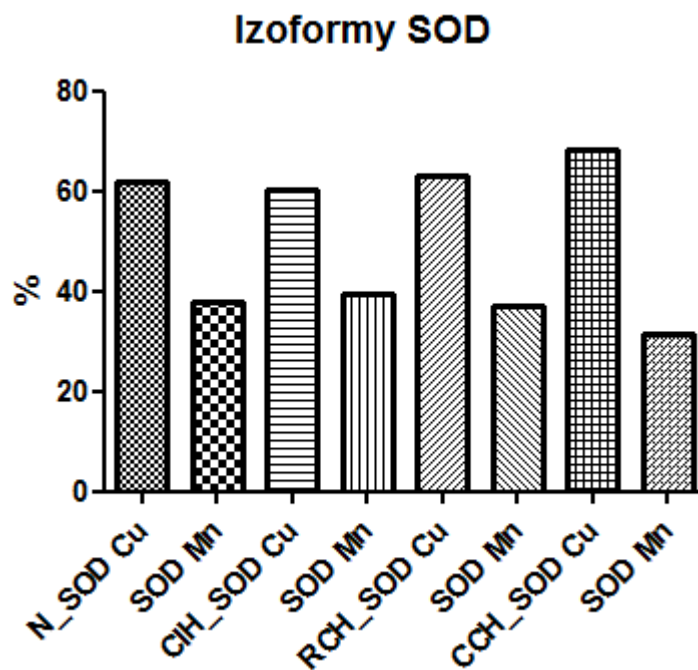
Graf č. 23a : Porovnání relativních hodnot mRNA izoforem CK v normoxii (\star $< 0,05$).

Tab č. 23b : Relativní hodnoty mRNA izoforem CK v normoxii.

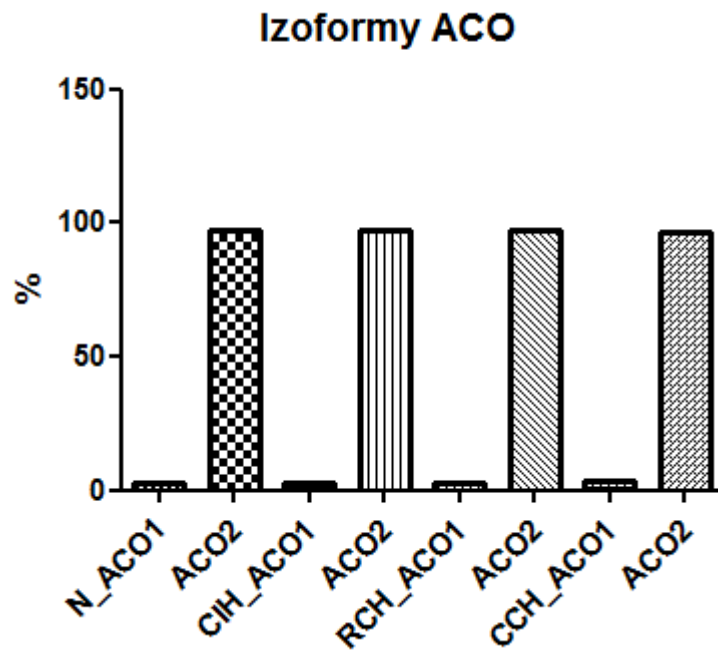
EXP	normoxie			
	CK M	CK B	mitoCKs	mitoCKu
	119,23	2,88	87,22	0,000029
	102,04	2,00	98,58	0,000028
	99,24	1,62	86,89	0,000029
	89,72	2,00	101,06	0,000017
	103,80	2,13	93,43	0,000045
PRUM	102,806	2,125	93,436	0,000030
SMODCH	9,542	0,414	5,763	0,00001



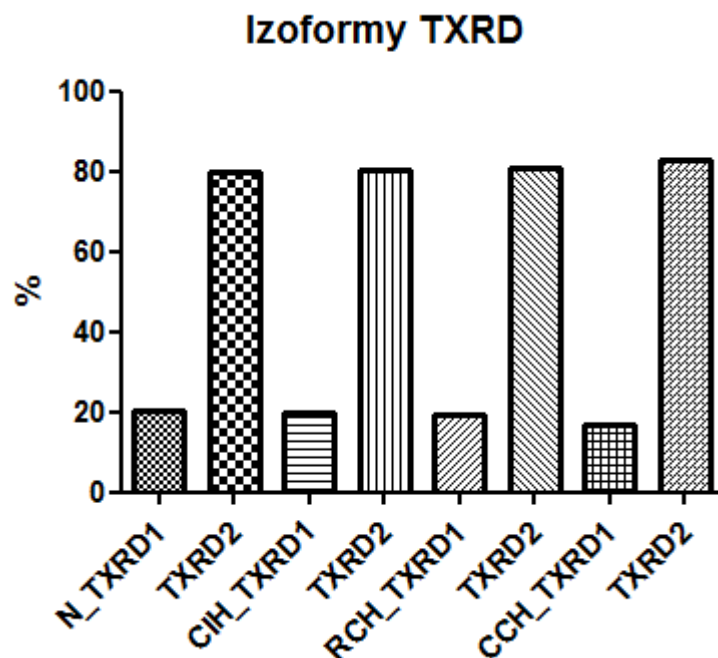
Graf č. 24 : Porovnání průměrů hodnot mRNA izoforem EGLN2 a EGLN3 ve všech expozičních (★ < 0,05).



Graf č. 25 : Porovnání průměrů hodnot mRNA izoforem SOD Cu a SOD Mn ve všech expozičních (★ < 0,05).



Graf č. 26 : Porovnání průměrů hodnot mRNA izoforem ACO1 a ACO2 ve všech expozicích (★ < 0,05).



Graf č. 27 : Porovnání průměrů hodnot mRNA izoforem TXRD1 a TXRD2 ve všech expozicích (★ < 0,05).

Tab. č. 24 : Tělesné hmotnosti a hmotnosti srdcí jednotlivých zvířat.

Sample		BW [g]	HW [g]
chronic hypoxia			
	N1	330	0,831
	N2	320	0,776
	N3	280	0,642
	N4	292	0,732
	N5	316	0,804
10% O2	CIH1	323	0,789
	CIH2	306	0,752
	CIH3	290	0,720
	CIH4	262	0,615
	CIH5	281	0,695
	RCH1	271	0,629
	RCH2	282	0,739
	RCH3	272	0,698
	RCH4	285	0,772
	RCH5	291	0,665
	CCH1	293	0,790
	CCH2	293	0,759
	CCH3	342	0,862
	CCH4	298	0,722
	CCH5	305	0,827

BW tělesná hmotnost (body weight)

HW hmotnost srdce potkana (heart weight)

N normoxie

CIH chronická intermitentí hypoxie

RCH chronická hypoxie s 1-hodinovou reoxygenací

CCH kontinuální chronická hypoxie

Tab. č. 25 : Hmotnosti jednotlivých částí srdce.

Sample		LV [mg]	RV [mg]	S [mg]	LV PCR [mg]
chronic hypoxia					
	N1	470	175	186	104
	N2	440	161	175	75
	N3	330	137	175	47
	N4	425	145	162	123
	N5	466	168	170	85
10% O2	CIH1	420	176	193	190
	CIH2	451	160	141	105
	CIH3	420	156	144	100
	CIH4	316	137	162	77
	CIH5	389	150	156	89
	RCH1	340	138	151	80
	RCH2	392	195	152	83
	RCH3	402	157	139	85
	RCH4	444	203	125	99
	RCH5	354	165	146	77
	CCH1	365	229	196	89
	CCH2	383	206	170	99
	CCH3	452	233	177	96
	CCH4	387	193	142	84
	CCH5	380	249	198	93

LV levá komora
RV pravá komora
S septum

N normoxie
CIH chronická intermitentní hypoxie
RCH chronická hypoxie s 1-hodinovou reoxygenací
CCH kontinuální chronická hypoxie

Tab. č. 26 : Chronická expozice (první odběr levé komory LV) koncentrace a kvalita RNA před a po čištění. Tabulka dokumentuje rutinní zvládnutí purifikace mRNA.

Sample	LV PCR [mg]	RNA před čištěním [μg/μl]	260/280 před čištěním	260/230 před čištěním	RNA* po čištěním [μg/μl]	260/280 po čištění	260/230 po čištění
21.	104	0,560	2,27	1,75	0,203	2,36	1,73
22.	75	0,360	2,07	1,90	0,204	2,02	1,82
23.	47	0,490	2,21	2,12	0,192	2,03	2,00
24.	123	0,550	2,17	2,15	0,187	2,06	1,94
25.	85	0,470	2,09	2,24	0,185	2,12	2,31
26.	190	0,200	2,01	1,58	0,087	2,03	1,94
27.	105	0,420	2,32	1,93	0,188	2,32	1,86
28.	100	0,510	2,18	1,92	0,194	2,11	1,76
29.	77	0,430	2,15	1,34	0,199	2,04	1,26
30.	89	0,360	2,13	1,78	0,179	2,34	1,73
31.	80	0,480	2,13	1,65	0,213	2,09	1,67
32.	83	0,250	1,90	1,00	0,089	2,63	1,71
33.	85	0,260	2,13	1,50	0,172	2,21	1,39
34.	99	0,710	2,18	1,96	0,199	2,21	1,88
35.	77	0,480	2,16	1,57	0,191	1,76	1,49
36.	89	0,470	2,20	1,60	0,181	2,48	1,60
37.	99	0,400	2,13	1,41	0,087	1,97	1,97
38.	96	0,620	2,05	1,65	0,175	2,33	1,62
39.	84	0,380	2,22	1,23	0,188	2,14	1,20
40.	93	0,250	2,13	0,67	0,020	1,17	1,13

* na čištění byla nanáška RNA 10 μg

Tab. č. 27 : Názvy a sekvence primeru a sond navržených pro Real Time RT PCR.

	název	sekvence (5' > 3')	proba číslo
	primeru		(UPL)
DNA	xCAT_L	cagcgaccagatgaagca	12
DNA	xCAT_R	ggtcaggacatcgggttc	
DNA	xCKM_L	ccgcagcatcaagggtta	16
DNA	xCKM_R	cccgtcaggctgtgaga	
DNA	xCKB_L	ccacttccttcgacaagc	84
DNA	xCKB_R	ggaacgtctattgtcattgtgc	
DNA	xCKU1_L	gcacaccactgacctgatg	129
DNA	xCKU1_R	aggctggaggagactgag	
DNA	xCKS_L	gccacccttcattaagactg	83
DNA	xCKS_R	caaaaaggcagcaaacct	
DNA	xGSR_L	ttcctcatgagaaccagatcc	64
DNA	xGSR_R	tgaaagaaccatcactggta	
DNA	xGSTO1_L	aagctgccagaagatgacc	126
DNA	xGSTO1_R	ctcttcgccctaataaaactcg	
DNA	xTXNRD1_L	agcaccattggcatccac	71
DNA	xTXNRD1_R	ccacactggggcttaacct	
DNA	xTXNRD2_L	gcacatggtgaagctacctaga	97
DNA	xTXNRD2_R	gctccatccacatcttctcag	
DNA	xMAOA_L	tggtatcatgaccagatgga	20
DNA	xMAOA_R	tgtgcctgcaaagtaaatcct	
DNA	xSODCu_L	taagaacatggcggcca	5
DNA	xSODCu_R	tggacacattggccacac	
DNA	xSODMn_L	tggacaaacctgagccctaa	67
DNA	xSODMn_R	gaccxaaagtcacgctgata	
DNA	xACO1_L	ttgctgtgtctgagattgaaaag	125
DNA	xACO1_R	cttgaaaacctttaatccttgct	
DNA	xACO2_L	cgcttacagcctactggtc	81
DNA	xACO2_R	ggcagaggccacatgga	

DNA	HIF1a_L	catgatggctcccttttca	18
DNA	HIF1a_R	acatagtaggggcacggtca	
DNA	xHIF1AN_L	tgagaaactacaagctatccagca	7
DNA	xHIF1AN_R	cggtgtcattgagtgtttgc	
DNA	xEGLN2_L	cagcctatgccaccaggta	66
DNA	xEGLN2_R	tgtcccgatgctagctgata	
DNA	xEGLN3_L	acgccatgactgtctggact	29
DNA	xEGLN3_R	gcaagagcagattcagttttct	
DNA	xGPDH3_L	cccctctggaagctgtg	43
DNA	xGPDH3_R	ggatgcagggatgatgttct	
DNA	xHK2_L	ccagcagaacagcctagacc	101
DNA	xHK2_R	agatgccttgaatcccttg	

9. Internetové zdroje

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

<http://www.genecards.org/>

<http://www.uniprot.org/uniprot/>

10. Použitá literatura

- Ameyar, M., Wisniewska, M. & Weitzman, J.B., 2003. A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie*, 85(8), 747-752.
- Anflous, K. et al., 1997. Mitochondrial creatine kinase isoform expression does not correlate with its mode of action. *The Biochemical Journal*, 322 (Pt 1), 73-78.
- Aota, M. et al., 1996. Protection against reperfusion-induced arrhythmias by human thioredoxin. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 27(5), 727-732.
- Arnér, E.S., 1999. Superoxide production by dinitrophenyl-derivatized thioredoxin reductase--a model for the mechanism and correlation to immunostimulation by dinitrohalobenzenes. *BioFactors (Oxford, England)*, 10(2-3), 219-226.
- Arnér, E.S. & Holmgren, A., 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 267(20), 6102-6109.
- Arnér, E.S., Nordberg, J. & Holmgren, A., 1996. Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 225(1), 268-274.
- Arrigo, A.P., 1999. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(9-10), 936-944.
- Bao, W. et al., 2010. Chronic inhibition of hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase improves ventricular performance, remodeling, and vascularity after myocardial infarction in the rat. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 56(2), 147-155.
- Barra, D. et al., 1984. The primary structure of human liver manganese superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(20), 12595-12601.
- Beinert, H., Kennedy, M.C. & Stout, C.D., 1996. Aconitase as Ironminus signSulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein. *Chemical Reviews*, 96(7), 2335-2374.
- Bernhardt, W.M. et al., 2007. Organ protection by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Methods in Enzymology*, 435, 221-245.
- Brdiczka, D.G., Zorov, D.B. & Sheu, S., 2006. Mitochondrial contact sites: their role in energy metabolism and apoptosis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1762(2), 148-163.

- Brunner, H.G. et al., 1993. Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5133), 578-580.
- Buettner, G.R., 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300(2), 535-543.
- Bustin, S.A. et al., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem*, 55(4), 611-622.
- Cioffi, C.L. et al., 2003. Differential regulation of HIF-1 alpha prolyl-4-hydroxylase genes by hypoxia in human cardiovascular cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303(3), 947-953.
- Clerch, L.B., Iqbal, J. & Massaro, D., 1991. Perinatal rat lung catalase gene expression: influence of corticosteroid and hyperoxia. *The American Journal of Physiology*, 260(6 Pt 1), L428-433.
- Cramer, T. et al., 2003. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*, 112(5), 645-657.
- Crapo, J.D. et al., 1992. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(21), 10405-10409.
- Csonka, C. et al., 2000. Effects of oxidative stress on the expression of antioxidative defense enzymes in spontaneously hypertensive rat hearts. *Free Radical Biology & Medicine*, 29(7), 612-619.
- Culotta, V.C., Yang, M. & O'Halloran, T.V., 2006. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1763(7), 747-758.
- Damdimopoulos, A.E. et al., 2002. Human mitochondrial thioredoxin. Involvement in mitochondrial membrane potential and cell death. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(36), 33249-33257.
- Das, K.C., Guo, X.L. & White, C.W., 1999. Induction of thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in lungs of newborn primates by oxygen. *The American Journal of Physiology*, 276(3 Pt 1), L530-539.
- Davies, K.J., 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposium*, 61, 1-31.

- Di Lisa, F. et al., 2009. Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: the relevance of p66(Shc) and monoamine oxidase. *Basic Research in Cardiology*, 104(2), 131-139.
- Douglas, K.T., 1987. Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 59, 103-167.
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95.
- Dupuy, J. et al., 2006. Crystal structure of human iron regulatory protein 1 as cytosolic aconitase. *Structure (London, England: 1993)*, 14(1), 129-139.
- Edmondson, D.E., Binda, C. & Mattevi, A., 2004. The FAD binding sites of human monoamine oxidases A and B. *Neurotoxicology*, 25(1-2), 63-72.
- Ema, M. et al., 1999. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *The EMBO Journal*, 18(7), 1905-1914.
- Epand, R.F. et al., 2007. Cardiolipin clusters and membrane domain formation induced by mitochondrial proteins. *Journal of Molecular Biology*, 365(4), 968-980.
- Epstein, A.C. et al., 2001. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107(1), 43-54.
- Evens, A.M., 2004. Motexafin gadolinium: a redox-active tumor selective agent for the treatment of cancer. *Current Opinion in Oncology*, 16(6), 576-580.
- Farias, J.G. et al., 2010. Oxidative stress in rat testis and epididymis under intermittent hypobaric hypoxia: protective role of ascorbate supplementation. *Journal of Andrology*, 31(3), 314-321.
- Finkel, T., 1998. Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(2), 248-253.
- Flint, D.H., Tuminello, J.F. & Emptage, M.H., 1993. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(30), 22369-22376.
- Flohé, L. & Ursini, F., 2008. Peroxidase: a term of many meanings. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9), 1485-1490.

- Forkel, J. et al., 2004. Responses of chronically hypoxic rat hearts to ischemia: KATP channel blockade does not abolish increased RV tolerance to ischemia. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 286(2), H545-551.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), 97-112.
- Galter, D., Mihm, S. & Dröge, W., 1994. Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factor kappa B and the activator protein-1. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 221(2), 639-648.
- Gardner, P.R. & Fridovich, I., 1992. Inactivation-reeactivation of aconitase in *Escherichia coli*. A sensitive measure of superoxide radical. *Journal of Biological Chemistry*, 267(13), 8757-8763.
- Gasdaska, J.R. et al., 1996. Human Thioredoxin Reductase Gene Localization to Chromosomal Position 12q23-q24.1 and mRNA Distribution in Human Tissue. *Genomics*, 37(2), 257-259.
- Gerschman, R. et al., 1954. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science (New York, N.Y.)*, 119(3097), 623-626.
- Ghibelli, L. et al., 1998. Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12(6), 479-486.
- Giordano, F.J., 2005. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(3), 500-508.
- Grimsby, J. et al., 1991. Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(9), 3637-3641.
- Guo, H. et al., 2009. Chronic intermittent hypobaric hypoxia protects the heart against ischemia/reperfusion injury through upregulation of antioxidant enzymes in adult guinea pigs. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(7), 947-955.
- Gutteridge, J.M. & Halliwell, B., 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 136-147.

- de Haan, J.B. et al., 1998. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(35), 22528-22536.
- Hamilton, K.L. et al., 2001. Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 281(3), H1346-1352.
- Harman, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298-300.
- Hayes, J.D. & Pulford, D.J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(6), 445-600.
- Hearse, D.J., 1994. Myocardial ischaemia: can we agree on a definition for the 21st century? *Cardiovascular Research*, 28(12), 1737-1744: discussion 1745-1746.
- Hirota, K. et al., 1997. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), 3633-3638.
- Holmgren, A., 2000. Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2(4), 811-820.
- Holmgren, A., 1985. Thioredoxin. *Annual Review of Biochemistry*, 54, 237-271.
- Holmgren, A. & Björnstedt, M., 1995. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology*, 252, 199-208.
- Hornemann, T. et al., 2003. Muscle-type creatine kinase interacts with central domains of the M-band proteins myomesin and M-protein. *Journal of Molecular Biology*, 332(4), 877-887.
- Hoshida, S. et al., 2002. Repeated physiologic stresses provide persistent cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Am Coll Cardiol*, 40(4), 826-831.
- Huang, Y. et al., 2004. Cardiac myocyte-specific HIF-1alpha deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(10), 1138-1140.

- Hurtado, A., 1960. Some clinical aspects of life at high altitudes. *Annals of Internal Medicine*, 53, 247-258.
- Chae, H.Z. et al., 1999. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 45(2-3), 101-112.
- Chelikani, P. et al., 2003. An electrical potential in the access channel of catalases enhances catalysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 31290-31296.
- Ichihashi, M. et al., 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology*, 189(1-2), 21-39.
- Ivan, M. et al., 2001. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5516), 464-468.
- Ivan, M. et al., 2002. Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13459 -13464.
- Jain, S. et al., 1998. Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 α , HIF2 α and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mechanisms of Development*, 73(1), 117-123.
- Jones, D.P. et al., 2000. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(4), 625-635.
- Kasugai, I. & Yamada, M., 1992. High production of catalase in hydrogen peroxide-resistant human leukemia HL-60 cell lines. *Leukemia Research*, 16(2), 173-179.
- Keppler, D., 1999. Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(9-10), 985-991.
- Kern, J.C. & Kehrer, J.P., 2005. Free radicals and apoptosis: relationships with glutathione, thioredoxin, and the BCL family of proteins. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 10, 1727-1738.
- Kim, Y.C. et al., 2001. Hemin-induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2. A differential regulation of the antioxidant responsive element by a switch of its binding factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 18399-18406.
- Klusonová, P. et al., 2009. Chronic intermittent hypoxia induces 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in rat heart. *Endocrinology*, 150(9), 4270-4277.

- Koivunen, P. et al., 2007. An Endoplasmic Reticulum Transmembrane Prolyl 4-Hydroxylase Is Induced by Hypoxia and Acts on Hypoxia-inducible Factor α . *Journal of Biological Chemistry*, 282(42), 30544 -30552.
- Kolár, F. et al., 1989. Comparison of cardiopulmonary response to intermittent high-altitude hypoxia in young and adult rats. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases*, 56(1-2), 57-62.
- Kolár, F. et al., 2007. Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 292(1), H224-230.
- Kopecky, M. & Daum, S., 1958. Adaptation of the myocardium to altitude anoxia.. *Ceskoslovenská Fysiologie / Ústřední Ústav Biologický*, 7(3), 218-219.
- Krohne-Ehrich, G., Schirmer, R.H. & Untucht-Grau, R., 1977. Glutathione Reductase from Human Erythrocytes. Isolation of the Enzyme and Sequence Analysis of the Redox-Active Peptide. *European Journal of Biochemistry*, 80(1), 65-71.
- Lam, S. et al., 2008. Differential expressions and roles of hypoxia-inducible factor-1alpha, -2alpha and -3alpha in the rat carotid body during chronic and intermittent hypoxia. *Histology and Histopathology*, 23(3), 271-280.
- Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J. et al., 2002. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & Development*, 16(12), 1466-1471.
- Lando, D., Peet, D.J., Whelan, D.A. et al., 2002. Asparagine Hydroxylation of the HIF Transactivation Domain: A Hypoxic Switch. *Science*, 295(5556), 858-861.
- Lennon, S.V., Martin, S.J. & Cotter, T.G., 1991. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Proliferation*, 24(2), 203-214.
- Mahon, P.C., Hirota, K. & Semenza, G.L., 2001. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes & Development*, 15(20), 2675-2686.
- Masella, R. et al., 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(10), 577-586.
- Matés, J.M., Pérez-Gómez, C. & Núñez de Castro, I., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32(8), 595-603.

- Matschke, K. et al., 2005. Myocardial oxygen tension during fatal right heart failure following perfluorocarbon and radiographic contrast agent interaction. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 33(1), 57-62.
- Matthews, J.R. et al., 1992. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Research*, 20(15), 3821-3830.
- McCord, J.M. & Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.
- Mekhail, K. et al., 2004. HIF activation by pH-dependent nucleolar sequestration of VHL. *Nature Cell Biology*, 6(7), 642-647.
- Miranda-Vizuete, A. et al., 2001. Characterization of Sptrx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 31567-31574.
- Mirel, D.B. et al., 1998. Characterization of the human mitochondrial aconitase gene (ACO2). *Gene*, 213(1-2), 205-218.
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal*, 417(1), 1-13.
- Murry, C.E., Jennings, R.B. & Reimer, K.A., 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), 1124-1136.
- Neckár, J., Ostádal, B. & Kolár, F., 2004. Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 53(6), 621-628.
- Neckár, J. et al., 2003. Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 52(2), 171-175.
- Neckár, J. et al., 2005. Increased expression and altered subcellular distribution of PKC-delta in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 288(4), H1566-1572.
- Neckár, J., Papousek, F. et al., 2002. Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Research in Cardiology*, 97(2), 161-167.

- Neckár, J., Szárszoi, O. et al., 2002. Effects of mitochondrial K(ATP) modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovascular Research*, 55(3), 567-575.
- Nguyen, S.V. & Claycomb, W.C., 1999. Hypoxia Regulates the Expression of the Adrenomedullin and HIF-1 Genes in Cultured HL-1 Cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 265(2), 382-386.
- Nogueira, C.W., Zeni, G. & Rocha, J.B.T., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chemical Reviews*, 104(12), 6255-6285.
- Nohl, H., Gille, L. & Staniek, K., 2005. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochemical Pharmacology*, 69(5), 719-723.
- Nordberg, J. & Arnér, E.S., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, 31(11), 1287-1312.
- O'Gorman, E. et al., 1996. Differential effects of creatine depletion on the regulation of enzyme activities and on creatine-stimulated mitochondrial respiration in skeletal muscle, heart, and brain. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1276(2), 161-170.
- Ostadal, B. & Kolar, F., 2007. Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 158(2-3), 224-236.
- Pastore, A. et al., 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 333(1), 19-39.
- Pedrajas, J.R. et al., 2010. Mitochondrial 1-Cys-peroxiredoxin/thioredoxin system protects manganese-containing superoxide dismutase (Mn-SOD) against inactivation by peroxynitrite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide Society*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20547232> [Accessed August 15, 2010].
- Ponticos, M. et al., 1998. Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. *The EMBO Journal*, 17(6), 1688-1699.
- Poupa, O. et al., 1966. Acclimation to simulated high altitude and acute cardiac necrosis. *Federation Proceedings*, 25(4), 1243-1246.

- Pryor, W.A. et al., 2006. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 291(3), R491-511.
- Putnam, C.D. et al., 2000. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 296(1), 295-309.
- Quan, F. et al., 1986. Isolation and characterization of the human catalase gene. *Nucleic Acids Research*, 14(13), 5321-5335.
- Reddy, P.G., Bhuyan, D.K. & Bhuyan, K.C., 1999. Lens-specific regulation of the thioredoxin-1 gene, but not thioredoxin-2, upon in vivo photochemical oxidative stress in the Emory mouse. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 265(2), 345-349.
- Rezvani, H.R. et al., 2007. Protection of normal human reconstructed epidermis from UV by catalase overexpression. *Cancer Gene Therapy*, 14(2), 174-186.
- Röhrdanz, E. & Kahl, R., 1998. Alterations of Antioxidant Enzyme Expression in Response to Hydrogen Peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(1), 27-38.
- Rosen, G.M. et al., 1995. Free radicals and phagocytic cells. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(2), 200-209.
- Rosenberger, C. et al., 2002. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 13(7), 1721-1732.
- Rossi, A.M. et al., 1990. Muscle-type MM creatine kinase is specifically bound to sarcoplasmic reticulum and can support Ca²⁺ uptake and regulate local ATP/ADP ratios. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(9), 5258-5266.
- Rundlöf, A.K., Carlsten, M. & Arnér, E.S., 2001. The core promoter of human thioredoxin reductase 1: cloning, transcriptional activity, and Oct-1, Sp1, and Sp3 binding reveal a housekeeping-type promoter for the AU-rich element-regulated gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(32), 30542-30551.
- Rundlöf, A.K. et al., 2000. Prominent expression of the selenoprotein thioredoxin reductase in the medullary rays of the rat kidney and thioredoxin reductase mRNA variants differing at the 5' untranslated region. *The Biochemical Journal*, 347 Pt 3, 661-668.

- Saitoh, M. et al., 1998. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *The EMBO Journal*, 17(9), 2596-2606.
- Saks, V. et al., 2007. The creatine kinase phosphotransfer network: thermodynamic and kinetic considerations, the impact of the mitochondrial outer membrane and modelling approaches. *Sub-Cellular Biochemistry*, 46, 27-65.
- Sarada, S.K.S. et al., 2008. Selenium protects the hypoxia induced apoptosis in neuroblastoma cells through upregulation of Bcl-2. *Brain Research*, 1209, 29-39.
- Savvides, S.N. & Karplus, P.A., 1996. Kinetics and crystallographic analysis of human glutathione reductase in complex with a xanthene inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(14), 8101-8107.
- Scortegagna, M. et al., 2003. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in Epas1^{-/-} mice. *Nature Genetics*, 35(4), 331-340.
- Semenza Gregg L et al., 1997. Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int*, 51(2), 553-555.
- Sen, C.K., 2000. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Current Topics in Cellular Regulation*, 36, 1-30.
- Sen, C.K. & Packer, L., 1996. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(7), 709-720.
- Sheehan, D. et al., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *The Biochemical Journal*, 360(Pt 1), 1-16.
- Shen, D. et al., 2005. Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(27), 25305-25312.
- Schafer, F.Q. & Buettner, G.R., 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(11), 1191-1212.
- Schenk, H. et al., 1994. Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(5), 1672-1676.

- Schreck, R., Rieber, P. & Baeuerle, P.A., 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *The EMBO Journal*, 10(8), 2247-2258.
- Slater, A.F. et al., 1995. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicology Letters*, 82-83, 149-153.
- Son, S. et al., 2008. Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: the control of opening the entry for substrates/inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(15), 5739-5744.
- Speer, O. et al., 2005. Octameric mitochondrial creatine kinase induces and stabilizes contact sites between the inner and outer membrane. *The Biochemical Journal*, 385(Pt 2), 445-450.
- Spitz, D.R. et al., 1992. Mechanisms of cellular resistance to hydrogen peroxide, hyperoxia, and 4-hydroxy-2-nonenal toxicity: the significance of increased catalase activity in H₂O₂-resistant fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 292(1), 221-227.
- Spyrou, G. et al., 1997. Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(5), 2936-2941.
- Stroka, D.M. et al., 2001. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(13), 2445-2453.
- Szocs, K., 2004. Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *General Physiology and Biophysics*, 23(3), 265-295.
- Taniguchi, Y. et al., 1996. A novel promoter sequence is involved in the oxidative stress-induced expression of the adult T-cell leukemia-derived factor (ADF)/human thioredoxin (Trx) gene. *Nucleic Acids Research*, 24(14), 2746-2752.
- Taniyama, Y. & Griendling, K.K., 2003. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. *Hypertension*, 42(6), 1075-1081.
- Tate, D.J., Miceli, M.V. & Newsome, D.A., 1995. Phagocytosis and H₂O₂ induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 36(7), 1271-1279.

- Thannickal, V.J. & Fanburg, B.L., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005-1028.
- Ursini, F. et al., 1999. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5432), 1393-1396.
- Ursini, F. et al., 1995. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in Enzymology*, 252, 38-53.
- Valko, M. et al., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A. & Veksler, V., 2004. Energy metabolism in heart failure. *The Journal of Physiology*, 555(Pt 1), 1-13.
- Verdouw, P.D. et al., 1998. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovascular Research*, 39(1), 121 -135.
- Voehringer, D.W. et al., 2000. Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), 2680-2685.
- Wang, G.L. et al., 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), 5510-5514.
- Wang, W. et al., 2007. Excess capacity of the iron regulatory protein system. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(34), 24650-24659.
- Wei, S.J. et al., 2000. Thioredoxin nuclear translocation and interaction with redox factor-1 activates the activator protein-1 transcription factor in response to ionizing radiation. *Cancer Research*, 60(23), 6688-6695.
- Wiener, C.M., Booth, G. & Semenza, G.L., 1996. In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 225(2), 485-488.
- Wilce, M.C. & Parker, M.W., 1994. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1205(1), 1-18.

- Wilfinger, W.W., Mackey, K. & Chomczynski, P., 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3), 474-476, 478-481.
- Willam, C. et al., 2006. HIF prolyl hydroxylases in the rat; organ distribution and changes in expression following hypoxia and coronary artery ligation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 41(1), 68-77.
- Wilson, J.E., 2003. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *The Journal of Experimental Biology*, 206(Pt 12), 2049-2057.
- Xia, L. et al., 2001. Reduction of ubiquinone by lipoamide dehydrogenase. An antioxidant regenerating pathway. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 268(5), 1486-1490.
- Yamada, M. et al., 1991. Expression of catalase and myeloperoxidase genes in hydrogen peroxide-resistant HL-60 cells. *DNA and Cell Biology*, 10(10), 735-742.
- Yamashita, N. et al., 1994. Induction of manganese superoxide dismutase in rat cardiac myocytes increases tolerance to hypoxia 24 hours after preconditioning. *The Journal of Clinical Investigation*, 94(6), 2193-2199.
- Yodoi, J. & Tursz, T., 1991. ADF, a growth-promoting factor derived from adult T cell leukemia and homologous to thioredoxin: involvement in lymphocyte immortalization by HTLV-I and EBV. *Advances in Cancer Research*, 57, 381-411.
- Yoshida, S. et al., 1999. Involvement of thioredoxin in rheumatoid arthritis: its costimulatory roles in the TNF-alpha-induced production of IL-6 and IL-8 from cultured synovial fibroblasts. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(1), 351-358.
- Yuan, G. et al., 2005. Ca²⁺/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4321-4328.
- Yuan, G. et al., 2008. Induction of HIF-1alpha expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *Journal of Cellular Physiology*, 217(3), 674-685.
- Zelko, I.N., Mariani, T.J. & Folz, R.J., 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(3), 337-349.

- Zhao, T. et al., 2007. The generation of the oxidized form of creatine kinase is a negative regulation on muscle creatine kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(16), 12022-12029.
- Zhao, W. et al., 2009. Protection of peroxiredoxin II on oxidative stress-induced cardiomyocyte death and apoptosis. *Basic Research in Cardiology*, 104(4), 377-389.
- Zhong, N. et al., 2002. Myocardial capillary angiogenesis and coronary flow in ischemia tolerance rat by adaptation to intermittent high altitude hypoxia. *Acta Pharmacologica Sinica*, 23(4), 305-310.