

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra fyziologie živočichů

Fyziologický ústav Akademie věd České republiky
Oddělení vývojové kardiologie

Centrum výzkumu chorob srdce a cév

Úloha fosfolipázy A_2 v ischemickém myokardu

Petra Mandíková

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jan Neckář, PhD.

Praha 2008

Prohlašuji, že tuto bakalářskou práci jsem zpracovala samostatně s použitím uvedených pramenů.

Poděkování RNDr. Janu Neckářovi, PhD. za cenné rady.

ABSTRAKT

Kardioprotektivní fenomény jsou fyziologické procesy, které zvyšují toleranci myokardu k ischemii. Tyto děje zmenšují velikost infarktu, snižují výskyt a závažnost ischemických a reperfuzních arytmí a zlepšují obnovu postischemických kontraktlních funkcí myokardu. Patří mezi ně chronická hypoxie a preconditioning. Přestože o jejich existenci víme již řadu let, dosud se nám nepodařilo zcela objasnit jejich mechanismus. Jedním z aktuálních témat výzkumu v oblasti kardioprotekce je selektivní inhibice Ca^{2+} - independentní fosfolipázy A_2 (iPLA₂). PLA₂ reprezentují rodinu esteráz hydrolyzující esterovou vazbu na druhé pozici fosfolipidů, která způsobí uvolnění volných mastných kyselin (především kyseliny arachidonové) a vznik lysofosfolipidů. Oba tyto fosfolipidové metabolity jsou prekurzory prozánětlivých mediátorů jako jsou např. eikosanoidy. Studie také ukázaly, že PLA₂ je modulátorem apoptózy a ischemicko – reperfuzního poškození buňky. Ischemie v součinnosti s fosfolipázami zásadně ovlivňuje fosfolipidové složení buněčných membrán. Vzniklé lysofosfolipidy mohou měnit fluiditu membrán a jsou jednou z možných příčin ischemických a reperfuzních arytmí. Specifická inhibice tohoto enzymu by proto mohla výrazně přispět k ochraně myokardu před negativními účinky ischemie. Cílem této bakalářské práce je stručně shrnout fyziologické funkce iPLA₂ a nastínit její možné využití při prevenci ischemického poškození myokardu.

Klíčová slova: myokard, kardioprotekce, ischemie, arytmie, fosfolipáza A_2 , kyselina arachidonová, reaktivní formy kyslíku

ABSTRACT

Cardioprotective phenomena are physiological processes which increase tolerance of myocardium to ischemia. These effects reduce infarct size, decrease the number and severity of arrhythmias during ischemia and reperfusion and improve recovery of postischemic contractile functions of myocardium. Among them there are chronic hypoxia and preconditioning. Although we have known about their existence for many years, we haven't managed to clarify their mechanism yet. One of the actual themes of research in the field of cardioprotection is the selective inhibition of Ca^{2+} - independent phospholipase A_2 (iPLA $_2$). Generally, PLA $_2$ s represent a family of esterases that hydrolyze the *sn*-2 ester bond in phospholipids and cause releasing of free fatty acids (most importantly arachidonic acid) and generation of lysophospholipids. Both of these phospholipid metabolites serve as precursors for inflammatory mediators such as eicosanoids. Studies also showed that PLA $_2$ s are modulators of apoptosis and ischemia/reperfusion injury. Ischemia with cooperation of phospholipases affects fundamentally structure of plasma membrane phospholipids. Generated lysophospholipids may alter membrane fluidity and they may be one of possible causes of arrhythmias during ischemia and reperfusion. Specific inhibition of this enzyme could contribute markedly to the protection of myocardium from negative effects of ischemia. The purpose of this bachelor's study is to summarize briefly the physiological functions of iPLA $_2$ and outline its possible utilization during prevention of cardiac ischemia – induced injury.

Key words: myocardium, cardioprotection, ischemia, arrhythmias, phospholipase A_2 , arachidonic acid, reactive oxygen species

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AACOCF ₃	arachidonyl trifluoromethyl keton
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
BEL	bromoenol lakton
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
HCAEC	endoteliální buňky lidské koronární arterie
MAFP	methyl arachidonyl fluorofosfonát
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
PAF	krvní destičky aktivující faktor
PC	fosfatidylcholin
PE	fosfatidyletanolamin
PKC	protein kináza C
PLA ₂	fosfolipáza A ₂
cPLA ₂	Ca ²⁺ - dependentní fosfolipáza A ₂
iPLA ₂	Ca ²⁺ - independentní fosfolipáza A ₂
sPLA ₂	sekreční fosfolipáza A ₂
PLC	fosfolipáza C
P _{O2}	parciální tlak kyslíku
PS	fosfatidylserin
PVCs	předčasné komorové stahy
ROS	reaktivní formy kyslíku
VT	komorové tachykardie

OBSAH

1.	Úvod	8
2.	Ischemie myokardu	9
3.	Kardioprotektivní fenomény	10
3.1	Chronická hypoxie	10
3.2	Preconditioning	13
4.	PLA ₂	15
4.1	Izoformy PLA ₂	16
4.2	Funkce a regulace iPLA ₂	17
4.3	iPLA ₂ a její úloha v ischemii myokardu	20
4.4	iPLA ₂ a její úloha v kardioprotekci	22
5.	Závěr	24
6.	Použitá literatura	25

1. ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění představují hlavní příčinu mortality v České republice a v dalších ekonomicky vyspělých zemích světa. U nás na tato onemocnění každoročně umírá okolo 60 000 lidí. Z celé řady chorob srdce a cév se nejčastěji vyskytují ischemické mozkové příhody, ischemická choroba srdeční a její akutní forma infarkt myokardu. Není proto překvapující, že je této problematice věnována značná pozornost vědecké veřejnosti.

Výzkum ischemické choroby srdeční lze dnes rozdělit do dvou velkých oblastí: a) studium patogenetických mechanismů uplatňujících se při vzniku poškození myokardu a b) studium mechanismů vedoucích k ochraně srdečního svalu, ke zmenšení nebo prevenci jeho poškození.

Je potěšující, že v České republice vznikl projekt Centrum výzkumu chorob srdce a cév zabývající se studiem odolnosti srdce vůči nedostatku kyslíku. Na činnosti centra se podílejí experimentální i kliničtí pracovníci z Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky (AV ČR), 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) a dětského Kardiocentra Fakultní nemocnice v Motole. Úzká spolupráce těchto pracovišť se zaměřuje na studium molekulárních a buněčných mechanismů, které se mohou uplatňovat ve zvýšené odolnosti srdce, a na výzkum rizikových faktorů.

Rozsah ischemického poškození srdce nezávisí jen na intenzitě a trvání, ale také na stupni odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku. Do popředí výzkumu se tak dostávají účinné kardioprotektivní mechanismy, jakými jsou např. adaptace na chronickou hypoxii nebo tzv. preconditioning. Hlavním cílem jejich studia je objasnění molekulárních a buněčných mechanismů, které se podílejí na vzniku ischemické choroby srdeční a jejích rizikových faktorů, se zvláštním zřetelem k možným novým terapeutickým postupům.

Tato bakalářská práce je věnována úloze fosfolipázy A_2 (PLA_2) v ischemickém myokardu. Předpokládá se, že PLA_2 je zahrnuta v procesech poškození srdce a to jak při sníženém tlaku kyslíku v hypoxických podmínkách, tak i při nedostatečném krevním zásobení kyslíkem při ischemii. Její inhibice může mít kardioprotektivní význam. Cílem práce bylo shromáždit a prostudovat dostupné texty věnované této problematice, provést jejich analýzu a na jejím základě kriticky zhodnotit úlohu PLA_2 a popsat její roli při ischemii. Práce je výsledkem studia odborné literatury, především textů publikovaných v odborných časopisech a internetových databázích.

2. ISCHEMIE MYOKARDU

Ischemie je definována jako disproporce mezi požadavkem a dodávkou kyslíku v oblasti myokardu způsobená náhlým poklesem průtoku krve. Důsledkem ischemie je rozvoj mnoha metabolických, funkčních a strukturálních změn. S délkou trvání ischemie dochází k posunu od fyziologických abnormalit k závažnějším ireverzibilním patologickým změnám v myokardu, což v konečném důsledku může vést až k selhání srdce. Patologické změny vyvolané ischemií lze rozdělit na ischemické poškození vzniklé v průběhu uzavření koronárního řečiště části myokardu a reperfuzní poškození vyvolané obnovením koronárního průtoku.

Mezi metabolické změny vyvolané ischemií patří především změny v energetickém metabolismu. Důsledky ischemie se projevují v energetickém zásobení myokardu již v několika vteřinách od jejího začátku. Velmi rychle dojde k rapidnímu úbytku kyslíku v buňkách a prudce poklesne aerobní metabolismus. Dále dochází ke změně metabolismu iontů. Porucha iontové rovnováhy v průběhu ischemie nejvíce přispívá ke vzniku ireverzibilního poškození buňky, které je dnes vysvětlováno především vzrůstem koncentrace Ca^{2+} v cytosolu. V průběhu ischemie se objevují také membránové změny. Ischemie ovlivňuje fosfolipidové složení buněčných membrán, lipidové metabolity jsou produkovány fosfolipázami (fosfolipáza A_2 (PLA₂) a fosfolipáza C (PLC)). Vzniklé lysofosfolipidy modifikují permeabilitu membrány a jsou jednou z možných příčin ischemických a reperfuzních arytmií.

Na metabolické změny navazují změny strukturální a funkční projevy ischemického poškození. Nedostatečné zásobení kyslíkem a metabolické změny části myokardu, vyvolané ischemií, rychle vedou k abnormální kontraktilní funkci. Dalším z typických funkčních projevů ischemie je vznik poruch srdečního rytmu - arytmií. Velikost infarktového ložiska je úměrná velikosti oblasti zasažené ischemií, délce trvání ischemie, spotřebě kyslíku a krevnímu zásobení přes kolaterální arterie (zkráceno z přehledu Ostadal a Kolar 1999).

3. KARDIOPROTEKTIVNÍ FENOMÉNY

Kardioprotektivní fenomény představují jevy, které působí antiischemicky a chrání tak myokard před důsledky akutního ischemicko – reperfučního poškození. Ochranný účinek kardioprotekce je nejčastěji demonstrován na třech nejzávažnějších projevech ischemie srdce, kterými jsou: a) vznik infarktu myokardu, b) postischemická kontraktální dysfunkce a c) výskyt závažných ischemických a reperfučních arytmií. Mezi dnes nejvíce studované kardioprotektivní fenomény patří preconditioning a adaptace na chronickou hypoxii.

Nejstarším známým kardioprotektivním jevem je adaptace na chronickou hypoxii, o jehož existenci víme již z epidemiologických studií z konce 50. let minulého století (Hurtado a kol. 1960). V průběhu posledních let byla získána řada zásadních poznatků o mechanismu protekce vyvolaném chronickou hypoxií. Dosud není znám jiný kardioprotektivní efekt, který udržuje zvýšenou ischemickou toleranci po delší dobu, v řádu týdnů po odeznění stimulu, jak je tomu u chronické hypoxie. Současný experimentální výzkum, zabývající se kardioprotektivními vlivy, se soustřeďuje na fenomén krátkodobé adaptace, tzv. preconditioningu.

Porovnáním kardioprotektivního působení chronické adaptace a preconditioningu se dosud zabývalo pouze několik málo prací. Zdá se, že chronická hypoxie využívá podobné buněčné signální dráhy jako preconditioning, avšak detailní analýza protektivních intracelulárních mechanismů chybí. Z dosud známých poznatků vyplývá, že klíčové postavení mají mitochondriální K_{ATP} kanály, protein kináza C (PKC) a reaktivní formy kyslíku (ROS). Existující výsledky pokusů jsou však rozporuplné, a tak jedinými ověřenými rozdíly obou jevů je delší trvání kardioprotektivního účinku chronické hypoxie (protektivní účinek na ischemický myokard přetrvává mnohem déle, až několik týdnů na rozdíl od hodinového trvání účinku preconditioningu), preconditioning je však silnějším ochranným fenoménem (zkráceno z přehledu Ostadal a Kolar 1999).

3.1 CHRONICKÁ HYPOXIE

Chronická hypoxie zvyšuje toleranci srdečních buněk k ischemii. Za těchto podmínek musí myokard zastat adekvátní kontraktální funkci navzdory sníženému tlaku kyslíku v koronárních arteriích. Takové prostředí vyžaduje genotypickou adaptaci, která má kardioprotektivní efekt. Již více jak 50 let je známo, že lidé trvale žijící ve vysokých

nadmořských výškách (např. Peru, 4000 m) jsou tolerantnější k akutnímu ischemickému poškození srdce a výskyt infarktu myokardu je u těchto populací nižší. Kardioprotektivní efekt vysokých nadmořských výšek byl potvrzen experimentálními studiemi, které použily model chronické hypoxie simulované v hypobarické komoře. První z těchto experimentů provedli Kopecký a Daum v Praze v roce 1958. Tehdy prokázali zlepšenou obnovu postischemických kontraktálních funkcí myokardu potkana po šesti týdnech adaptace na nadmořskou výšku 7000 m v hypobarické komoře.

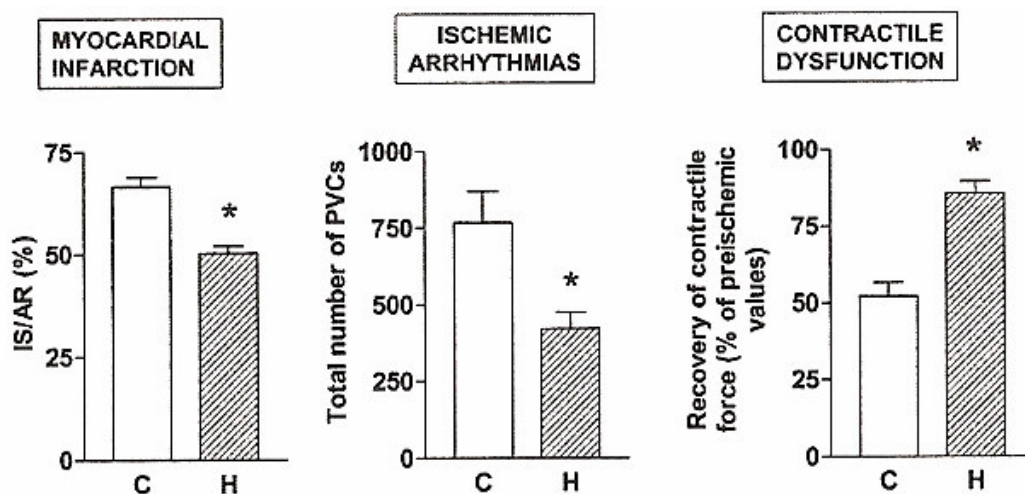
Chronická hypoxie je výsledkem disproporce mezi dodávkou kyslíku a nárokem tkání. Tento stav může být vyvolán několika způsoby. Nejběžnějším z nich je ischemická hypoxie vyvolaná redukcí nebo úplným přerušением koronárního toku krve. Druhým možným mechanismem vzniku chronické hypoxie je systémová hypoxie charakterizovaná poklesem parciálního tlaku kyslíku v arteriální krvi. Dalším v pořadí je anemická hypoxie, kdy parciální tlak kyslíku v arteriální krvi je normální, ale kapacita krve nutná pro transport kyslíku je snížena (Ostadal a kol. 2007).

Existují také dva případy přirozené fyziologické hypoxie: a) myokard populací žijících permanentně ve vysokých nadmořských výškách a b) myokard lidského plodu, který je adaptovaný na hypoxii odpovídající nadmořské výšce 8000 metrů. V obou těchto situacích je srdeční myokard podstatně více rezistentní vůči nedostatku kyslíku. Hypoxický fetální oběh způsobuje, že myokard novorozenců je odolnější k ischemii v porovnání s dospělými jedinci. Po narození však zvýšená ischemická tolerance srdce klesá (Ostadalova a kol. 2002).

Nejběžnějším modelem pro výzkum chronické hypoxie je vysokohorské prostředí, popřípadě laboratorní podmínky simulované v normobarických (řízená změna složení plynů) a hypobarických (snížení P_{O_2} částečným odčerpáním vzduchu z komory) komorách. Tyto modely umožňují studovat prospěšné i nepříznivé adaptivní změny, průběh desadaptace a farmakologickou protekci proti nechtěným projevům. Dalším předmětem studia je rozdíl mezi efektem normobarické a hypobarické hypoxie (vliv sníženého atmosférického tlaku), který dosud nebyl zcela objasněn, ale zjistilo se, že normobarická i hypobarická hypoxie vedou k podobnému stupni hypertrofie pravé komory a remodelaci plicních arterií.

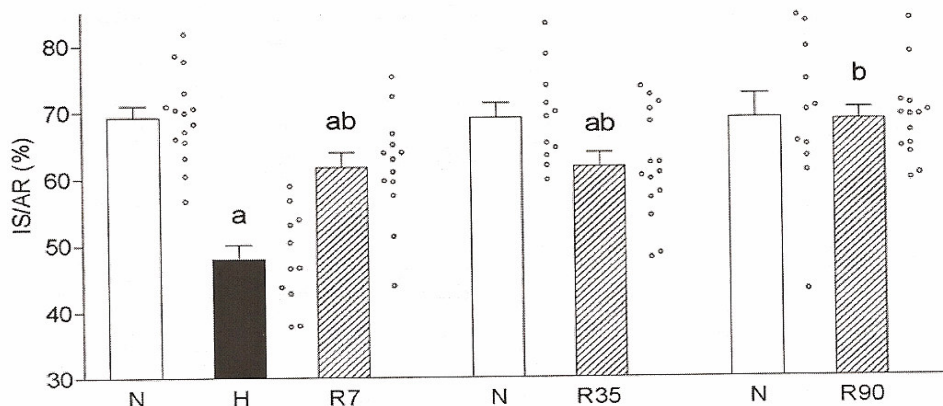
Chronická hypoxie není pouze permanentní, může mít také intermitentní charakter. Ten nastává při opakovaném horském výstupu nebo při tzv. spánkové apnoe. Současný výzkum intermitentní hypoxie se zaměřuje na délku, intenzitu a počet hypoxických epizod za den a celkový počet dní, kdy došlo k expozicím. Je zřejmé, že právě tyto faktory jsou rozhodující při určení pozitivního či negativního působení intermitentní hypoxie.

Chronická hypoxie redukuje všechny hlavní projevy ischemicko - reperfučního poškození jako je velikost infarktu, postischemická kontraktlní dysfunkce a ischemické a reperfuční komorové arytmie (Obr.1).



Obr. 1
Kardioprotektivní efekty adaptace na chronickou intermitentní hypoxii (7000 m, 8 h denně, 5 dní v týdnu) u potkanů. Redukce velikosti infarktu (IS/AR), snížený počet ischemických arytmií (PVCs), zlepšená obnova postischemických kontraktlních funkcí.
Převzato z Ostadal a kol. 2007.

Většina strukturních a biochemických změn navozených chronickou hypoxií (plicní hypertenze, hypertrofie pravé komory) se po návratu do normoxických podmínek normalizují do původního stavu. Avšak některé změny mohou přetrvat delší dobu po posledním vystavení hypoxii. Je jistě klinicky zajímavé, že protektivní efekt chronické hypoxie na velikost infarktu byl zjištěn ještě 7 a 35 dní po konci adaptace (Neckar a kol. 2004). Na druhou stranu ve stejné studii bylo prokázáno, že antiarytmická protekce vymizí během prvního týdne po návratu do normoxických podmínek (Neckar a kol. 2004) (Obr. 2). Vliv chronické hypoxie na komorové arytmie je tedy velmi závislý na stupni a délce trvání denních expozic. Na druhou stranu u extrémních modelů chronické intermitentní hypoxie (P_{O_2} 5%, 40s cykly hypoxie následované 20s normoxie, 8 hodin denně, celkově 35 dní) byla zjištěna zvýšená citlivost myokardu k ischemii. Tato skutečnost byla pravděpodobně způsobena zvýšenou produkcí ROS (Béguin a kol. 2005).



Obr. 2

Velikost infarktu myokardu (IS/AR) u potkanů adaptovaných na intermitentní chronickou hypoxii (7000 m, 8 h denně, 5 dní v týdnu) (H), hypoxičtí potkani zotavení v normoxii po 7 dní (R7), 35 (R35) a 90 dní (R90) a odpovídající normoxická skupina (N).

Převzato z Neckar a kol. 2004.

Chronická hypoxie vyvolává řadu adaptivních změn v myokardu, které jsou považovány za protektivní. Zvyšuje expresi a distribuci několika cytoprotektivních proteinů zahrnujících NO syntázu, protein kinázu C, MAP kinázy nebo heat shock proteiny. Navzdory tomu, že kardioprotektivní efekt chronické hypoxie je znám již půl století, jeho molekulární podstata nebyla až donedávna zkoumána. Přesný molekulární mechanismus působení chronické hypoxie je zatím neznámý.

3.2 PRECONDITIONING

Preconditioning je další kardioprotektivní jev známý od druhé poloviny 80. let 20. století. Jedná se o rychlou adaptivní odpověď myokardu na krátkodobou ischemii, která oddálí nástup buněčné smrti během následující dlouhodobé ischemie, ale na rozdíl od chronické hypoxie poskytuje pouze dočasný krátkodobý ochranný účinek. Murry a kol. (1986) publikovali práci, která tento jev poprvé popsala. Autoři této studie zjistili u psů výrazné snížení velikosti infarktu po 40-ti minutách ischemie, pokud jí předcházela série čtyř krátkých pětiminutových ischemií oddělených pětiminutovými reperfuzemi. Uvedená studie se stala impulsem pro intenzivní studium vedoucí k poznání a vysvětlení tohoto fenoménu.

Kardioprotektivní účinek preconditioningu se dosud podařilo prokázat u všech živočišných druhů, u nichž byl studován, včetně člověka. Přestože se ukázaly drobné

mezidruhové rozdíly, lze konstatovat, že tento antiischemický jev využívá obecný buněčný mechanismus, vlastní všem živočišným druhům. Jeho protektivní účinek je dvoufázový. Časná fáze trvá 1 – 3 h od krátké stimulační ischemie (tzv. klasický preconditioning), tato forma preconditioningu poskytuje výrazný ochranný účinek, který ovšem velmi rychle odezní. Délka trvání jím vyvolané protekce je 1 až 2 h. Druhá fáze protekce (tzv. druhé okno protekce) nastává po 20 – 24 h od vyvolávajícího stimulu a přetrvává následujících 24 – 72 h. Na rozdíl od klasického preconditioningu však poskytuje slabší protektivní účinek. Obě formy preconditioningu působí protektivně na všechny nejzávažnější projevy ischemicko – reperfučního poškození (velikost infarktu, výskyt a závažnost ischemických a reperfučních arytmií, postischemická kontraktlní dysfunkce) (zkráceno z přehledu Ostadal a Kolar 1999).

4. PLA₂

Plazmatická membrána živočišné buňky je složena z fosfolipidové dvojvrstvy. Ta v sobě zahrnuje integrální proteiny zajišťující aktivní i pasivní transport látek přes membránu a regulaci buněčné odpovědi na růstové faktory a ostatní signály. Integrální membránové proteiny sarkolemy předurčují metabolickou charakteristiku a transportní funkce buňky v srdci. Změny ve složení fosfolipidů membrány mohou ovlivnit aktivitu těchto proteinů. Je jasné, že aktivace enzymů degradujících (hydrolyzujících) fosfolipidy může tedy potenciálně měnit funkci buněk, integrita sarkolemy má zásadní význam pro zachování buněčných funkcí. Ty se stávají nekontrolovatelné, je-li sarkolema porušena. Fosfolipidová dvojvrstva vedle své strukturální role dále poskytuje prekurzory pro vznik mnoha sloučenin se specifickými biologickými aktivitami. Tento proces je zajišťován fosfolipázami.

PLA₂ je jedním z enzymů v buňce reprezentujících širokou rodinu esteráz hydrolyzující esterovou vazbu na druhé pozici fosfolipidů, která způsobí uvolnění mastné kyseliny a vznik lysofosfolipidů. Vzniklé produkty jsou prekurzory metabolismu řady bioaktivních komponent. Odštěpení mastné kyseliny zřetelně nabývá na fyziologickém významu, pokud volnou mastnou kyselinou je kyselina arachidonová. Kyselina arachidonová může být dále metabolizována např. cyklooxygenázou a lipoxygenázou na bioaktivní eikosanoidy (prostaglandiny, prostacykliny, tromboxany a leukotrieny), jež působí přes signální kaskády zahrnující G-proteiny a cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) jako prozánětlivé mediátory. Lysofosfolipidy, další produkty působení PLA₂, účinkují jako biologické mediátory spouštějící buněčnou signalizaci a jsou prekurzorem pro krevní destičky aktivující faktor (PAF). Studie prokázaly významnou roli PLA₂ rovněž jako modulátorů farmakologického, toxického a ischemického poškození buněk (Cummins a kol. 2000).

Smrt kardiomyocytů nastává během infarktu myokardu u všech zvířecích modelů i lidských pacientů. Je známo, že infarkt myokardu vede k buněčné apoptóze a nekróze. Několik studií poukázalo na uplatnění PLA₂ v indukci buněčné smrti (Cummins a kol. 2000). Současně produkty formované hydrolýzou fosfolipidů (volné mastné kyseliny, lysofosfolipidy) mohou snížit membránovou integritu.

Přítomnost PLA₂ ve všech typech buněk jen zvýrazňuje význam, který tyto enzymy mají v biologických procesech, zahrnujících generaci prozánětlivých mediátorů a regulaci metabolismu lipidů.

4.1 IZOFORMY PLA₂

Význam PLA₂ v buněčném poškození a potenciální výhody jejich inhibice jsou studovány více než 20 let. Během posledních pěti let byly objeveny a charakterizovány nejen nové izoformy, ale i katalyticky odlišné varianty některých izoform. Role těchto enzymů však zůstává prozatím nejasná. Chemické inhibitory PLA₂ aktivity se významně uplatňují při objasňování funkcí jednotlivých specifických PLA₂.

Od roku 1997 jsou PLA₂ klasifikovány do čtrnácti skupin podle nukleotidových sekvencí. Většina z nich tvoří malé proteiny (12 – 19 kDa) vyžadující pro svou aktivitu milimolární množství Ca²⁺. Tato rodina se nazývá sekreční PLA₂ (sPLA₂, skupiny I – III, V, IX – XIV). Další rodiny zahrnují Ca²⁺-dependentní PLA₂ (cPLA₂, skupiny IVA a B) a Ca²⁺-independentní PLA₂ (iPLA₂, skupiny IVC, VI, VII, VIII) (Kinsey a kol. 2007).

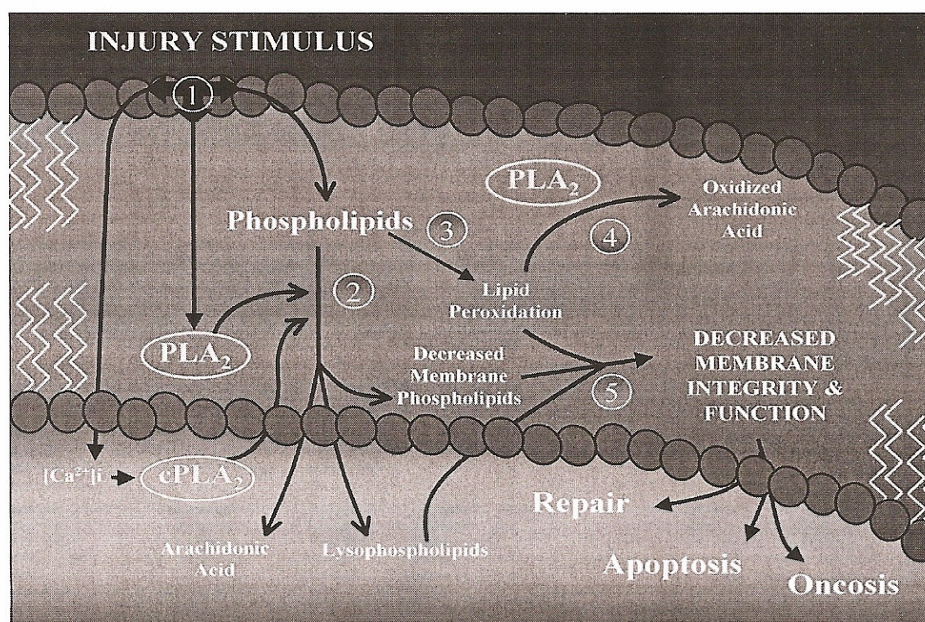
Původní klasifikační systém byl založen na tom, zda je PLA₂ sekretována ven z buňky (sPLA₂), je Ca²⁺-dependentní a cytosolická (cPLA₂) nebo je Ca²⁺-independentní (iPLA₂). Tento starší způsob klasifikace si stále zachovává svou hodnotu. Co se týká bližší charakteristiky jednotlivých tříd fosfolipáz, sPLA₂ jsou uloženy v cytosolických granulách nebo syntetizovány na základě stimulace a následně sekretovány extracelulárně. sPLA₂ nevykazuje žádnou preferenci pro arachydonoylované fosfolipidy. cPLA₂ jsou lokalizovány v cytosolu, mají vyšší molekulovou hmotnost (85 kDa), vyžadují mikromolární koncentrace vápenatých iontů pro navázání na lipidový substrát a jsou selektivní pro arachydonoylované fosfolipidy. iPLA₂ izoformy je možné lokalizovat jak v cytosolických, tak v membránových frakcích. Pro svou aktivitu nevyžadují Ca²⁺ a jejich molekulové hmotnosti se pohybují od 29 - 85 kDa.

Sevanian a kol. (1988) ukázal, že poruchy buněčné membrány prodlužují aktivaci PLA₂ izoform. Mnoho produktů vzniklých hydrolyzou fosfolipidů (volné mastné kyseliny, lysofosfolipidy) snižují membránovou integritu, neboť fungují jako detergenty a mění membránovou fluiditu. Volné mastné kyseliny a lysofosfolipidy mohou sloužit jako prekurzory biologicky aktivních metabolitů, iniciují zánětlivou reakci a tak potencují aktivitu PLA₂. Společně s uvolněnými membránovými fosfolipidy i zvýšená hladina Ca²⁺ přispívá ke zvyšování aktivity některých PLA₂ izoform. Na druhou stranu PLA₂ mohou snížit míru poškození membránových fosfolipidů například v důsledku působení reaktivních forem kyslíku, neboť se účastní degradace poškozených fosfolipidů (Cummings a kol. 2000).

4.2 FUNKCE A REGULACE iPLA₂

Hlavní funkcí iPLA₂ je remodelace membránových fosfolipidů. Tato její úloha je využívána v řadě buněčných procesů jako je např. apoptóza. Apoptóza je typ buněčné smrti, který nezahrnuje zánětlivou reakci a probíhá velmi kontrolovaným způsobem. V porovnání s nekrózou, apoptóza aktivuje katabolické mediátory a enzymy před cytolýzou. Mnoho buněčných změn, které se účastní této formy buněčné smrti, má důležitou roli v rozpoznání a eliminaci buněk okolními fagocyty. Jednou ze změn je záměna membránových fosfolipidů (ztráta fosfatidylcholinu (PC) a fosfatidyletanolaminu (PE)), ztráta dvojvrstvé symetrie a expozice fosfatidylserinu (PS) na buněčném povrchu (Cummings a kol. 2000).

Za centrální místo regulace apoptózy jsou považovány mitochondrie, neboť představují nejdůležitější zdroj reaktivních forem kyslíku (ROS). Pokud ROS nejsou dostatečně degradovány antioxidačními systémy, mohou poškozovat buňku tím, že například napomáhají fragmentaci deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a peroxidaci membránových fosfolipidů. Právě peroxidace membránových fosfolipidů je považována za hlavní mechanismus, kterým ROS buňku atakují. Fosfolipidy bohaté na polynenasycené mastné kyseliny (důležitá stavební složky membrán) jsou k účinku ROS nejnáchylnější (Obr. 3).



Obr. 3
Možná úloha PLA₂ při buněčném poškození.
Převzato z Cummings a kol. 2000.

Vnitřní mitochondriální membrána obsahuje vysoký podíl fosfolipidu kardiolipinu (CL). A právě peroxidaci CL lze považovat za iniciaci apoptotického signálu (Chicco a kol. 2007).

Oxidace nenasyčených mastných kyselin v membránách způsobuje vznik toxických lipidových hybridů zodpovědných za poškození buňky. Lipidová peroxidace snižuje membránovou uspořádanost, mění permeabilitu membrány pro ionty, aktivitu integrálních proteinů i buněčnou signalizaci. Tyto změny jsou pravděpodobnou příčinou stárnutí a nemocí jako je např. infarkt myokardu, diabetes nebo rakovina. Za fyziologických podmínek bývají mitochondrie schopné škody způsobené ROS napravit díky aktivitě iPLA₂. Vzhledem k tomu, že přednostně oxidované jsou právě polynenasycené mastné kyseliny nacházející se na druhé pozici v molekule membránových fosfolipidů, účastní se iPLA₂ oprav membrán a svou remodelační schopností snižuje poškození membránových fosfolipidů. Uvolnění peroxidovaných mastných kyselin z membrány pomocí iPLA₂ je hlavní mechanismus detoxikace oxidovaných membránových fosfolipidů. Po jejich hydrolýze katalyzované iPLA₂ následuje recyklace lysofosfolipidů enzymy jako jsou CoA - dependentní acyltransferáza nebo CoA - independentní acyltransferáza. Právě tato recyklace je nezbytná pro obnovu struktury membrány a tedy i normální buněčné funkce.

Katalyticky kompetentní iPLA₂ je lokalizovaná na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány. Tato lokalizace je spojena se zrychleným katabolismem mitochondriálních fosfolipidů během ischemie. Studie prokázaly, že ischemie redukuje obsah fosfolipidů (PC, PE, CL) v mitochondriálních a jaderné membráně (Seleznev a kol. 2006).

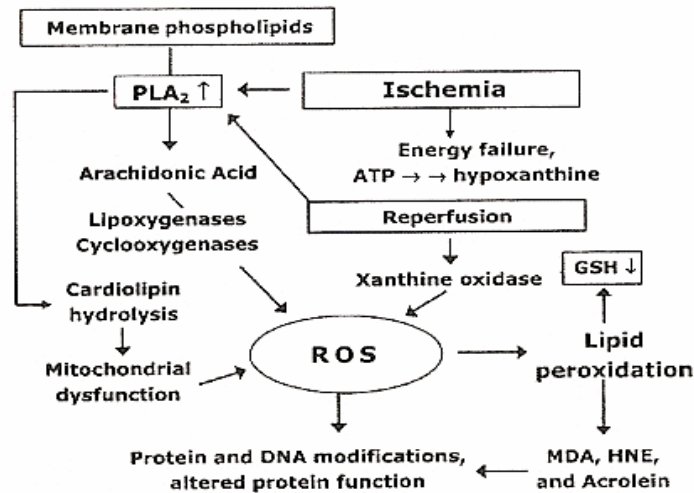
Existuje několik způsobů regulace aktivity iPLA₂. I když iPLA₂ nevyžaduje pro svou funkci Ca²⁺, aktivita iPLA₂ je regulována nepřímo množstvím Ca²⁺ v intracelulárních zásobách (aktivace při vyčerpání intracelulárních zásob Ca²⁺) nebo Ca²⁺ - dependentním proteinem kalmodulinem. Jenkins a kol. (2001) identifikoval na molekule kalmodulinu vazebné místo zodpovědné za navázání a regulaci iPLA₂. Dalším potenciálním faktorem regulujícím aktivitu iPLA₂ je stimulace trombinem. Vystavení izolovaných králičích kardiomyocytů trombinu vyústilo ve zvýšenou aktivitu membránově asociované iPLA₂ a dále ve zrychlenou hydrolýzu membránových fosfolipidů a zvýšenou produkci kyseliny arachidonové a lysoplasmenylcholinu. Stejná situace nastala u trombinem stimulovaných endoteliálních buněk. Nejen trombinová stimulace ale i hypoxie zvyšuje aktivitu membránově asociované iPLA₂ (Akiba a kol. 2004).

Studie (Steer a kol. 2002) dokládají, že protein kináza C (PKC) patří také mezi faktory regulující aktivaci iPLA₂. PKC představuje Serin/Threonin kinázu s velkým množstvím potenciálních substrátů. Z analýz aminokyselinové sekvence známých iPLA₂ je patrné, že zde existují místa určená pro fosforylaci PKC, což napovídá, že tento mechanismus může také hrát roli při aktivaci iPLA₂. V případě všech PLA₂ je nutný kontakt s membránovým substrátem a katalytická aktivita musí být modulována přes posttranslační mechanismy jako je např. fosforylace.

Řada PKC izoform byla identifikována v myokardu. Mají různé místo lokalizace a aktivují se různými stimuly. PKC α a PKC β mohou být aktivovány během infarktu, avšak izoformy, které by mohly aktivovat iPLA₂, dosud nebyly identifikovány. Současný výzkum je zaměřen na studium izolované membránové frakce připravené z kardiomyocytů při trombinové stimulaci, kde byla zjištěna zvýšená aktivita iPLA₂. Předpokládá se, že existují kinázy, která by převáděly signál mezi trombinovým receptorem a membránově asociovanou iPLA₂ (Akiba a kol. 2004).

Potenciální regulace membránově vázané iPLA₂ PKC byla prověřována právě na izolovaných králičích kardiomyocytech. Stimulace membránové frakce z těchto myocytů trombinem vedla ke zvýšení membránově asociované iPLA₂. Předpokládá se, že tento děj je regulován některou z PKC, neboť podání PKC inhibitoru blokovalo aktivace iPLA₂ trombinem. Tedy PKC přítomné v membránové frakci modulují iPLA₂ aktivitu. Molekulárně – biologické analýzy prokázaly signifikantní zvýšení aktivity izoformy ϵ PKC přítomné v membránové frakci, žádná další izoforma však v membráně objevena nebyla (Meyer a kol. 2005). Z výše uvedeného plyne, že aktivita iPLA₂ je zprostředkována membránově vázanou PKC izoformou v trombinem stimulovaných králičích kardiomyocytech.

Nedávné nálezy ukázaly, že ROS jsou dalšími potenciálními faktory ovlivňujícími aktivitu iPLA₂ (Akiba a kol. 2004). Představují malé difuzibilní molekuly, mezi které patří superoxidový aniont (O₂⁻), hydroxylový radikál (OH[·]) a peroxid vodíku (H₂O₂). ROS jsou známé jako spouštěče různých biologických odpovědí a hrají důležitou roli při napadení organismu mikroorganismy a v řadě patofyziologických dějů.



Obr. 4
Schéma signálních drah produkujících ROS v ischemii a reperfuzi.
Převzato z Adibhatla a kol. 2006.

Pokud jsou ROS produkovány nekontrolovatelným způsobem mohou být zapojeny do patogeneze řady onemocnění, např. revmatoidní artritidy, ischemické choroby srdce a mozku. ROS jsou produkovány několika oxidačními metabolickými procesy, mezi které patří metabolismus kyseliny arachidonové zahrnující cyklooxygenázu a mitochondriální respirační řetězec. ROS reagují s některými intracelulárními molekulami jako např. DNA, proteiny a lipidy, včetně polynenasycených mastných kyselin membránových fosfolipidů, jak již bylo uvedeno.

Obr. 4 ukazuje vzájemnou spjitost aktivace PLA₂ a ROS při ischemii a reperfuzi.

4.3 iPLA₂ A JEJÍ ÚLOHA V ISCHEMII MYOKARDU

PLA₂ byla identifikována v srdci jako jeden z možných mediátorů ischemicko - reperfuzního poškození. Prokázalo se, že aktivace PLA₂ v myokardu během akutní srdeční ischemie vede k produkci metabolitů, které mění funkci iontových kanálů a tím způsobují letální komorové arytmie (Mancuso a kol. 2003). Tento poznatek je ve shodě s poznáním, že akutní ischemie myokardu vyvolává zvýšenou arytmiogenezi (doprovázenou fosfolipolýzou), která je příčinou náhlé srdeční smrti u pacientů s akutním infarktem myokardu, jak prokázaly epidemiologické studie. U lidí i ostatních zvířecích modelů se komorové arytmie objevují po

několika minutách až desítkách minut od počátku ischemie a jejich četnost klesá s postupující dobou a rozvojem ireverzibilního poškození.

V souvislosti s ischemií myokardu a úlohou iPLA₂ v mechanismu poškození srdce došla k zajímavým nálezům studie Mancusco a kol. (2003). Ukázalo se, že během ischemie se u myši objevovaly komorové arytmie pouze výjimečně v porovnání s 35 – 60% incidencí u většiny ostatních zvířecích druhů. Tyto výsledky ukázaly, že ischemie u myši nemusí doprovázena uvolněním mastných kyselin, jak je tomu u všech ostatních modelů. Transgenní myši se zvýšenou aktivitou iPLA₂ srovnatelnou s lidskou, měly podobnou arytmogenezi v ischemii jako potkani, pes, králík nebo člověk. K objasnění role iPLA₂ v arytmogenezi během akutní srdeční ischemie přispělo zkoumání četnosti předčasných komorových stahů (PVCs) a komorových tachykardií (VT) v srdci kontrolních a transgenních myší. Při normálním krevním průtoku se u transgenních myší neobjevily žádné PVC. Podvaz sestupné větve levé koronární arterie vyústil ve zvýšený výskyt PVC, především nejzávažnějších forem arytmií VT. Zdá se tedy, že aktivace iPLA₂ přispívá ke vzniku komorových arytmií, které se jsou minoritní u kontrolních myší, ale objevují se u transgenních myší, které vykazují arytmie z důvodu produkce většího množství iPLA₂ (Mancuso a kol. 2003).

Kromě buněk myokardu byla funkce iPLA₂ také zkoumána v endoteliálních buňkách lidské koronární arterie (HCAEC). Náhlá srdeční smrt u lidí je následkem komorových arytmií a následného vzniku intrakoronárního trombu. Pokud je krevní průtok přerušen nebo silně redukován zvýšenou nebo kompletní okluzí koronární arterie, dochází k ischemické události, při které jsou HCAEC v ischemické oblasti vystaveny dramatické hypoxii. V experimentech Meyera a kol. (2007) byly HCAEC buňky vystaveny trombinové expozici, což vedlo k aktivaci membránově asociované iPLA₂.

Třetí oblastí zkoumání aktivity iPLA₂ za ischemických podmínek je mozek. Mozková ischemie nebo také mrtvice je charakterizována obstrukcí krevního průtoku do mozku. Existují dva typy mrtvice: a) globální nebo také totální ztráta krevního průtoku do mozku způsobená zastavením činnosti srdce a b) fokální nebo regionální způsobená lokálním přerušением krevního průtoku do mozku v důsledku blokace arterie. Mrtvice způsobí přerušení dodávky glukózy a kyslíku, které vede ke vzniku infarktu. Fokální ischemie je charakterizována ischemickým jádrem obklopeným polostinným regionem zvaným "penumbra", který je charakterizovaný pouze parciální redukcí krevního průtoku díky existenci kolaterálních arterií. Energetické požadavky mozku jsou naplňovány metabolismem

glukózy a kyslíku k fosforylaci ADP na ATP. Většina vygenerovaného ATP je použita na zachování stálosti vnitřního prostředí buněk a transmembránového iontového gradientu sodíku, draslíku a vápníku. Energetické selhání v průběhu mozkové ischemie vede k rychlé ztrátě ATP a nekontrolovatelnému unikání iontů přes buněčnou membránu, které způsobí depolarizaci a uvolnění glutamátu a dopaminu. Nadbytek glutamátu a stimulace jeho receptorů způsobí aktivaci fosfolipázy, fosfolipidovou hydrolýzu a uvolnění kyseliny arachidonové. Je tedy jasné, že jednou z kritických událostí je opět aktivace PLA₂, které hydrolyzují membránové fosfolipidy a uvolnění kyseliny mastných kyselin včetně kyseliny arachidonové, prekursoru pro signalizačně důležité eikosanoidy. Existují studie popisující aktivaci PLA₂ při mozkové ischemii a studie ukazující zvýšenou lipidovou peroxidaci, dosud však žádná neprokázala přímou souvislost PLA₂ aktivity a neuronálního poškození během mozkové ischemie (Adibhatla a kol. 2006).

4.4 iPLA₂ A JEJÍ ÚLOHA V KARDIOPROTEKCI

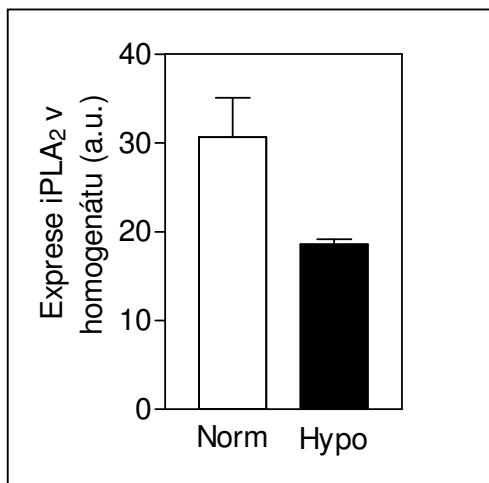
Jak již bylo zmíněno v úvodu kapitoly 4, hydrolýza membránových fosfolipidů PLA₂ vede k produkci nenasycených mastných kyselin a lysofosfolipidů. Produkce lysoplasmenylcholinu u normoxických kardiomyocytů spouští akční potenciály, které jsou zpožděné nebo naopak předčasné po předešlé depolarizaci, což vede ke vzniku arytmogeneze. Pokud je uvolněnou mastnou kyselinou kyselina arachidonová, může sloužit jako prekursor eikosanoidů, jejichž syntéza má v srdci přímý ionotropní a chronotropní efekt.

Aktivace tohoto enzymu během ischemie myokardu vede ke vzniku komorových arytmií a buněčnému poškození, proto použití specifického inhibitoru by tento její patofyziologický projev mohlo potlačit. V poslední době jsou k dispozici tři inhibitory pro potvrzení fyziologické role iPLA₂ – methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP), arachidonyl trifluoromethyl keton (AACOCF₃) a bromoenol lakton (BEL). MAFP a AACOCF₃ byly považovány za potencionální inhibitory cPLA₂, dokáží však inhibovat i iPLA₂. Oba tyto druhy PLA₂ mají totiž aktivní serinový zbytek, s nímž tyto inhibitory reagují, což vede k jejich inaktivaci. BEL tyto charakteristiky nemá a inhibuje pouze iPLA₂, je tedy více selektivní.

Předpokládá se, že inhibice iPLA₂ by mohla mít kardioprotektivní účinek. Specifický inhibitor by mohl chránit myokard před důsledky akutního ischemicko – reperfučního

poškození, před vznikem ischemických a reperfučních arytmií a buněčného letálního poškození.

Dostupných prací na toto téma je velmi málo. Jednou z nich je diplomová práce studentky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy Petry Forštové (2008), která na katedře biochemie zkoumala rozdíly v expresi iPLA₂ u normoxických a k ischemii odolných hypoxických potkanů. Z jejích předběžných výsledků vyplývá, že potkani adaptovaní na hypoxické podmínky exprimují menší množství iPLA₂ (Obr. 5), což může souviset právě s kardioprotektivním působením chronické hypoxie. Další experimenty v této oblasti jsou plánovány v rámci úzké spolupráce laboratoří Centra výzkumu chorob srdce a cév.



Obr. 5
Expese iPLA₂ v myokardu levé komory u normoxických a chronicky hypoxických potkanů.
Převzato z diplomové práce P. Forštové, 2008.

5. ZÁVĚR

V bakalářské práci jsem se snažila představit možné způsoby kardioprotekce. Důležitost zkoumání těchto dějů je zřejmá, neboť jejich účinky mohou zmírnit negativní projevy ischemie a ochránit tak srdeční myokard před vznikem ireverzibilního poškození. Dále jsem se snažila přiblížit význam enzymů označovaných jako fosfolipázy A₂, jejichž uplatnění v mechanismech ischemicko - reperfučního bylo již dříve popsáno, nicméně řada souvislostí zůstává dosud utajena. Předpoklad kardioprotektivních účinků inhibice iPLA₂ rozbor odborných článků jednoznačně potvrdil. Zdá se, že zablokování tohoto enzymu může ochránit myokard před důsledky akutního ischemicko - reperfučního poškození. Detailní analýza konkrétních intracelulárních mechanismů a zapojení iPLA₂ do patologických procesů v ischemickém myokardu však zatím chybí. Poznatky získané o mechanismech jeho působení mohou mít široké klinické uplatnění v souvislosti s léčbou nejen ischemického onemocnění srdce. Kromě zkoumání aktivity enzymu samotného, je důležitý i další výzkum funkcí a specificity potenciálních inhibitorů PLA₂. Jejich studium je klíčovou oblastí výzkumu možného farmakologického přínosu těchto sloučenin pro léčbu zánětu a buněčného poškození. Pro objasnění funkce a možné účasti PLA₂ v biologických odpovědích buňky se specifický inhibitor stává užitečným nástrojem, představující možnou cestu ke stanovení významu PLA₂ ve fyziologických funkcích, buněčném zranění a smrti.

6. POUŽITÁ LITERATURA

Adibhatla R, Hatcher J: Phospholipase A₂, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* 40: 376 – 387, 2006.

Akiba S, Sato T: Cellular function of calcium - independent phospholipase A₂. *Biol Pharm Bull* 27: 1174 – 1178, 2004.

Asemu G, Neckar J, Szárszoi O, Papoušek F, Ostadal B, Kolar F: Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats. *Physiol Res* 49: 597 – 606, 2000.

Béguin P, Joyeux-Faure M, Godin - Ribuoit D, Lévy P, Ribuoit C: Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia. *J Appl Physiol* 99: 1064 – 1069, 2005.

Chicco A, Sparagna G: Role of cardiolipin alternations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am Physiol Cell Physiol* 292: C33 – C44, 2007.

Cummings B, McHowat J, Schnellmann R: Phospholipase A₂s in cell injury and death. *JPET* 294: 793 – 799, 2000.

De Windt L, Willems J, Roemen T, Coumans W, Reneman R, Van der Vusse G, Van Bilsen M: Ischemic – reperfused isolated working mouse hearts: membrane damage and type IIA Phospholipase A₂. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2572 – H2580, 2001.

Fuentes L, Pérez R, Nieto M, Balsinde J, Balboa M: Bromoenol lactone promotes cell death by a mechanism involving phosphatidate phosphohydrolase - 1 rather than calcium - independent phospholipase A₂. *J Biol Chem* 278: 44683 – 44690, 2003.

Forštová P: Expresa na kalcium nezávislé fosfolipasy A₂ v myokardu adaptovaném na chronickou hypoxii. Diplomová práce, katedra Biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, 2008.

Gong M, Argobast S, Guo Z, Mathenia J, Su W, Reid M: Calcium - independent phospholipase A₂ modulates cytosolic oxidant activity and contractile function in murine skeletal muscle cells. *J Appl Physiol* 100: 399 – 405, 2006.

Hurtado A: Some clinical aspects of life at high altitudes. *Ann Intern Med* 53: 247 – 258, 1960.

Jenkins C, Wolf M, Mancuso D, Gross R: Identification of the calmodulin – binding domain of recombinant calcium – independent phospholipase A₂. *J Biol Chem* 276: 7129 – 7135, 2001.

Kinsey G, McHowat J, Beckett C, Schnellmann R: Identification of calcium - independent phospholipase A₂ in mitochondria and its role in mitochondrial oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F853 – F860, 2007.

Kukreja R: Mechanism of reactive oxygen species generation after opening of mitochondrial K_{ATP} channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H2041 – H2043, 2006.

Lawrence K, Townsend P, Davidson S, Carroll C, Eaton S, Hubank M, Knight R, Stephanou A, Latchmann D: The cardioprotective effect of urocortin during ischemia/reperfusion involves the prevention of mitochondrial damage. *Bioch Biophys Res Commun* 321: 479 – 486, 2004.

Li G, Bae S, Zhang L: Effect of prenatal hypoxia on heat stress – mediated cardioprotection in adult rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1712 – H1719, 2004.

Liu S, McHowat J: Stimulation of different phospholipase A_2 isoforms by TNF – α and IL – 1β in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 268: H1462 – H1472, 1998.

Mallet R, Ryou M, Williams A, Howard L, Downey H: β_1 – adrenergic receptor antagonism abrogates cardioprotective effects of intermittent hypoxia. *Basic Res Cardiol* 101: 436 – 446, 2006.

Mancuso D, Abendschein D, Jenkins Ch, Han X, Saffitz J, Schuessler R, Gross R: Cardiac ischemia activates calcium - independent phospholipase $A_2\beta$, precipitating ventricular tachyarrhythmias in transgenic mice. *J Biol Chem* 278: 22231 – 22236, 2003.

Martínez J, Moreno J: Role of Ca^{2+} - independent phospholipase A_2 on arachidonic acid release induced by reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 392: 257 – 262, 2001.

McHowat J, Creer M: Comparative roles of phospholipase A_2 isoforms in cardiovascular pathophysiology. *Cardiovasc Toxicol* 01: 253 – 265, 2001.

McHowat J, Liu S, Creer M: Selective hydrolysis of plasmalogen phospholipids by Ca^{2+} - independent PLA $_2$ in hypoxic ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 274: 1727 – 1737, 1998.

Meyer M, McHowat J: Calcium - independent phospholipase A_2 - catalyzed plasmalogen hydrolysis in hypoxic human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C251 – C258, 2007.

Meyer M, Kell P, Creer M, McHowat J: Calcium - independent phospholipase A_2 is regulated by a novel protein kinase C in human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C475 – C482, 2005.

Meyer M, Rastogi P, Beckett C, McHowat J: Phospholipase A_2 inhibitors as potential anti - inflammatory agents. *Current Pharm Design* 11: 1301 – 1312, 2005.

Murakami M: Hot topics in phospholipase A_2 field. *Biol Pharm Bull* 27: 1179 – 1182, 2004.

Neckar J, Ostadal B, Kolar F: Myocardial infarct size - limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiol Res* 53: 621 – 628, 2004.

Nijmeier R, Willemsen M, Meijer C, Visser C, Verheijen R, Gottlieb R, Hack C, Niessen H: Type II secretory phospholipase A₂ binds to ischemic flip – flopped cardiomyocytes and subsequently induces cell death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H2218 – H2224, 2003.

Osada-Oka M, Takahashi M, Akiba S, Sato T: Involvement of Ca²⁺ - independent phospholipase A₂ in the translocation of hypoxia - inducible factor - 1 α to the nucleus under hypoxic conditions. *Eur J Pharmacol* 549: 58 – 62, 2006.

Ostadal B, Kolar F: Cardiac adaptation to chronic high - altitude hypoxia: Beneficial and adverse effects. *Respir Physiol* 158: 224 – 236, 2007.

Ostadal B, Kolar F: Cardiac Ischemia: From Injury to Protection. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 1999.

Ostadalova I, Ostadal B, Jarkovska D, Kolar F: Ischemic preconditioning in chronically hypoxic neonatal rat heart. *Pediatr Res* 52: 561 – 567, 2002.

Park A, Suzuki Y: Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress – induced myocardial damage in mice. *J Appl Physiol* 102: 1806 – 1814, 2007.

Seleznev K, Zhao Ch, Zhang X, Song K, Ma Z: Calcium - independent phospholipase A₂ localizes in and protects mitochondria during apoptotic induction by staurosporine. *J Biol Chem* 281: 22275 – 22288, 2006.

Sevanian A: Lipid damage and repair, in *Oxidative Damage and Repair: Chemical, Biological, and Medical Aspects*. Pergamon Press, New York, 1988.

Steer S, Wirsig K, Creer M, Ford D, McHowat J: Regulation of membrane - associated iPLA₂ activity by a novel PKC isoform in ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C1621 – C1626, 2002.

Suzuki Y, Jain V, Park A, Day R: Oxidative stress and oxidant signaling in obstructive sleep apnea and associated cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 40: 1683 – 1692, 2006.

Williams S, Gottlieb R: Inhibition of mitochondrial calcium - independent phospholipase A₂ (iPLA₂) attenuates mitochondrial phospholipid loss and is cardioprotective. *Biochem J* 362: 23 – 32, 2002.

You H, Lee J, Yoo Y, Kim J: A pathway involving protein kinase C δ up – regulates cytosolic phospholipase A₂ α in airway epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 657 – 664, 2004.