

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Expresse na kalciu nezávislé fosfolipasy A₂
v myokardu adaptovaném na chronickou hypoxii**

Diplomová práce

Školitelé: doc. RNDr. František Novák, CSc.

doc. RNDr. Olga Nováková, CSc.

prof. RNDr. František Kolář, CSc.

Petra Forštová

Praha, 2008

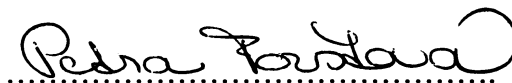
PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala svým školitelům doc. RNDr. Františku Novákovi, CSc., doc. RNDr. Olze Novákové, CSc. a prof. RNDr. Františku Kolářovi, CSc. za předané praktické znalosti, trpělivý přístup, cenné poznatky a připomínky při sepisování této diplomové práce. Děkuji kolektivu našeho pracoviště za účinnou pomoc a nesčetné rady během experimentální práce. Chtěla bych také velmi poděkovat svým rodičům a svému partnerovi za všestrannou podporu a pochopení.

PROHLÁŠENÍ

Já, Petra Forštová, studentka 2.ročníku navazujícího magisterského studia oboru Biochemie Přírodovědecké fakulty, Praha 2, Albertov 6, 128 43 – součást Univerzity Karlovy v Praze se sídlem v Praze 1, Ovocný trh 3-5, 116 36 (IČ: 00216208), jsem v rámci plnění studijních povinností vypracovala v akademickém roce 2007/2008 diplomovou práci s názvem „Expresse na kalcium nezávislé fosfolipasy A₂ v myokardu adaptovaném na chronickou hypoxii“. Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelů doc. RNDr. Františka Nováka, CSc., doc. RNDr. Olgy Novákové, CSc. a prof. RNDr. Františka Koláře, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 1.5.2008

Handwritten signature of Petra Forstova in cursive script, written over a dotted line.

Podpis

OBSAH

Poděkování.....	2
Prohlášení.....	3
Obsah	4
Seznam zkratk	7
1. ÚVOD.....	11
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	13
2.1 Protekce ischemického myokardu.....	13
2.1.1. Preconditioning.	13
2.1.2. Chronická hypoxie.....	14
2.1.2.1. Kardioprotektivní účinky chronické hypoxie	15
2.1.2.2. Další důsledky adaptace na vysokou nadmořskou výšku.....	17
2.1.2.3. Reversibilita změn vyvolaných adaptací	17
2.1.3. Reaktivní formy kyslíku (ROS).....	18
2.1.3.1. N-acetylcystein (NAC)	20
2.1.3.2. ROS a jejich role v signálních kaskádách.....	21
2.2. Fosfolipasy	22
2.2.1. Fosfolipasy v myokardu.....	24
2.2.1.1. Fosfolipasy C a D	24
2.2.1.2. Fosfolipasy A ₂	24
2.2.2. Na kalcium nezávislé fosfolipasy A ₂ (iPLA ₂).....	27
2.2.2.1. Funkce iPLA ₂	28
2.2.2.2. Aktivace a inhibice iPLA ₂	30
2.2.2.3. iPLA ₂ , peroxidace fosfolipidů a oxidační stres	31
2.2.2.4. iPLA ₂ a apoptóza	32
2.2.2.5. iPLA ₂ v myokardu	33
3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	35
4. MATERIÁL A METODY.....	36
4.1 Laboratorní zvířata	36
4.2 Experimentální model intermitentní výškové hypoxie.....	36
4.2.1. Vliv intermitentní výškové hypoxie	36

4.2.2.	Vliv N-acetylcysteinu (NAC)	37
4.2.3.	Odběr tkáně	37
4.3	Zdroje používaných chemikálií	38
4.4.	Homogenizace.....	38
4.4.1.	Příprava homogenizačního pufru 3S.....	38
4.4.2.	Homogenizační postup	39
4.5.	Frakcionace	40
4.5.1.	Frakcionační postup v případě distribuce iPLA ₂ v buněčných frakcích normoxického myokardu	40
4.5.1.1.	Příprava jednotlivých buněčných frakcí a jejich extraktů	41
4.5.2.	Frakcionační postup v případě studie vlivu adaptace na chronickou hypoxii na expresi iPLA ₂	43
4.5.2.1.	Příprava extraktů.....	43
4.6.	Stanovení koncentrace proteinů	44
4.6.1.	Princip metody	45
4.6.1.1.	Postup stanovení koncentrace proteinů.....	46
4.7.	Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE).....	47
4.7.1.	Příprava elektroforetických gelů.....	47
4.7.2.	Příprava vzorků pro elektroforézu	48
4.8.	Elektropřenos proteinů na nitrocelulóзовé membrány (Western blotting).....	51
4.8.1.	Postup elektropřenosu proteinů na nitrocelulóзовé membrány.....	51
4.9.	Protilátky	52
4.10.	Imunodetekce iPLA₂.....	53
4.10.1.	Postup imunodetekce iPLA ₂	53
4.11.	Metoda zesílené chemiluminiscence (ECL)	55
4.11.1.	Princip metody	55
4.11.2.	Postup ECL	56
4.12.	Skenování filmů na stolním skeneru	57
4.12.1.	Princip metody	57
4.12.2.	Postup skenování	57
4.13.	Vyhodnocení signálu.....	58

4.13.1.	Postup vyhodnocování.....	58
4.14.	Zpracování dat	59
4.15.	Statistické zpracování výsledků.....	59
5.	VÝSLEDKY	60
5.1.	Hmotnostní parametry	60
5.2.	Distribuce iPLA₂ v buněčných frakcích normoxického myokardu	61
5.3.	Extrakce iPLA₂ Tritonem X-100	62
5.3.1.	Distribuce iPLA ₂ v buněčných frakcích normoxického myokardu po extrakci Tritonem X-100	62
5.3.2.	Účinnost extrakce iPLA ₂ Tritonem X-100.....	64
5.4.	Koncentrace proteinů v cytosolu, extraktech homogenátu a partikulární frakce	64
5.5.	Expresce iPLA₂ v normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komoře myokardu potkana	65
5.5.1.	Expresce iPLA ₂ v homogenátu.....	65
5.5.2.	Expresce iPLA ₂ v cytosolu a partikulární frakci	66
5.5.3.	Distribuce iPLA ₂ mezi cytosolem a partikulární frakcí.....	68
5.6.	Vliv NAC na expresi iPLA₂ v extraktech homogenátu v normoxickém a na chronickou hypoxii adaptovaném myokardu	69
6.	DISKUZE	72
6.1.	Imunodetekce iPLA₂ v srdci	72
6.2.	Distribuce iPLA₂ v buněčných frakcích normoxického myokardu, extrakce detergentem	72
6.3.	Expresce a distribuce iPLA₂ v normoxickém a na chronickou hypoxii adaptovaném myokardu – vliv NAC	74
6.3.1.	Hmotnostní parametry	74
6.3.2.	Expresce a distribuce iPLA ₂	74
6.3.3.	Úloha ROS a vliv NAC	76
7.	SHRNUTÍ	78
	Seznam použité literatury	79
	Souhlas se zapůjčením	92

SEZNAM ZKRATEK

AA.....	kyselina arachidonová (z angl. <i>arachidonic acid</i>)
APS	persíran amonný
Asp.....	kyselina asparagová
ATP	adenosin-5-trifosfát
BEL.....	bromenollakton
Bisakrylamid.....	N,N'-methylenbisakrylamid
BPS	bromfenolová modř
BSA.....	albumin z hovězího séra (z angl. <i>bovine serum albumin</i>)
BW	tělesná hmotnost (z angl. <i>body weight</i>)
C.....	cytosolická frakce
CaLB.....	kalmodulin lipid-vázající doména (z angl. <i>calmodulin lipid-binding domain</i>)
CCD	polovodičový prvek pro detekci světelného záření (z angl. <i>charge coupled devic</i>)
CMC.....	kritická micelární koncentrace (z angl. <i>critical micelar concentration</i>)
DAG.....	1,2-diacylglycerol
DMSO.....	dimethylsulfoxid
Dpi	počet bodů na palec (z angl. <i>densitometric volume</i>)
DTT.....	D,L-dithiothreitol
D.V.....	denzitometrický objem
ECL.....	metoda zesílené chemiluminiscence (z angl. <i>enhanced chemiluminiscence</i>), obchodní známka firmy Amersham
EDTA.....	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA.....	ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
ER	endoplasmatické retikulum
FA	mastná kyselina, mastné kyseliny (z angl. <i>fatty acid, fatty acids</i>)
GA.....	Golgiho aparát
DHAP.....	dihydroxyacetonfosfát
Gly	glycin
GP	glycerolfosfát

PE.....	extrakt partikulární frakce
PGs.....	prostaglandiny
PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (z angl. <i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>)
PI.....	fosfatidylinositol
PKC.....	proteinkinasa C
PLA ₁	fosfolipasa A ₁ (z angl. <i>phospholipase A₁</i>)
PLA ₂	fosfolipasa A ₂ (z angl. <i>phospholipase A₂</i>)
cPLA ₂	intracelulární cytosolická fosfolipasa A ₂ (z angl. <i>cytosolic phospholipase A₂</i>)
iPLA ₂	intracelulární na kalcium nezávislá fosfolipasa A ₂ (z angl. <i>calcium-independent phospholipase A₂</i>)
sPLA ₂	extracelulární sekretovaná fosfolipasa A ₂ (z angl. <i>secretoric phospholipase A₂</i>)
PLB	fosfolipasa B (z angl. <i>phospholipase B</i>)
PLC	fosfolipasa C (z angl. <i>phospholipase C</i>)
PLD.....	fosfolipasa D (z angl. <i>phospholipase D</i>)
PMA.....	forbol-12-myristát-13-acetát
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
pO ₂	parciální tlak kyslíku
PS	fosfatidylserin
ROS.....	reaktivní molekuly kyslíku (z angl. <i>reactive oxygen species</i>)
rpm	otáčky za minutu (z angl. <i>revolutions per minute</i>)
RV.....	pravá komora srdeční
S	septum
SDC.....	deoxycholát sodný
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (z angl. <i>sodium dodecyl sulfate- polacrylamide gel electrophoresis</i>)
S.E.M.	střední chyba průměru (z angl. <i>standard error of the mean</i>)
Ser	serin
SOD	superoxiddismutasa (z angl. <i>superoxide dismutase</i>)

TCAkyselina trichloroctová
TEMED.....N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
Thr.....threonin
TIFF8-bitový formát pro soubory bitmapových obrázků (z angl. *tagged image file format*)
TNFtumor necrosis faktor
Tristris(hydroxymethyl)aminomethan
TRXthioredoxin
TTBS.....fyziologický roztok pufovaný Tweenem 20
TXs.....tromboxany
TX-100.....Triton X-100
v/vředění objem/objem (z angl. *volume/volume*)
w/vředění hmotnost/objem (z angl. *weight/volume*)
3Shomogenizační pufr se sacharosou
3ST.....homogenizační pufr se sacharosou a Tritonem X-100

1. ÚVOD

Mezi civilizační onemocnění, která souvisejí se životním stylem moderní doby a jsou hlavní příčinou nemocnosti a úmrtí, patří kardiovaskulární onemocnění. Pod tento pojem zahrnujeme např. aterosklerózu srdečních tepen, cévní a mozkové příhody a infarkt myokardu. Hlavními příčinami těchto chorob jsou genetické dispozice a řada skutečností, které ovlivňují náš každodenní život (nadměrná konzumace jídla, nedostatek pohybu, alkohol, cigarety, zvýšená stresová zátěž). Choroby srdce a oběhového systému jsou nejčastější příčinou úmrtí obyvatel rozvinutých zemí světa včetně České republiky, zvláště ischemická choroba srdeční a infarkt myokardu. Za naprostou většinou kardiovaskulárních onemocnění stojí koronární ateroskleróza.

V současné době se soustřeďuje velké úsilí na objasnění příčin a mechanismů srdečních onemocnění. Hledají se cesty, kterými lze zvýšit odolnost srdečního svalu proti ischemickému poškození. V dnešní době je již známo několik způsobů indukce endogenní protekce myokardu vůči poškození – jde zejména o tzv. preconditioning a adaptaci myokardu na chronickou hypoxii.

Preconditioning jsou opakované krátkodobé epizody ischemie. Kardioprotektivní působení preconditioningu trvá řádově hodiny, zatímco v myokardu adaptovaném na chronickou hypoxii přetrvává protektivní efekt dny, týdny až měsíce. Adaptace na chronickou hypoxii dlouhodobě zlepšuje odolnost myokardu vůči akutnímu ischemicko/reperfúznímu poškození. Mechanismy těchto jevů však nejsou podrobně známy.

V laboratoři Vývojové kardiologie Fyziologického ústavu AV ČR bylo prokázáno, že adaptace na dlouhodobou chronickou hypoxii snižuje výskyt a závažnost ischemického a reperfúzního poškození, významně snižuje velikost infarktového ložiska a zlepšuje opravu kontraktilní funkce myokardu během reperfúze.

V procesu adaptace na chronickou hypoxii hraje roli celá řada enzymů. V naší laboratoři bylo prokázáno, že po adaptaci na chronickou hypoxii se zvyšuje relativní množství proteinkinasy C δ (PKC δ) v myokardu potkana, zatímco v případě proteinkinasy ϵ (PKC ϵ), která se vyskytuje zejména na membránách, dochází k poklesu jejího relativního množství. Dále bylo prokázáno, že významnou roli hrají ROS, jejichž zvýšená produkce při adaptaci na chronickou hypoxii je provázána vzestupem relativního množství manganové superoxididismutasy (MnSOD) v srdci, která chrání fosfolipidy před oxidačním poškozením.

V diplomové práci jsme vycházeli z hypotézy, že by se mohla na mechanismu protekce vyvolané v srdečním svalu po adaptaci na chronickou hypoxii také podílet na kalcium nezávislá fosfolipasa A₂ (iPLA₂), která může působit, jak protektivně při remodelaci poškozených buněčných membrán, tak nepříznivě tím, že za různých patologických stavů degraduje membránové fosfolipidy za současné produkce metabolitů s detergenčními účinky. Z celé řady prací vyplývá, že cílená farmakologická regulace aktivity iPLA₂ v myokardu by mohla znamenat nový terapeutický přístup při ochraně myokardu v podmínkách ischemie/reperfúze.

Diplomová práce byla vypracována na Katedře biochemie Přírodovědecké fakulty UK ve spolupráci s Oddělením vývojové kardiologie Fyziologického ústavu AV ČR v Praze.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Protekce ischemického myokardu

Slovo ischemie vzniklo z řeckého *ischó* (= zadržuje) a *haima* (= krev). Jedná se o patologický stav po částečném nebo úplném přerušení krevního toku v orgánech nebo částech těla, který vede k jejich poškození až odumření – zejména v důsledku hypoxie. Jde o nedostatek kyslíku a živin ve tkáni spojený s hromaděním odpadních produktů. Vlivem ischemie dochází k rozvoji strukturálních, funkčních a metabolických změn, které vedou k poklesu kontraktilní funkce myokardu, přičemž se objevují arytmie a v konečném důsledku dochází ke smrti myocytů a srdečnímu selhání ⁽¹⁾. Ischemie může ireverzibilně poškodit srdeční buňky. Paradoxem je, že k největšímu poškození ischemických buněk dochází právě při reperfúzi neboli obnovení průtoku krve v určité oblasti organismu, což vede ke zvýšené kontrakci myokardu a poškození membrán ⁽²⁾.

Tkáň myokardu se dokáže bránit proti poškození aktivací vlastních endogenních protektivních mechanismů. V dnešní době jsou nejefektivnějšími způsoby protekce myokardu vůči poškození krátkodobá adaptace na sérii krátkých ischemických epizod (preconditioning) a dlouhodobá adaptace myokardu na chronickou hypoxii.

2.1.1. Preconditioning

Murry a spol. v roce 1986 ⁽³⁾ poprvé popsali jev označovaný jako preconditioning. Jde o protektivní adaptační mechanismus vyvolaný krátkými periodami ischemie, které jsou oddělené periodami reperfúze. Tato endogenní protektivní adaptace chrání myokard před poškozením v průběhu následující dlouhodobé ischemie. Ačkoliv je preconditioning od svého objevu intenzivně studován, stále není objasněn jeho mechanismus. Protekce, jež byla dosažena preconditioningem, je pouze přechodná a probíhá ve dvou fázích:

- 1) První, tzv. klasická forma preconditioningu trvá asi 2 – 3 hodiny po aplikaci spouštěcího ischemického podnětu.
- 2) Druhá, tzv. druhé okno protekce nastává přibližně 12 – 24 hodin po ischemickém podnětu a ochrana jím poskytovaná trvá 3 – 4 dny ⁽⁴⁾.

Preconditioning lze simulovat také řadou farmakologických látek – jde o tzv. farmakologický preconditioning. Patří sem opioidy, adenosin, ethanol, bradykinin ⁽⁵⁾, a dále také forbol-12-myristát-13-acetát (PMA) a 1,2-dioktanoyl-glycerol ^(6,7).

2.1.2. Chronická hypoxie

Slovo hypoxie vzniklo z řeckého *hypo* (= pod) a *oxygenium* (= kyslík). Jde o nedostatek kyslíku v tělesných tkáních nebo v celém organismu, v jehož důsledku dochází k omezení činnosti příslušné tkáně.

V literatuře se často zaměňují pojmy ischemie a hypoxie. Oba dva jevy jsou charakterizovány sníženou dodávkou kyslíku do myokardu. Při hypoxii je zachován koronární průtok, zásobení myokardu substráty a odstraňování odpadních produktů (např. laktát, H^+ a K^+). Při ischemii je přerušeno přívod substrátů do postižené oblasti, nejsou odváděny odpadní produkty metabolismu a dochází k poklesu pH v cytoplasmě ⁽²⁾. Zatímco ischemie postihuje pouze tu oblast, kde bylo zásobení krví přerušeno uzavřením artérie, hypoxie postihuje většinou celý myokard ⁽⁸⁾.

Dle časového hlediska lze hypoxii rozdělit na:

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

Hypoxie je způsobena špatnou funkcí některého článku při transportu kyslíku k buňkám, proto se dle příčin vzniku dělí na ⁽⁹⁾:

- **hypoxemická** – parciální tlak kyslíku v arteriální krvi je snížen nebo je nízká koncentrace kyslíku ve vdechovaném vzduchu (patří sem i hypoxie vyvolaná vysokou nadmořskou výškou), krev nemůže být dostatečně okysličená
- **cytotoxická** – dodávka kyslíku je dostatečná, ale jeho využití mitochondriemi je inhibováno toxickými látkami
- **anemická** – parciální tlak kyslíku je normální, ale je snížena transportní kapacita krve pro kyslík, způsobuje ji nedostatečný počet krvinek nebo špatná funkce hemoglobinu
- **ischemická (cirkulační)** – vzniká nedostatečným průtokem krve kapilárami, nastává např. při selhání srdce

- **hypoxie způsobená příliš dlouhou difúzní drahou** – tkáň hypertrofuje bez současného zvýšení hustoty kapilár
- **histotoxická** – buňky nejsou schopné kyslík zužitkovat, nastává např. při otravě alkoholem, drogami nebo jinými látkami

Všechny výše uvedené druhy hypoxie mají své fyziologické a patologické projevy – např. hypertrofie pravé komory srdeční, plicní hypertenze, akutní infarkt myokardu, chronická ischemická choroba srdeční, cyanóza apod. ⁽¹⁰⁾. Existují pouze dva případy, kdy lze hypoxický stav považovat za přirozený fyziologický jev ⁽⁸⁾:

- fetální myokard
- myokard obyvatel trvale žijících ve vysokých nadmořských výškách

Odolnost srdce proti poškození může být zvýšena po adaptaci na chronickou hypoxii. Příkladem je adaptace srdce na chronickou hypoxii ve vysoké nadmořské výšce. Od 50.let 20.století je známo, že u lidí žijících ve vysoké nadmořské výšce je pozorován nižší výskyt infarktu myokardu ⁽¹¹⁾. Adaptace způsobuje řadu funkčních a strukturálních změn, jež slouží k zachování homeostázy.

V řadě studií bylo zjištěno, že na myokard působí účinně nejen permanentní chronická hypoxie ⁽¹²⁾, ale i hypoxie přerušovaná (intermittent high altitude hypoxie – IHA) ⁽¹¹⁾. Přerušované působení hypoxického podnětu několik hodin denně po několik dní (např. 4 hodiny denně, 24 expozic) ⁽¹¹⁾ vede jak k pozitivním, tak i negativním důsledkům adaptace na chronickou hypoxii ^(10, 13, 14).

Termín „vysoká nadmořská výška“ není přesně definován. Řada laboratoří považuje výšku 3000 metrů nad mořem za minimální výšku pro rozvoj hypoxických změn u člověka. V dalších studiích bylo prokázáno, že k fyziologickým a patologickým změnám myokardu může docházet i v mnohem nižších nadmořských výškách ⁽¹⁵⁾.

2.1.2.1. Kardioprotektivní účinky chronické hypoxie

Kardioprotektivní účinky chronické hypoxie na vysokou nadmořskou výšku se projevují zmenšením velikosti infarktového ložiska, poklesem ischemických arytmií, především tachykardií a také zlepšením obnovy kontraktilní funkce myokardu během

reperfúze ^(16, 17, 18). Tyto a další studie prokázaly, že myokard adaptovaný na vysokou nadmořskou výšku je mnohem odolnější vůči projevům akutního ischemického poškození.

Stále není zcela znám detailní mechanismus působení chronické hypoxie, nicméně jsou známy některé okolnosti, jež přispívají k protekci srdce vůči ischemickému poškození – patří mezi ně např. ekonomičtější využití energetického metabolismu, plicní adaptace, krevní zásobení myokardu a koronární průtok.

Při adaptaci na chronickou hypoxii dochází ke změnám energetického metabolismu v srdečním svalu. Tyto změny znamenají nárůst kapacity aerobního metabolismu, což je doprovázeno zvýšením počtu mitochondrií a jejich zvýšenou schopností produkovat energii, vyšší koncentrací nebo aktivitou mitochondriálních enzymů a cytochromu, a tím i vyšší účinností oxidační fosforylace ⁽⁸⁾.

Dochází i k adaptaci plic. Vdechování vzduchu se sníženým obsahem kyslíku ve vysokých nadmořských výškách vyvolává v plicích změny, jež vedou ke zvýšení alveolární koncentrace kyslíku, a tím i k lepšímu sycení erytrocytů. Vlivem těchto změn mají lidé žijící ve vysokých nadmořských výškách zvětšený aktivní povrch plic, zvýšený plicní objem a difúzní kapacitu plic pro výměnu plynů ⁽⁸⁾.

Adaptace organismu na chronickou hypoxii ve vysoké nadmořské výšce vede ke změnám cirkulace krve. V srdci se reflexivně zvyšuje oběh krve, čímž dochází ke kompenzaci nedostatku kyslíku v dané tkáni. Dlouhodobé působení vysoké nadmořské výšky vede ke změnám krevního složení a cévního zásobení. K růstu transportní kapacity krve pro kyslík dochází zvýšením koncentrace hemoglobinu ⁽⁸⁾.

V počátcích adaptace také dochází ke zvýšení srdeční frekvence, minutového výdeje a ke změnám v orgánové distribuci krve, přednostně jsou ale kyslíkem zásobeny orgány (srdce, mozek), které jsou důležité pro přežití organismu ⁽⁸⁾.

Důležitou roli v protekci myokardu adaptovaného na výškovou hypoxii mohou hrát i eikosanoidy – mediátory zánětlivého procesu. Poklesne-li tlak kyslíku v srdci, dochází ke zvýšení syntézy vasodilatačních prostacyklinů a následně ke zvýšení koronárního průtoku ⁽¹⁹⁾. Adaptace na chronickou hypoxii spouští syntézu tzv. stresových proteinů („heat shock proteins“ – HSP). Tyto bílkoviny během ischemie dočasně chrání životně důležité intracelulární struktury a buněčná činnost je po ukončení stresu obnovena ⁽²⁰⁾. Chronická hypoxie také ovlivňuje autonomní nervový systém a endokrinní žlázy. Na počátku adaptace sice dochází ke zvýšení adrenergní aktivity, ale potom postupně ke snížení citlivosti myokardu k β -adrenergnímu působení katecholaminů poklesem hustoty β -adrenergních receptorů,

což je jeden z možných antiarytmogenních mechanismů při ischemii ⁽²¹⁾. Adaptace může vyvolat i hypothyreózu. Při poklesu koncentrace thyroïdních hormonů se zvyšuje schopnost srdce využívat energii, naopak hyperthyreóza zvyšuje citlivost myokardu k ischemii ⁽²²⁾.

2.1.2.2. Další důsledky adaptace na vysokou nadmořskou výšku

Vlivem adaptace na chronickou hypoxii dochází ke konstrikcii plicních arteriol a k následné přestavbě jejich stěny. Následkem je plicní hypertenze, která ovlivňuje pravou komoru srdeční. Dochází k jejímu přetížení a vzniku hypertrofie ^(11, 23). V počátku svého vzniku je hypertrofie považována za pozitivní adaptační proces, jenž umožňuje dočasnou kompenzaci zvýšené zátěže ⁽²⁴⁾. Nicméně i tak je plicní hypertenze a hypertrofie pravé komory negativním důsledkem adaptace na IHA hypoxii, které mohou v konečném důsledku vést až k srdečnímu selhání. Studie s potkany adaptovanými na IHA hypoxii prokázaly morfologické změny myokardu včetně vzniku drobných nekrotických ložisek převážně v pravé komoře ⁽²⁴⁾.

U většiny živočišných druhů, včetně člověka, se působením výškové hypoxie vyvine výrazná polycytémie neboli trvale zvýšený počet červených krvinek a krevního barviva ⁽²⁵⁾. Vlivem polycytémie se zvyšuje krevní viskozita, a tím i zátěž srdce.

Adaptace na chronickou hypoxii je také spojena se zvýšeným oxidačním stresem ⁽¹¹⁾. Zvýšená produkce ROS a oxidační poškození tkání je zahrnuta v patogenezi hypoxické plicní hypertenze ⁽¹¹⁾. Zdá se, že ROS přispívají k ischemicko/reperfúznímu poškození v normoxických srdcích potkanů, ale na druhou stranu se účastní i protektivního mechanismu, který vyvolává chronická hypoxie ⁽¹¹⁾. Tsujimoto a kol. také dokázali, že chronická hypoxie může indukovat apoptózu ⁽²⁶⁾.

2.1.2.3. Reversibilita změn vyvolaných adaptací

Adaptace organismu na chronickou hypoxii zvyšuje schopnost organismu udržet si odolnost vůči akutnímu nedostatku kyslíku poměrně dlouho po ukončení adaptace.

Při návratu do normoxických podmínek se změny vyvolané adaptací na chronickou hypoxii ve vysokých nadmořských výškách (polycytémie, pokles tělesné hmotnosti, pravostranná srdeční hypertrofie, plicní hypertenze, metabolické změny) vrací za určitou dobu k normálním hodnotám.

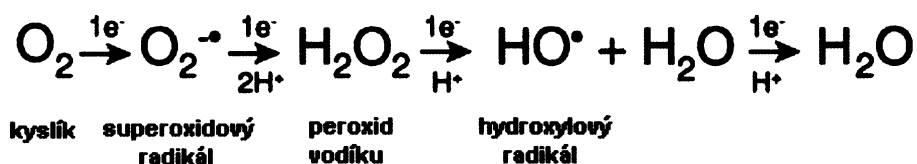
Tělesná hmotnost zvířat se v experimentu vrátila ke kontrolním hodnotám po dvou týdnech po ukončení hypoxie ⁽¹⁶⁾. Hmotnost pravé komory, tlak v malém oběhu a koncentrace hemoglobinu se vrátily k původním hodnotám až o dva týdny později ^(10, 22, 27).

2.1.3. Reaktivní formy kyslíku (ROS)

Aerobní buňky produkují ROS jako vedlejší produkty různých metabolických procesů. ROS jsou vysoce reaktivní molekuly s relativně krátkou životností. Největším zdrojem ROS jsou mitochondrie, které spotřebují více než 90 % kyslíku užívaného buňkou, neboť jsou jejím respiračním a energetickým centrem ^(28, 29, 30). ROS vznikají zejména v komplexu I a komplexu III dýchacího řetězce ^(28, 31). Dále jsou endogenními zdroji ROS např. cytochrom P450, xanthinoxidasa, cyklooxygenasa, lipooxygenasa, NAD(P)H-oxidasa. Mezi exogenní zdroje ROS patří průmyslové zplodiny, radioaktivní záření, UV záření apod.

Redukcí jednoho elektronu molekuly O₂ vzniká superoxidový radikál O₂^{•-}, který je při fyziologickém pH jen mírně reaktivní ^(28, 29, 32, 33). Může snadno dismutovat, buď samovolně, nebo vlivem SOD enzymů ^(28, 29, 32, 33). Dismutace jsou oxidační reakce mezi organickými molekulami. Dismutací O₂^{•-} zpravidla vzniká H₂O₂ ^(28, 29, 32, 33). V přítomnosti redoxních kovových iontů (např. Fe, Cu) se může H₂O₂ homolyticky štěpit, to znamená, že vzniká vysoce reaktivní hydroxylový radikál HO[•], nejnebezpečnější produkt ROS (viz obrázek č.1) ^(28, 32, 33).

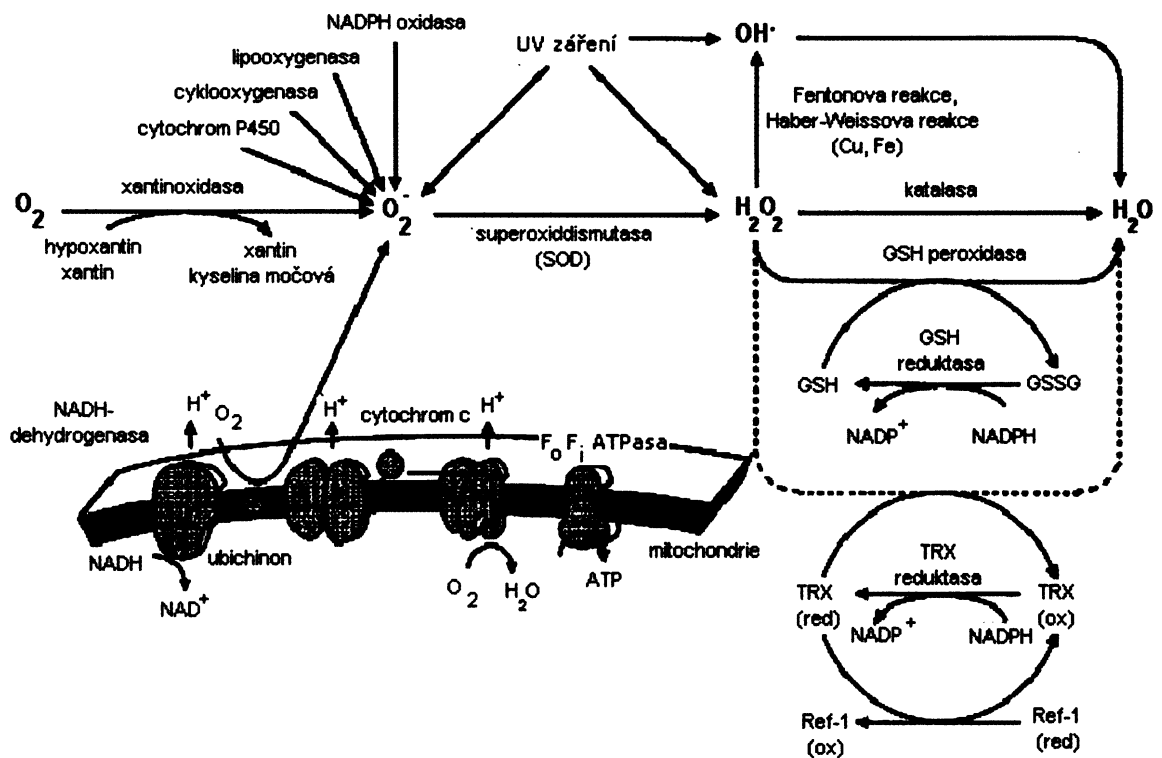
Obrázek č.1 – Postupná redukce molekuly kyslíku ⁽³⁴⁾



Tyto radikály mohou být eliminovány pomocí antioxidantů (viz obrázek č.2). Antioxidanty jsou klasifikovány dle místa produkce na endogenní (např. superoxid-dismutasa, katalasa, glutathionperoxidasa) a exogenní (vitamin E, vitamin C, selen aj.). Je prokázáno, že antioxidanty mohou působit několika mechanismy⁽¹⁸⁾:

- a) inhibují tvorbu ROS
- b) vycytávají ROS a jejich prekurzory
- c) zmírňují katalýzu při produkci ROS prostřednictvím vazby kovových iontů
- d) zvyšují produkci endogenních antioxidantů
- e) redukují počet apoptotických buněk

Obrázek č.2 – Zdroje ROS a intracelulární antioxidační obrana



GSH – oxidovaná forma glutathionu, GSSG – redukovaná forma glutathionu, TRX – thioredoxin⁽³⁵⁾.

Při oxidačním stresu dochází mj. k peroxidaci fosfolipidů (viz. kapitola 2.2.2.3.) a oxidaci thiolových skupin proteinů, čímž dochází ke změnám propustnosti a struktury membrány ⁽¹⁸⁾. ROS také stimulují uvolnění AA ⁽³⁶⁾ a cytokinů z ischemických buněk, které zvyšují adhezi molekul, mobilizaci a aktivaci leukocytů, krevních destiček, což v důsledku produkuje další ROS ⁽³⁷⁾. Bylo prokázáno, že zvýšená koncentrace superoxidových radikálů přispívá k rozvoji aterosklerózy ⁽³⁸⁾.

Oxidační stres způsobuje poškození buněčné struktury, která vede k nevratným změnám buněčného metabolismu. Zvýšená produkce ROS přispívá k některým fyziologickým a patologickým procesům – např. stárnutí buněk, karcinogenezi, neurodegenerativním chorobám a k poškození buněk během ischemie a reperfúze.

2.1.3.1. N-acetylcystein (NAC)

NAC je acetylovaná forma aminokyseliny L-cysteinu. Tato sloučenina obsahuje sulfhydrylovou (-SH) skupinu. V organismu se rychle vstřebává do různých tkání. Metabolismus a deacylace NAC probíhá v tenkém střevě a játrech ⁽³⁹⁾. Výsledkem tohoto metabolismu je zabudování NAC do proteinových řetězců a tvorba různých metabolitů NAC ⁽³⁹⁾. Pouze malé procento neporušené molekuly NAC přechází do plasmy a následně do tkání ^(39, 40). Sulfhydrylová skupina je zodpovědná za velkou část metabolické aktivity NAC, zatímco acetylovaná aminoskupina stabilizuje sloučeninu před oxidací ^(39, 41).

Účinky NAC jsou především ve schopnosti redukovat extracelulární cystin na cystein. NAC působí také jako zdroj SH-skupin, čímž může NAC stimulovat syntézu GSH, zvýšit aktivitu glutathion-S-transferasy a napomáhat detoxifikaci. Dále také vylučuje ROS, jež jsou schopné snížit koncentraci superoxidového anionu ($O_2^{\cdot -}$) ⁽¹⁸⁾, hydroxylového radikálu ($OH\cdot$) a peroxidu vodíku (H_2O_2) ^(39, 42, 43). Aplikace NAC zvyšuje koncentraci GSH v tkáni ⁽⁴⁴⁾. NAC je významným zdrojem Cys pro syntézu GSH – látky podílející se na správném redoxním prostředí buňky ⁽⁴⁴⁾. Především tímto mechanismem působí NAC antioxidantně.

NAC má různé klinické použití – např. při srdečních chorobách, rakovině, respiračních onemocněních, nemocech spojených s kouřením, chřipce, HIV viru, předávkování acetaminofenem (paracetamolem), alkalickém poškození jícnu, epilepsii, chelataci těžkých kovů ⁽³⁹⁾.

Některé studie ukazují protektivní vliv NAC vůči ischemicko/reperfúznímu poškození prostřednictvím snížení koncentrace homocysteinu a lipoproteinů pomocí disociace jejich disulfidických můstků^(39, 45, 46). Vysoké koncentrace homocysteinu a lipoproteinů totiž zvyšují náchylnost ke kardiovaskulárním chorobám. Na srdce má pozitivní dopad i zvýšená syntéza GSH vlivem NAC, popř. schopnost NAC vylučovat ROS^(39, 47, 48).

Adaptace na chronickou hypoxii zvyšuje množství ROS⁽⁴⁹⁾. Zdá se, že v procesu adaptace na chronickou hypoxii hraje roli celá řada enzymů. Bylo prokázáno, že ROS zvyšují relativní množství manganové superoxididismutasy (MnSOD) v srdci⁽⁵⁰⁾, která chrání fosfolipidy před poškozením. Naším cílem bylo zjistit, zda ROS působí i na iPLA₂, která je významná při remodelaci membránových fosfolipidů.

2.1.3.2. ROS a jejich role v signálních kaskádách

Studie v posledních letech zjistily, že je mnoho intracelulárních signálních drah regulováno právě ROS (hlavně O₂⁻ a H₂O₂)⁽³⁸⁾. Redoxní reakce, při kterých se produkují ROS, jsou považovány za velice důležité mediátory přenosu signálu zahrnuté v regulaci buněčného růstu a diferenciaci^(51, 52).

Ačkoliv jsou ROS zapojeny do mnoha signálních drah, zatím se nepodařilo podrobně objasnit molekulární cíle jejich účinku⁽⁵³⁾. Nicméně exogenní ROS mohou aktivovat MAPK (mitogen aktivující proteinkinasy) signální kaskády (dráhy: ERK 1/2, JNK, p38 MAPK)^(35, 54). JNK a p38 jsou na rozdíl od ERK 1/2 převážně aktivovány stresovým impulsem, který zahrnuje i oxidační stres.

ROS mohou být také zahrnuty do specifických signálních kaskád, které vedou k apoptóze⁽²⁶⁾, což v počáteční fázi ischemie může být kardioprotektivní, protože dle posledních studií ROS aktivují MAPK, které následně aktivují PLA₂^(35, 55). V pozdější fázi ischemie aktivita PLA₂ klesá⁽⁵⁶⁾.

2.2. Fosfolipasy

Fosfolipasy patří do skupiny enzymů hydrolas – podílejí se tedy na hydrolyze fosfolipidů. Pro své biologické funkce jsou životně důležité.

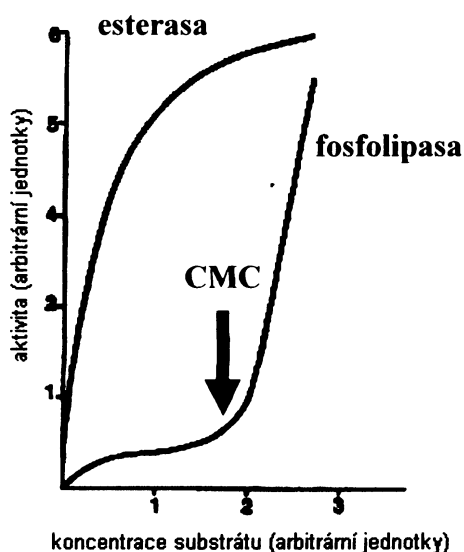
Fosfolipasy – biologické funkce:

- 1) produkce signálních molekul
 - řada fosfolipas se účastní při tvorbě prostaglandinů – mediátorů zánětu
- 2) kontinuální remodelace membrán
 - udržují membránovou homeostázu – zajišťují správné složení, a tím i funkci biologických membrán
- 3) trávení živin
 - pomáhají trávit fosfolipidy, které přijímáme v potravě (hlavně sekreторické fosfolipasy)
- 4) ochrana před bakteriální infekcí
 - některé fosfolipasy mají schopnost proniknout membránou a opravit ji
- 5) složka toxinů (př. hadí jedy)
 - byly identifikovány v řadě jedů

Fosfolipasy působí na interfázi lipid – voda, mají tedy nízkou specifitu pro monomerní substrát. Substrát musí překonat tzv. kritickou micelární koncentraci (CMC). Nad tuto vymezenou hodnotu koncentrace se monomerní substráty shlukují do micel, resp. dvojvrstev. Vliv na hodnotu kritické micelární koncentrace má i množství hydrofóbních, resp. polárních skupin ve struktuře lipidu. Fosfolipasy se neřídí kinetikou dle Michaelise a Mentenové (viz obrázek č.3).

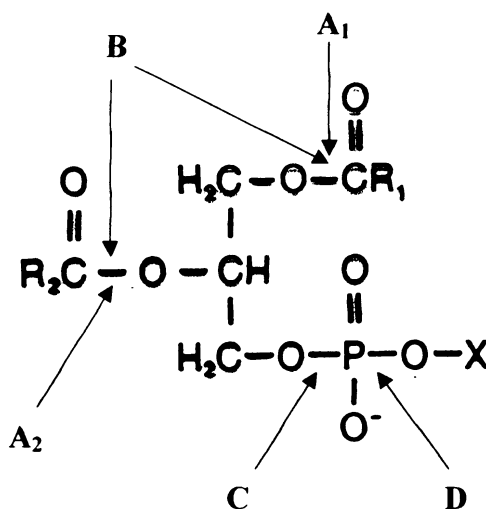
Fosfolipasy se liší místem a mechanismem působení, funkcí a regulací. Podle místa účinku na molekule substrátu se fosfolipasy dělí do čtyř základních skupin (viz. obrázek č.4).

Obrázek č.3 – Závislost aktivity fosfolipasy a nescifické esterasy na koncentraci substrátu



Esterasa se řídí hyperbolickou kinetikou dle Michaelise a Mentenové pro rozpustný substrát, zatímco fosfolipasa vykazuje plnou aktivitu až nad CMC (kritická micelární koncentrace) substrátu ⁽⁵⁷⁾.

Obrázek č.4 – Působení jednotlivých typů fosfolipas na molekule fosfolipidu



A₁ = fosfolipasa A₁, A₂ = fosfolipasa A₂, B = fosfolipasa B, C = fosfolipasa C, D = fosfolipasa D ⁽⁵⁸⁾.

2.2.1. Fosfolipasy v myokardu

V srdeční tkáni se vyskytují fosfolipasy A₂, C, D a lysofosfolipasy. Fosfolipasy A₂ hydrolyzují esterovou vazbu na druhém uhlíku molekuly fosfolipidu, fosfolipasy C atakují diesterovou mezi třetím uhlíkem glycerolu a fosfátem, fosfolipasy D katalyzují odtržení báze v molekule fosfolipidu a lysofosfolipasy štěpí zbývající FA po působení fosfolipasy A₁ nebo fosfolipasy A₂.

2.2.1.1. Fosfolipasy C a D

Fosfolipasy D (PLD) katalyzují odtržení báze v molekule fosfolipidu. Jejich hlavním substrátem je fosfatidylcholin (PC). Reakcí vzniká kyselina fosfatidová (PA) a cholin. Savčí PLD se účastní hlavně přenosu signálu.

Fosfolipasy C (PLC) katalyzují rozklad glycerofosfátové vazby na třetím uhlíku a jsou specifické zejména pro fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂). Reakce produkuje dva intracelulární posly – DAG a inositol-1,4,5-trifosfát (IP₃). DAG zprostředkovává aktivaci PKC a IP₃ má vliv na uvolnění Ca²⁺ iontů^(59, 60).

2.2.1.2. Fosfolipasy A₂

Fosfolipasy A₂ (PLA₂) (EC 3.1.1.4) jsou 2-acyltransferasy, které hydrolyzují acyl-esterovou vazbu na druhém uhlíku molekuly fosfolipidu, čímž dochází k uvolnění FA (např. AA) za vzniku 2-lysofosfolipidu.

Fosfolipasy typu A₂ se dělí dle molekulárních charakteristik do jedenácti tříd (I – XI) (viz tabulka č.1), do nichž patří PLA₂, které fungují extracelulárně, jde o sekre- torické na vápníku závislé fosfolipasy A₂ (sPLA₂), a ty které fungují intracelulárně – cytosolické na vápníku závislé fosfolipasy A₂ (cPLA₂) a na vápníku nezávislé fosfolipasy A₂ (iPLA₂). Liší se substrátovou specifitou, požadavkem Ca²⁺ iontů a modifikací lipidů.

V srdeční tkáni jsou přítomné třídy II a V sPLA₂, třída IV cPLA₂ a třída VI iPLA₂, které se v buňce liší svou lokalizací a funkcí⁽⁶¹⁾.

▪ sPLA₂

sPLA₂ mají molekulovou hmotnost okolo 14 kDa s velmi rigidní terciární strukturou. Mají 5 – 8 disulfidových můstků, které zaručují stabilitu proti proteolýze

a rezistenci k denaturaci enzymu ⁽⁶²⁾. Enzymy sPLA₂ obsahují 10 isoform, nevykazují selektivitu vůči určitým FA *in vitro*, ale pro svoji aktivitu potřebují milimolární koncentraci Ca²⁺ iontů ^(62, 63).

U člověka bylo identifikováno 6 různých sPLA₂, které jsou klasifikovány do jednotlivých tříd (třída IB, IIA, IID, IIE, V a X) podle primární struktury, jež je charakterizována počtem a pozicí Cys zbytků ⁽⁶²⁾. sPLA₂ využívají His-Asp katalytický mechanismus na rozdíl od cPLA₂ a iPLA₂, které mají v katalytickém místě Ser.

sPLA₂ participují na celé řadě fyziologických a patologických procesů – např. prostřednictvím uvolnění AA (5,8,11,14-eikosatetraenová kyselina) z membránových fosfolipidů ⁽⁶⁴⁾, což vede k produkci různých typů prozánětlivých lipidových mediátorů – eikosanoidů, jako jsou prostaglandiny (PGs), tromboxany (TXs) a leukotrieny (LTs). Dále se účastní, jak ochrany buněk ⁽⁶²⁾, tak jsou zahrnuty v procesu aterosklerózy, kdy roste jejich aktivita a může být příčinou srdečních dysfunkcí ⁽⁶³⁾.

▪ cPLA₂

cPLA₂ (skupina IV PLA₂) jsou vysokomolekulární (85 kDa) enzymy, které nesdílí žádnou homologii s ostatními enzymy PLA₂, nicméně přednostně hydrolyzují AA z pozice *sn*-2 (zejména cPLA- α) ⁽⁶³⁾. Ve svém aktivním centru mají Ser.

Intracelulární aktivace cPLA₂ vyžaduje zvýšenou koncentraci Ca²⁺ iontů a fosforylaci pomocí MAPK ^(62, 63). Také aktivace PKC může hrát roli při spouštění kinasové kaskády vedoucí k aktivaci MAPK, a tím i aktivaci PLA₂ a regulaci uvolňování AA ⁽⁶⁵⁾. Aktivací cPLA₂ dochází k translokaci enzymu z cytosolu na intracelulární membrány ER, GA nebo na jadernou membránu.

cPLA₂ plní řadu fyziologických funkcí, například souvisí s buněčnou smrtí, která je indukovaná TNF ⁽⁶⁵⁾. cPLA₂ díky své úloze v produkci mediátorů zánětu může být potencionálně farmakologickým cílem při vývoji protizánětlivých léčiv.

▪ iPLA₂

Skupina VI jsou na kalcium nezávislé PLA₂ (iPLA₂), které jsou ze všech PLA₂ nejvíce zastoupeny v myokardu (viz kapitola 2.2.2.).

Molekulární charakteristiky PLA₂

třída	typ PLA ₂	podtřída	zdroj	lokalizace	velikost (kDa)	molekulární charakteristiky
I	sPLA ₂	A	jed kobry, krajty	sekretovaná	13 - 15	His-Asp v AC
		B	prasečí/lidský pankreas	sekretovaná		His-Asp v AC, elapidová smyčka
		A	jed chřestýše, zmije, lidská synoviální tekutina/krevní destičky	sekretovaná		His-Asp v AC, karboxylová prodloužení
II	sPLA ₂	B	gabunská zmije	sekretovaná	13 - 15	His-Asp v AC, karboxylová prodloužení
		C	kryší/myší varlata	sekretovaná	13 - 15	His-Asp v AC, karboxylová prodloužení
		D	lidská/myší slezina, pankreas	sekretovaná	14 - 15	karboxylové prodloužení
		E	lidský/myší mozek/srdce/děloha	sekretovaná	14 - 15	karboxylové prodloužení
		F	myší varlata/embryo	sekretovaná	16 - 17	karboxylové prodloužení
			včely, ještěrky, štíři, lidé	sekretovaná	16 - 18	His-Asp v AC
IV	cPLA ₂	A	syrové 264,7/kryší ledviny, lidské U93/krevní destičky	cytosolická	85	Ser ²²⁸ v GLSGS sekvenci, Arg ²⁰⁰ , Asp ⁵⁴⁹ , Ser ⁵⁰⁵ , CaLB doména, pH doména
		B	lidský mozek	cytosolická	100	N-terminální doména, Ser ²²⁸
		C	lidské srdce, kosterní svaly	cytosolická	65	prenylace, Ser ²²⁸ , chybí CaLB doména, fosforylace na Ser ⁵⁰⁵ /Ser ⁷²⁷
V	sPLA ₂		lidské/kryší/myší srdce/plíce, makrofágy	sekretovaná	14	His-Asp v AC, chybí elapidová smyčka, chybí karboxylová doména
VI	iPLA ₂ -A	A - 1	P388D makrofágy, CHO buňky	intracelulární	84 - 85	GXSXG sekvence, 8 ankyrinových opakování, 340-kDa komplex
	iPLA ₂ -B	A - 2	lidské B-lymfocyty	intracelulární	88 - 90	8 ankyrinových opakování
	iPLA ₂ -2	B	lidské srdce/kosterní svaly	intracelulární	64 - 70	membránově vázané
VII	PAF-AH	A	lidská plazma	sekretovaná	45	GXSXG sekvence, Ser ²⁷³ , Asp ²⁸⁶ , His ³⁵¹
	PAF-AH (II)	B	hovězí mozek	intracelulární	42	Myristoylace na N-konci
VIII	PAF-AH Ib α ₁	A	lidský mozek	cytosolická	26	G-proteinový záhyb, Ser ⁴⁷ -His-Asp v AC, dimér
	PAF-AH Ib α ₂	B	hovězí mozek, lidský mozek	cytosolická	26	G-proteinový záhyb, Ser ⁴⁷ -His-Asp v AC, hetero- nebo homodimér
IX	sPLA ₂		mořští plži	sekretovaná	14	His-Asp v AC
X	sPLA ₂		lidské leukocyty	sekretovaná	14	His-Asp v AC
XI	sPLA ₂	A	zelené výhonky rýže	sekretovaná	12,4	C-terminální prodloužení není k dispozici
		B	zelené výhonky rýže (57, 62)	sekretovaná	12,9	C-terminální prodloužení není k dispozici

Tabulka č.1 – Základní charakteristiky PLA₂

2.2.2. Na kalciumu nezávislé fosfolipasy A₂ (iPLA₂)

iPLA₂ jsou poslední identifikované enzymy ze superrodiny PLA₂ ^(62, 63). Jde o na vápníku nezávislé fosfolipasy typu A₂, které se řadí do třídy VI PLA₂. Patří sem podtřídy iPLA₂-α, iPLA₂-β, iPLA₂-γ, navíc byly během posledních let identifikovány nové podtřídy – iPLA₂-ε, iPLA₂-ζ, iPLA₂-η ⁽⁶⁶⁾. iPLA₂ nepotřebují pro svou aktivitu Ca²⁺ ionty.

V savčích tkáních se vyskytují dvě podtřídy iPLA₂ – iPLA₂-β (třída VIA) a iPLA₂-γ (třída VIB), které jsou také v srdci ⁽⁶⁷⁾. Enzymy z této třídy vykazují lysofosfolipasovou i transacylasovou aktivitu, ale nevykazují specifitu pro FA ⁽⁶⁵⁾. Nicméně řada studií ukazuje specifitu iPLA₂ pro plasmalogeny, v srdci hlavně plasmalogeny cholinu a ethanolaminu ⁽⁶⁸⁾.

Lidské geny pro iPLA₂ jsou lokalizované na chromozomu 22 v oblasti q13.1 ⁽⁶⁹⁾.

Hlavní význam iPLA₂ spočívá v remodelaci buněčných membrán, při níž dochází k výměně FA – tzv. reacylační-deacylační cyklus, který zajišťuje obnovu fosfolipidové molekuly po poškození membrány (viz obrázek č.5). Dále se mohou podílet i na buněčné signalizaci prostřednictvím produkce lysofosfolipidů a AA při různých fyziologických funkcích buněk a za patologických stavů. Také bylo dokázáno, že iPLA₂ je aktivována TNF-α (tumor necrosis factor α) a IL-1β (interleukin-1β), což jsou prozánětlivé cytokiny ⁽⁷⁰⁾. Mechanismus této aktivace ale není zcela neobjasněn ⁽⁷⁰⁾.

▪ iPLA₂-β

iPLA₂-β je cytosolický enzym, má molekulovou hmotnost 85 – 88 kDa (752 aminokyselin) ⁽⁶⁹⁾ a obsahuje osm ankyrinových řetězců na N-terminálním konci, které mohou zprostředkovat vlastní agregaci (oligomerizaci) nebo interakci s ostatními proteiny. Dokonce existují studie, které dokazují, že genová sekvence pro ankyrinová opakování může plnit funkci jako negativní regulátor aktivity iPLA₂ ⁽⁷¹⁾. Aktivní formou iPLA₂-β je tetramer ⁽⁷²⁾. Ankyrinová opakování mohou být také zodpovědná za utváření tetramerických komplexů iPLA₂, protože chybí-li tato část enzymu, stává se iPLA₂ inaktivní ⁽⁷¹⁾. Dále obsahuje lipasový motiv Gly-Thr-Ser⁴⁶⁵-Thr-Gly a CaLB ⁽⁷³⁾, resp. kalmodulin vázající doménu, která je odpovědná za vazbu kalmodulinu, který tak inhibuje aktivitu iPLA₂-β, a navíc také ATP-vázací motiv ^(74, 62, 63, 72, 75, 76). V aktivním centru má iPLA₂-β Ser⁴⁶⁵.

iPLA₂-β hraje významnou roli v řadě fyziologických procesů, například se předpokládá, že iPLA₂-β indukuje buněčnou smrt prostřednictvím oxidačního stresu ⁽⁷⁷⁾. Je exprimována v srdci ⁽⁷⁸⁾, kde její aktivací dochází např. ke vzniku ventrikulárních arytmií ⁽⁷⁹⁾.

▪ iPLA₂-γ

iPLA₂-γ je membránově vázaný enzym s molekulovou hmotností 64 – 70 kDa^(56, 61, 80) a identickou primární sekvencí jako u iPLA₂-β vyjma toho, že je navíc 8 ankyrinových opakování přerušeno řetězcem 54 aminokyselin bohatým na prolin⁽⁷²⁾. Díky tomuto přerušení ve struktuře iPLA₂-γ dochází k posunu katalytického Ser na pozici 519^(63, 81). Dále tento enzym obsahuje lipasový motiv Gly-Thr-Ser⁵¹⁹-Thr-Gly⁽⁸²⁾. Navíc má v pozici 450 kyselinu glutamovou, zatímco iPLA₂-β má v této pozici glutamin⁽⁷²⁾.

iPLA₂-γ je hojně exprimována v srdci^(83, 84), dále ve svalstvu, placentě, mozku, játrech, pankreatu a varlatech⁽⁸⁵⁾.

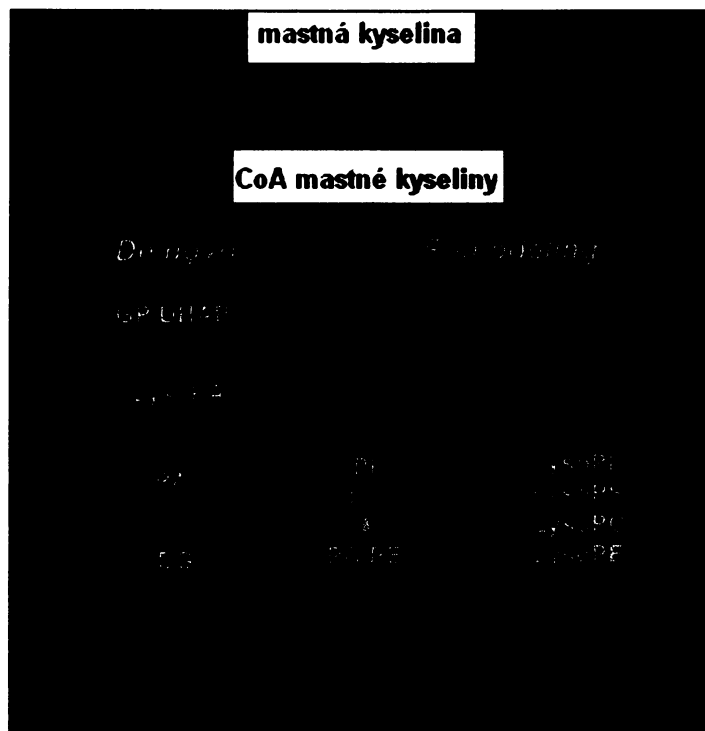
2.2.2.1. Funkce iPLA₂

▪ Remodelace membránových fosfolipidů

V buňkách existuje deacylační-reacylační cyklus membránových fosfolipidů – tzv. Landův cyklus, při kterém jsou fosfolipidy štěpeny intracelulárními PLA₂, přičemž vzniká 2-lysofosfolipid, který může být reacylován jinou FA pomocí acyltransferasy. Vzniká fosfolipid s novou FA v poloze *sn*-2. Celý proces se nazývá remodelace buněčných membrán (viz obrázek č.5). Landův cyklus udržuje nízké koncentrace volných FA v buňkách⁽⁸⁶⁾. Tento systém je důležitý hlavně v případech, dojde-li k poškození acylových řetězců (např. vlivem ROS). Je také známo, že zatímco v klidových buňkách převládá reacylace, ve stimulovaných buňkách dominují deacylační reakce⁽⁸⁷⁾.

Ačkoliv iPLA₂ není selektivní pro AA, existují hypotézy, že je potencionálním spouštěčem zánětlivých reakcí, mechanismus působení však není dosud znám^(74, 84, 88). Naopak existují studie, které dokazují, že při oxidačním stresu iPLA₂ přednostně hydrolyzuje AA z molekuly fosfolipidu⁽⁸⁹⁾. Koncentrace volné AA v buňce je kontrolována pomocí deacylačního-reacylačního cyklu, neboť majoritní cestou inkorporace AA do molekuly fosfolipidu je spíše deacylační-reacylační cyklus nežli acylace glycerolfosfátu a/nebo dihydroxyacetonfosfátu, při syntéze PA *de novo*⁽⁹⁰⁾. Téměř celé množství AA uvolněné pomocí iPLA₂ je inkorporováno zpět do molekul fosfolipidů, zbytek je prekurzorem pro syntézu eikosanoidů⁽⁸⁷⁾.

Obrázek č.5 – Syntéza *de novo* a remodelace při začlenění FA do fosfolipidů



Při biosyntéze *de novo* je volná FA nebo uvolněná vlivem endogenní fosfolipasy začleněna prostřednictvím acylCoA do glycerolfosfátu (GP) nebo dihydroxyacetonfosfátu (DHAP), přičemž vzniká lysofosfatidová kyselina (LPA). Z LPA pomocí acylCoA acyl-trasferasy vzniká kyselina fosfatidová (PA). V savčích buňkách může být PA převedena na fosfatidylinositol (PI) nebo diacylglycerol (DG), který je prekurzorem při tvorbě fosfatidylcholinu (PC) a fosfatidylethanolaminu (PE), který může zase být prekurzorem pro tvorbu fosfatidylserinu (PS). Při remodelaci se nejprve vytváří PI, PS, PC nebo PE a posléze vzniká prostřednictvím $iPLA_2$ lysoPI, lysoPC, lysoPE nebo lysoPS. Tyto lysofosfolipidy mohou být reacylovány acylCoA pomocí acyltrasferas na fosfolipidy s novou FA v poloze *sn*-2 ⁽⁷⁴⁾.

▪ Buněčná signalizace

Mnoho studií poukazuje na funkční roli $iPLA_2$ v buněčné signalizaci prostřednictvím remodelace fosfolipidů. $iPLA_2$ mohou působit na membrány dvěma způsoby. Buď nepřímou stimulují nebo inhibují přenos signálu prostřednictvím tvorby signálních molekul (FA, 2-lysofosfolipid), nebo mohou přímo narušit strukturu membrány prostřednictvím akumulace lysofosfolipidů a volných FA ⁽⁸¹⁾.

Další rolí iPLA₂ je tvorba AA-substrátu pro biosyntézu eikosanoidů (LTs, PGs, TXs) – lipidových poslů, které ovlivňují průběh zánětlivého procesu, regulují aktivitu iontových kanálů a apoptózu ⁽⁶⁹⁾.

2.2.2.2. Aktivace a inhibice iPLA₂

Katalytická aktivita iPLA₂ je regulována hlavně kalmodulinem, PKC ROS a ATP ⁽⁷⁵⁾.

Aktivitu iPLA₂ ovlivňuje kalmodulin, který je regulován Ca²⁺ ionty. Zdá se tedy, že aktivita iPLA₂ je nepřímo regulována Ca²⁺ ionty, tato souvislost byla prokázána na modelu krysích basofilních leukemických buněk ⁽⁷⁶⁾. Jakmile se zvýší koncentrace intracelulárních Ca²⁺ iontů v buňce, dochází k disociaci kalmodulinu z molekuly iPLA₂-β, čímž se enzym aktivuje ⁽⁷⁶⁾. Dojde-li k „přetížení“ buňky Ca²⁺ ionty, kalmodulin se opět naváže na iPLA₂-β a inhibuje její enzymovou aktivitu a dojde zároveň k inhibici vápníkových kanálů a zvyšování koncentrace Ca²⁺ iontů v buňce ^(76, 81).

Zdá se, že PKC aktivuje iPLA₂, takto se např. PKCα účastní uvolňování AA prostřednictvím iPLA₂ ⁽⁷⁵⁾. Také PKCε přítomná v membránových frakcích způsobuje aktivaci membránově vázané iPLA₂ ^(75, 81). Předpokládá se také, že proteinkinasy zprostředkovávají aktivaci iPLA₂ v ischemickém srdci ⁽⁹¹⁾.

Dle posledních studií ROS zvyšují aktivitu iPLA₂ ⁽⁷⁵⁾. Mechanismus působení zůstává ale stále neobjasněn (viz kap. 2.2.2.3).

Pomocí specifických inhibitorů lze specifikovat funkční význam intracelulární iPLA₂. Existují neselektivní inhibitory pro iPLA₂, protože Ser zbytek v aktivním centru enzymu třídy VI iPLA₂ je podobný zbytku třídě IV cPLA₂ ⁽⁷⁴⁾. Mezi takové inhibitory patří: arachidonyltrifluormethylketon, arachidonyltrikarbonyl a methylarachidonylfluorofosfát ⁽⁷⁴⁾. Všechny tyto tři inhibitory obsahují arachidonylový zbytek, který usnadňuje přístup k aktivnímu místu na PLA₂ ⁽⁷⁴⁾. Dále jsou pak dobrými inhibitory iPLA₂ a cPLA₂ palmitoyltrifluormethylketon a palmitoyltrikarbonyl ⁽⁷⁴⁾. Relativně specifický ireverzibilní inhibitor iPLA₂ je BEL (bromenollakton – ((E)-6-(bromo-methylen)-3-(1-naftalenyl)-2H-tetrahydropyran-2-on) ⁽⁷⁵⁾. BEL inaktivuje iPLA₂ alkylací SH-skupin Cys ⁽⁸²⁾. Separací racemátu BEL bylo zjištěno, že S-izomer selektivně inhibuje iPLA₂-γ, zatímco R-izomer iPLA₂-β ^(75, 81). Nevýhodou BEL je, že inhibuje jiný klíčový enzym v metabolismu fosfolipidů – na Mg²⁺ závislou fosfohydrolasu kyseliny fosfatidové (Mg²⁺-dependent

phosphatidic acid phosphohydrolase – PAP-1). Tento enzym katalyzuje defosforylaci PA, přičemž se uvolňuje DAG, který je hlavním meziproduktem při syntéze glycerofosfolipidů a který je také důležitým intracelulárním poslem v buněčné signalizaci ^(74, 92).

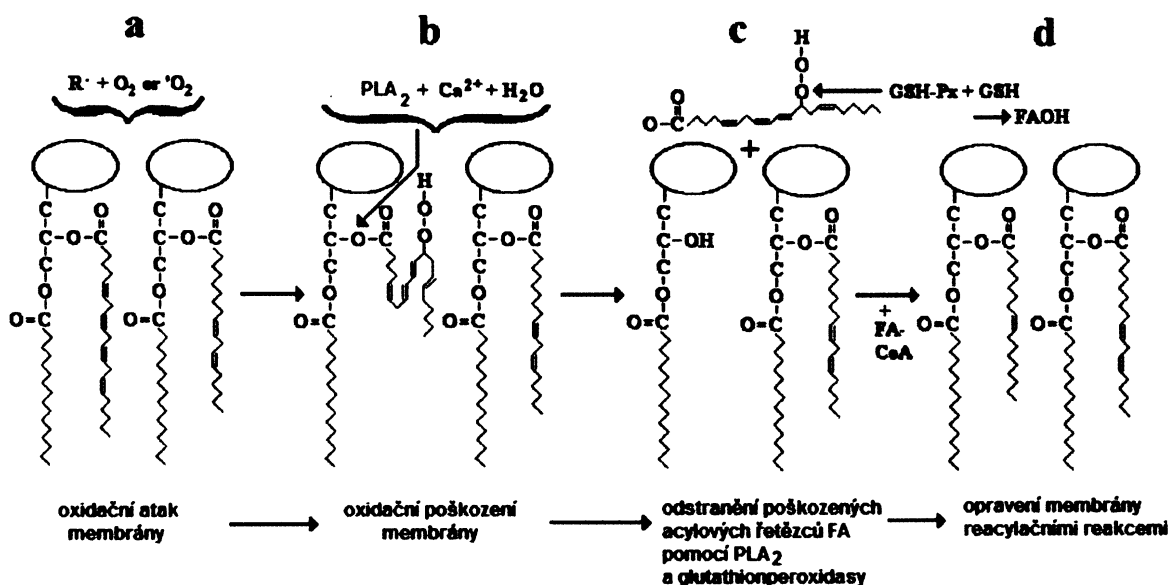
2.2.2.3. iPLA₂, peroxidace fosfolipidů a oxidační stres

Peroxidace fosfolipidů je proces, který se vyskytuje při zvýšeném oxidačním stresu a způsobuje poškození buněčných membrán. Oxidační stres vzniká při zvýšené tvorbě volných kyslíkových radikálů a jiných prooxidantů, jež převyšují míru obrany, kam patří především antioxidační enzymy a antioxidanty. Peroxidace fosfolipidů mění fluiditu membrány, propustnost membrány pro ionty, elektrický potenciál membrány, aktivitu enzymů a buněčnou signalizaci ⁽⁹²⁾.

Peroxidace fosfolipidů je zahájena radikálovou reakcí vodíkového atomu z nenasyceného uhlíku na acylový řetězec lipidu ⁽²⁸⁾. Vzniká volný radikál na tomto uhlíku, který následně reaguje s O₂, přičemž vytvoří peroxyradikál ⁽²⁸⁾. Peroxyradikál snadno reaguje s ostatními blízkými lipidy a vytváří lipidový hydroperoxid a další volný lipidový radikál v blízkosti postiženého řetězce ⁽²⁸⁾. Jedná se o řetězovou reakci. Terminace řetězové reakce nastává v okamžiku, kdy spolu navzájem dva radikály nevytvoří další radikál, ale molekulu O₂ ⁽²⁸⁾. Peroxidace lipidů je doprovázena přeskupením dvojných vazeb v nenasycených řetězcích mastných kyselin lipidů, přičemž dochází ke vzniku konjugovaných dienu ⁽²⁹⁾.

Neméně důležitou roli v systému zachování integrity buněčných membrán hrají také fosfolipasy, které se uplatňují při jejich obnově. Nejlepší cestou opravy je selektivní odstranění peroxidovaných FA zbytků z fosfolipidové molekuly. Polynenasycené FA, které jsou zvláště náchylné k lipoxygenaci nebo peroxidaci jsou vázány na membránových fosfolipidech v pozici *sn*-2, proto jsou nejlepšími reparačními enzymy právě PLA₂ ⁽⁶²⁾. Vlivem konformačních změn, které v membráně nastanou u oxidačně poškozených fosfolipidů, se zvýší aktivita iPLA₂ na membránách ^(94, 95). To znamená, že iPLA₂ přednostně hydrolyzuje peroxidované FA z membránových fosfolipidů, čímž se sníží oxidační poškození membrán (viz obr. č.6) ^(64, 96, 97, 98). Také vlivem nedostatku vitamínu E a selenu jako exogenních antioxidantů v buňkách, dochází k rapidnímu nárůstu aktivity iPLA₂ ⁽⁹⁹⁾.

Obrázek č.6 – Model poškození nenasycených řetězců membránových fosfolipidů při oxidačním stresu a oprava pomocí iPLA₂, GSH-Px (glutathionperoxidasa) a GSH (glutathion) a recyklace



Na obrázku dva nenasycené řetězce fosfolipidů představují jednu stranu lipidové dvojvrstvy ve struktuře membrány. Oblasti značené oválem v obrázku a) – d) představují polární hlavu fosfolipidu. Různé volné radikály nebo oxidanty mohou atakovat fosfolipid a vytvořit tak peroxidované fosfolipidy – a). Na obrázku b) je ukázáno poškození membrány peroxidací. iPLA₂ selektivně odstraňuje oxidované FA – viz b), aby byla membrána méně poškozená – viz c); GSH-Px ve vodné fázi může redukovat uvolněné peroxidované FA, reparace je na obrázku d) – recyklace dlouhými acylovými CoA řetězci FA (FA-CoA) ⁽⁶²⁾.

2.2.2.4. iPLA₂ a apoptóza

Apoptóza je fyziologická smrt buňky, která není způsobená zánětlivým procesem, ale je naprogramovaná v genové výbavě organismu. Mnoho studií potvrzuje, že iPLA₂ je během apoptózy aktivována ⁽¹⁰⁰⁾. Její aktivaci dochází ke štěpení poškozených acylových řetězců FA ve struktuře fosfolipidu, čímž se buňka snaží zabránit vstupu do apoptotického procesu.

iPLA₂ také zprostředkovává apoptózu prostřednictvím Fas receptorů ⁽¹⁰¹⁾. Další funkcí iPLA₂ při apoptóze může být produkce lipidových signálních molekul (př. AA) ^(96, 102).

iPLA₂-β je při apoptóze štěpena kaspasou-3 na aminokyselině Asp¹⁸³ (v sekvenci Asp-Thr-Thr-Asp) ⁽⁸¹⁾ nebo na Asp⁵¹³, Asp⁷³³, Asp⁷³⁷, Asp⁷⁴⁴ ⁽¹⁰³⁾, což má za následek aktivaci enzymu a uvolnění FA ⁽⁶³⁾. Po ataku kaspasou-3 ztratí iPLA₂-β N-terminální

oblast, čímž se aktivuje, zrychlí se destrukce membránových fosfolipidů ⁽⁸¹⁾, a dochází tak ke změnám membránové struktury ^(63, 75, 104). Jiné studie prokázaly, že ke zvýšené aktivitě iPLA₂ postačí odštěpení pouze prvního ankyrinového opakování ze struktury iPLA₂, přičemž zbyde 70 kDa protein ^(102, 105).

Remodelační role iPLA₂ v protekci membránových fosfolipidů při apoptotickém procesu je předmětem výzkumu, který by mohl přinést řešení podstaty mnoha onemocnění.

2.2.2.5. iPLA₂ v myokardu

Výzkum kardiovaskulárních chorob se mimo jiné zaměřuje na poruchy metabolismu fosfolipidů během srdeční ischemie jako na rozhodující faktor reversibilních přeměn na ireversibilní poškození buňky. Poškození fosfolipidů při ischemii vede k elektrofyziologickým změnám, ztrátě membránové integrity a nakonec k smrti buňky ^(106, 107).

iPLA₂ jsou jedny z nejvíce zastoupených fosfolipas v srdci savců. Selektivně hydrolyzují plasmalogeny, které jsou v srdci složené především z plasmalogenů bohatých na AA, cholin a ethanolamin ^(68, 75, 106). iPLA₂ vykazují rozmanité funkce v kardioprotekci. Mohou hrát významnou roli v oxidačním poškození buňky ^(108, 109). Při ischemicko/reperfúzním poškození dochází ke zvýšení aktivity iPLA₂, kdy tento enzym translokuje na membránu ⁽⁶⁸⁾. Jiné studie ukazují zvýšenou aktivitu iPLA₂ pouze během počátku srdeční ischemie ^(56, 110), nicméně její aktivita při dlouhodobé ischemii klesá ⁽⁵⁶⁾. Důkazem vzniku srdeční ischemie je rychlejší odbourávání fosfolipidů, jenž vede k akumulaci amfifilních metabolitů (2-lysofosfolipid), které následně indukují ischemickou chorobu srdeční, elektrofyziologické dysfunkce až případnou smrt myocytů ^(75, 81, 111). Při ischemii může být počátek arytmiogeneze spojován se zvýšenou produkcí lysoplasmalogenů díky aktivaci iPLA₂ ⁽⁷⁵⁾. Jejich aktivací také dochází v myokardu ke vzniku ventrikulárních arytmií ⁽⁷⁹⁾.

V procesu adaptace na chronickou hypoxii hraje roli celá řada enzymů. V naší laboratoři bylo prokázáno, že po adaptaci na chronickou hypoxii se zvyšuje relativní množství PKCδ v myokardu potkana, zatímco v případě PKCε, která se vyskytuje zejména na membránách, dochází k poklesu relativního množství ⁽¹¹²⁾. Dále bylo prokázáno, že ROS při adaptaci na chronickou hypoxii zvyšují relativní množství manganové superoxiddismutasy (MnSOD) v srdci ⁽⁵⁰⁾, která chrání fosfolipidy před oxidačním poškozením. Položili jsme si tedy otázku, zda ROS nemohou působit i na iPLA₂. Zdá se,

že iPLA₂ může fungovat kardioprotektivně při remodelaci buněčných membrán, kde odstraňují acylové řetězce FA v molekulách fosfolipidů poškozených oxidačním stresem, na druhou stranu v podmínkách ischemie/reperfúze, mohou mít i poškozující účinky, kdy degradují membránové fosfolipidy.

3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Byly stanoveny následující cíle této diplomové práce:

- 1) Zavedení stanovení exprese iPLA₂ v myokardu potkana metodou imunodetekce na Western blotu pomocí specifické protilátky.
- 2) Sledovat distribuci iPLA₂ v jednotlivých buněčných frakcích homogenátu z normoxické levé komory myokardu potkana.
- 3) Ověřit účinnost extrakce iPLA₂ Tritonem X-100.
- 4) Sledovat relativní zastoupení iPLA₂ v normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komoře myokardu potkana v extraktech homogenátu, partikulární frakce a v cytosolu.
- 5) Sledovat vliv antioxidantu NAC na relativní zastoupení proteinu iPLA₂ v myokardu normoxického a na chronickou hypoxii adaptovaného potkana.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Laboratorní zvířata

K laboratorním experimentům byli použiti samci laboratorního potkana kmene Wistar. Zvířata pocházela z chovu firmy Velaz. Na počátku experimentu byla jejich hmotnost přibližně 300 – 380 g. Všechna zvířata měla volný přístup k vodě a standardní laboratorní dietě. Studie byla vedena ve shodě s „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” publikovaným US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

4.2. Experimentální model intermitentní výškové hypoxie

4.2.1. Vliv intermitentní výškové hypoxie

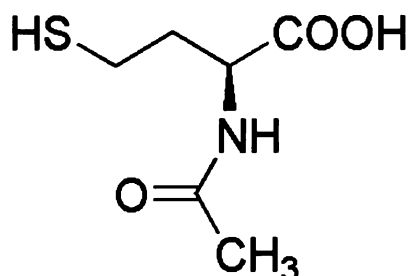
Potkani byli rozděleni do dvou experimentálních skupin:

- 1) potkani chovaní v normoxických podmínkách
- 2) potkani adaptovaní na chronickou hypoxii

Potkani patřící do hypoxických skupin byli vystaveni intermitentní výškové hypoxii v hypobarické komoře (IHA). Adaptace potkanů probíhala 8 hodin denně, 5 dní v týdnu v celkovém počtu 25 expozičních. Barometrický tlak byl snižován postupně, aby odpovídal nadmořské výšce 7000 metrů nad mořem po 13 expozičních. Ve výšce 7000 metrů nad mořem odpovídá barometrický tlak hodnotě 40,9 kPa ($p_B = 306,8$ mm Hg) a parciální tlak kyslíku hodnotě 8,5 kPa ($p_{O_2} = 63,8$ mm Hg). Během expozičních byla v komoře zajištěna cirkulace vzduchu a teplota byla vnější ventilací regulována na 21 – 23 °C. Zbylí potkani (patřící do normoxických skupin) byli drženi v nadmořské výšce 200 metrů nad mořem. Tomu odpovídá barometrický tlak 99 kPa ($p_B = 742$ mm Hg) parciální tlak kyslíku 20,7 kPa ($p_{O_2} = 155$ mm Hg).

4.2.2. Vliv N-acetylcysteinu (NAC)

NAC byl rozpuštěn v destilované vodě ($c = 50 \text{ mg.ml}^{-1}$). pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 7,4.



Potkani byli rozděleni do čtyř experimentálních skupin:

- 1) potkani chovaní v normoxických podmínkách
- 2) potkani chovaní v normoxických podmínkách, kterým byl podáván NAC
- 3) potkani adaptovaní na chronickou hypoxii
- 4) potkani adaptovaní na chronickou hypoxii, kterým byl podáván NAC

NAC byl potkanům podáván subkutánně v dávkách 100 mg/kg denně vždy před hypoxickou expozicí. Zbýlá zvířata dostala stejným způsobem stejný objem fyziologického roztoku (1 ml/kg).

4.2.3. Odběr tkáně

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

Pro analýzu byla použita celá levá komora. Získali jsme tedy dvě, popř. čtyři skupiny vzorků:

- **vliv chronické hypoxie**
 - normoxie
 - hypoxie

- vliv NAC
 - normoxie
 - normoxie + NAC
 - hypoxie
 - hypoxie + NAC

4.3. Zdroje používaných chemikálií

Lachema	CuSO ₄ , EDTA, glycerol, H ₂ O ₂ , kyselina octová, močovina, Na ₂ CO ₃ , persíran amonný (APS), sacharosa, vinan sodnodraselný, aceton
Lach-Ner	methanol, HCl, NaOH
Spolana	NaF
MERCK	deoxycholát sodný (SDC)
C.Roth GmbH	kyselina trichloroctová (TCA)
Penta	fenolové reagens, NaCl
Sigma	barevné standardy molekulových hmotností, albumin z hovězího séra (BSA), akrylamid, bromfenolová modř (BPB), dimethylsulfoxid (DMSO), dithiothreitol (DTT), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), glycin, kyselina p-kumarová, leupeptin, luminol, N,N'-methylenbisakrylamid (Bisakrylamid), Ponceau 2S, dodecylsulfát sodný (SDS), Tris, Triton X-100, Tween 20, EGTA, aprotinin
Fluka	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)

4.4. Homogenizace

4.4.1. Příprava homogenizačního pufru 3S

Při homogenizaci byl používán pufr se sacharosou a inhibitory proteas označený jako 3S.

Postup:

- Navážit chemikálie dle tabulky pro složení pufru 3S a rozpustit v redestilované vodě do celkového objemu 50 ml. Upravit pH na hodnotu 7,5.
- Přidat inhibitory dle tabulky pro složení pufru 3S.
- Rozpipetovat do mikrozkušavek eppendorf (cca 1 ml) a uskladnit ve zmraženém stavu.

Složení pufru 3S:
12,5 mM Tris
2,5 mM EGTA
100 mM NaF
250 mM sacharosa
1,0 mM EDTA

Inhibitory proteas:
20 μ M aprotinin
5,0 mM DTT
200 μ M leupeptin
300 μ M PMSF v 100 μ l acetonu

4.4.2. Homogenizační postup

- 1) Zmraženou tkáň ve třecí misce vychlazené kapalným dusíkem zalít kapalným dusíkem. Počkat až bude tkáň i třecí miska dostatečně vychlazená (dusík se přestane vařit). Alobalem překrýt třecí misku. Otvorem v alobalu rozbít tloučkem tkáň nejdříve na menší kousky a za dolévání dusíku tkáň rozdrtit a rozetřít až na prášek.
- 2) Po rozdrčení tkáně přidat celkem 8 ml 3S pufru na 1 g srdeční tkáně a postupně převést suspenzi rozdrčené tkáně do vychlazené homogenizační zkumavky. Zbylou 1/3 3S pufru použít na propláchnutí třecí misky s tloučkem a taktéž převést do vychlazené homogenizační zkumavky.
- 3) Homogenizovat v Potter – Elvehjemově homogenizátoru s teflonovým pístem (15 tahů) za intenzivního chlazení v ledové lázni.

4.5. Frakcionace

4.5.1. Frakcionační postup v případě distribuce iPLA₂ v buněčných frakcích normoxického myokardu

Tkáň byla homogenizována a frakcionována upraveným postupem podle Gu a spol., 1994 ⁽¹¹³⁾ a Tylera a spol., 1976 ⁽¹¹⁴⁾. Homogenizace i frakcionace vzorků byla provedena při teplotě cca 6 °C. Zpracovávána byla vždy celá levá komora z jedné experimentální skupiny (380 – 430 mg srdeční tkáně). Schéma frakcionačního postupu je na obrázku č.7 na str.42.

- 1) Homogenát zpracovat dle kap.4.4.2. a převést do centrifugační zkumavky a centrifugovat při 200 x g 20 minut (Eppendorf Centrifuge 5415D) → pelet (P) = debris (nezhomogenizované myocyty a kousky srdeční tkáně), supernatant byl dále zpracováván.
- 2) Supernatant centrifugovat 15 minut při 1000 x g → pelet (P1) = nukleární-cytoskeletární-myofibrilární frakce. Pelet rozpustit v 3S pufru, resp. v 3ST pufru v případě extrakce Tritonem X-100, v poměru 2 µl pufru na 1 mg výchozí frakcionované tkáně, promíchat na vortexu a sonikovat přerušovaně 10 sekund v ledové lázni sonikátorem.
- 3) Supernatant centrifugovat 10 minut při 8000 x g (Centrifuge Hettich, Germany) → pelet (P2) = mitochondriální frakce, promýt pufrům 3S (400 µl), resp. 3ST v případě extrakce Tritonem X-100. A opět centrifugovat 10 minut 8000 x g. Následně k peletu přidat 3S pufr, resp. 3ST pufr v případě extrakce Tritonem X-100, v poměru 1 µl pufru na 1 mg výchozí frakcionované tkáně, promíchat na vortexu a sonikovat přerušovaně 10 sekund v ledové lázni sonikátorem.
- 4) Supernatant centrifugovat 1 hodinu při 105 000 x g ve vakuu (Beckman L7) → pelet (P3) = membránová frakce. Následně k peletu přidat 3S pufr, resp. 3ST pufr v případě extrakce Tritonem X-100, v poměru 1 µl pufru na 1 mg výchozí frakcionované tkáně, promíchat na vortexu a sonikovat přerušovaně 10 sekund v ledové lázni sonikátorem.

- 5) Supernatant (Sup) = cytosol centrifugovat 1 hodinu při 105 000 x g ve vakuu (Beckman L7).

4.5.1.1. Příprava jednotlivých buněčných frakcí a jejich extraktů

Byly připraveny buněčné frakce, z nichž polovina byla extrahována Tritonem X-100. K přípravě jednotlivých buněčných frakcí byl použit 3S pufr. K přípravě extraktů byl použit pufr označený jako 3ST (pufr 3S s Tritonem X-100). Konečná koncentrace Tritonu X-100 ve vzorcích byla 1 %. Protože byl tento pufr použit i k naředění vzorků, k dosažení konečné koncentrace Tritonu X-100 ve vzorcích bylo potřeba použít pufr 3ST s různými přísadkami Tritonu X-100. Vzorky musí být neustále v chladu (led)!

Postup:

- 1) Partikulární frakce (ve formě peletů) rozsuspendovat v pufru 3S, resp. 3ST v případě extrakce Tritonem X-100, v poměru 1 μ l pufru na 1 mg výchozí frakcionované tkáně, promíchat na vortexu a sonikovat přerušovaně 10 sekund v ledové lázni sonikátorem (Elma S10H, Elmasonic).
- 2) Rozsuspendované partikulární frakce nechat stát 1 hodinu v ledové lázni u vzorků, do nichž byl přidán 3ST pufr.
- 3) Převést do centrifugačních zkumavek a centrifugovat 1 hodinu při 100 000 x g ve vakuu (Beckman L7).
- 4) Supernatanty jsou jednotlivé frakce nebo extrakty frakcí. U každé frakce nebo extraktu změřit objem a rozpipetovat po alikvotech (15, 20 μ l) do mikrozkušavek a skladovat v hlubokomrazícím boxu (-80 °C).

Jednotlivé buněčné frakce byly označeny:

- N nukleární-cytoskeletární-myofibrilární frakce (pelet P1)
- MITO mitochondriální frakce (pelet P2)
- M membránová frakce (pelet P3)
- C cytosol

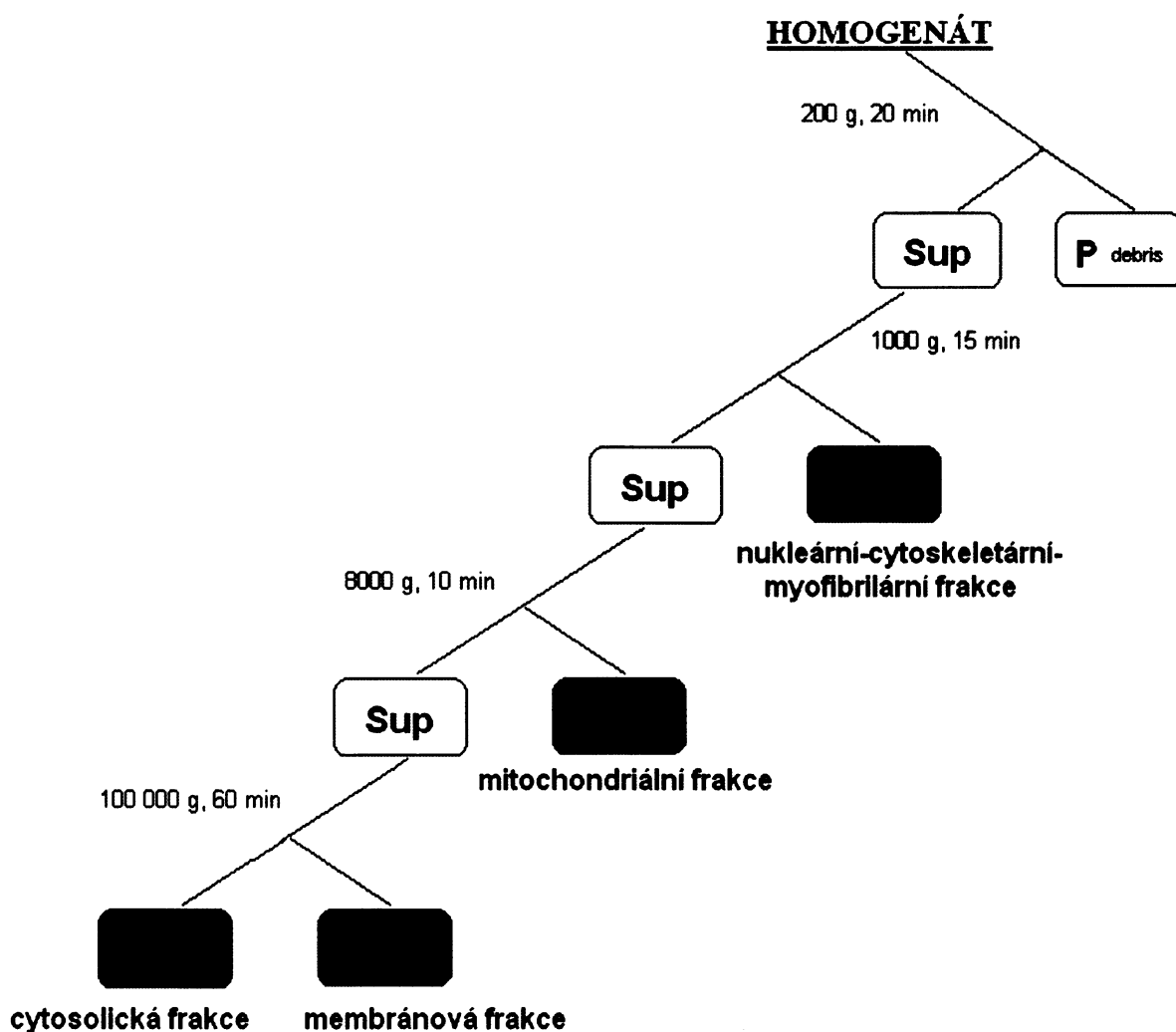
Jednotlivé extrakty buněčných frakcí byly označeny:

- NE nukleární-cytoskeletární-myofibrilární extrakt (extrakt z peletu P1)
- MITE mitochondriální extrakt (extrakt z peletu P2)

- ME membránový extrakt (extrakt z peletu P3)
- C cytosol

Získané buněčné frakce byly charakterizovány v řadě prací; N obsahuje především jádra, jaderné membrány, cytoskeletární proteiny a myofibrily, M obsahuje sarkolemu a membrány sarkoplazmatického retikula ^(113, 115, 116).

Obrázek č.7 – Příprava jednotlivých buněčných frakcí a jejich extraktů



Frakce, které byly použity pro stanovení exprese iPLA₂, jsou označeny fialovou barvou. P1 – pelet nukleární-cytoskeletární-myofibrilární frakce, P2 – mitochondriální frakce, P3 – membránová frakce, fialově označený Sup – cytosolická frakce.

4.5.2. Frakcionační postup v případě studie vlivu adaptace na chronickou hypoxii na expresi iPLA₂

Tkáň byla homogenizována a frakcionována upraveným postupem podle Alberta a spol., 1999 ⁽¹¹⁵⁾ a Strassera a spol., 1999 ⁽¹¹⁷⁾. Homogenizace i frakcionace vzorků byla provedena při teplotě cca 6°C. Zpracovávána byla vždy celá levá komora z jedné experimentální skupiny (420 – 530 mg srdeční tkáně). Schéma frakcionačního postupu je na obrázku č.8 na str.44.

- 1) 300 µl homogenátu odebrat do vychlazené mikrozkušavky Eppendorf na extrakci s Tritonem X-100, zbytek převést do centrifugační zkumavky, vyvážit na analytických vahách a centrifugovat 1,5 hodiny při 105 000 x g ve vakuu (Beckman L7) → pelet (P1) = partikulární frakce.
- 2) Supernatant (Sup) = cytosol odebrat do vychlazené mikrozkušavky, změřit jeho objem a přidat Triton X-100 tak, aby výsledná koncentrace Triton X-100 v cytosolu byla 1 %. Rozpipetovat po alikvotech (20, 30 a 100 µl) do mikrozkušavek a skladovat v hlubokomrazícím boxu (t = - 80°C).

4.5.2.1. Příprava extraktů

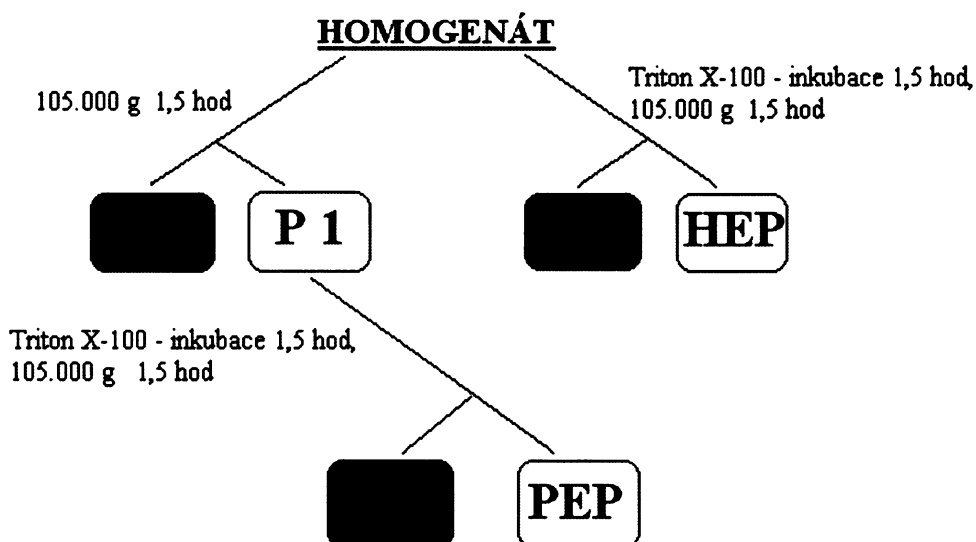
Z partikulární frakce (P1) a z odebrané části homogenátu byly připraveny extrakty. K přípravě extraktů partikulárních frakcí a části homogenátu byl použit pufr označený jako 3ST (pufr 3S s Triton X-100). Konečná koncentrace Tritonu X-100 ve vzorcích byla 1 %. Protože byl tento pufr použit i k naředění vzorků, k dosažení konečné koncentrace Tritonu X-100 ve vzorcích bylo potřeba použít pufr 3ST s různými přídávky Tritonu X-100. Vzorky musí být neustále v chladu (led)!

Postup:

- 1) Partikulární frakci P1 (ve formě peletu) rozsuspendovat v pufru 3ST (1 % Triton X-100), v poměru 2 µl pufru na 1 mg výchozí frakcionované tkáně, promíchat na vortexu a sonikovat přerušovaně 10 sekund v ledové lázni sonikátorem (Elma S10H, Elmasonic).

- 2) K odebranému homogenátu přidat stejné množství pufru 3ST (2 % Triton X-100), promíchat na vortexu.
- 3) Rozsuspndovanou partikulární frakci a homogenát nechat stát 1,5 hodiny v ledové lázni.
- 4) Převést do centrifugačních zkumavek a centrifugovat 1,5 hodiny při 105 000 x g ve vakuu (Beckman L7).
- 5) Supernatanty = extrakty frakcí. U každého extraktu partikulární frakce (PE) a homogenátu (HE) změřit objem a rozpipetovat po alikvotech (20 μ l) do mikrozkušavek a skladovat v hlubokomrazícím boxu (-80 °C).

Obrázek č.8 – Příprava buněčných extraktů



Frakce, které byly použity pro stanovení exprese iPLA₂, jsou označeny fialovou barvou. C – cytosolická frakce, P1 – pelet partikulární frakce; HE – extrakt homogenátu; HEP – pelet extraktu homogenátu, PE – extrakt partikulární frakce, PEP – extrakt peletu partikulární frakce

4.6. Stanovení koncentrace proteinů

Stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích bylo provedeno metodou podle Petersona a spol., 1977 ⁽¹¹⁸⁾, jde o modifikovanou metodu podle Lowryho a spol., 1951 ⁽¹¹⁹⁾ pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích obsahujících detergenty.

4.6.1. Princip metody

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

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

Stanovení se provádí v mikrozkušavkách Eppendorf o objemu 1,5 ml v tripletech. Ke každé sérii stanovení je třeba provést analýzu slepého vzorku.

Zásobní roztoky pro stanovení proteinů:

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

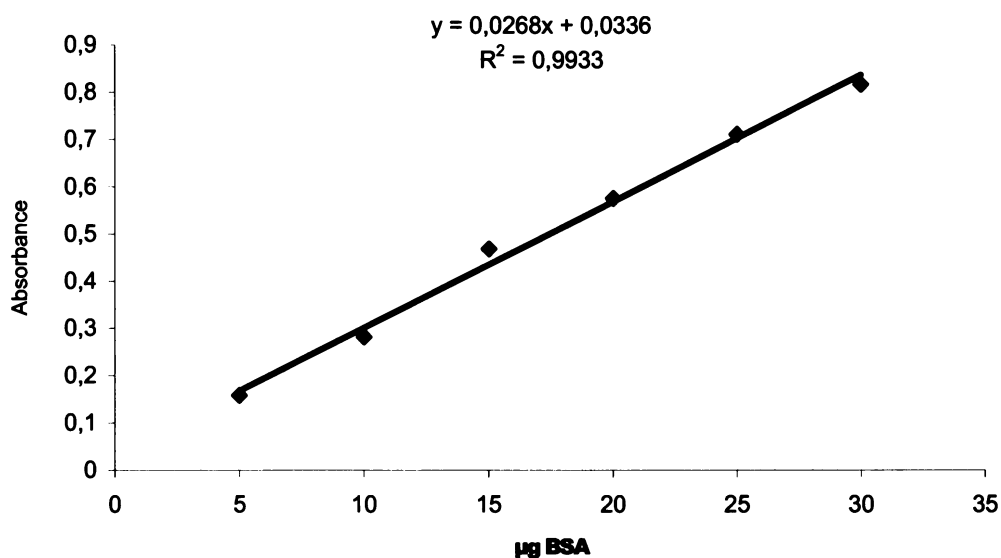
Pracovní roztoky:

- homogenizační pufr + 1 % Triton X-100 (3ST)
- standard BSA ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)
- 0,15 % deoxycholát sodný (SDC)
- 72 % trichloroctová kyselina (TCA)
- roztok A (10 % SDS + 0,8 M NaOH + zásobní roztok alkalického činidla + redestilovaná voda v poměru 1:1:1:1)
- roztok B (fenolové reagens + redestilovaná voda v poměru 1:6)

4.6.1.1. Postup stanovení koncentrace proteinů

- 1) Zředit vzorek frakce v redestilované vodě (Millipore Elix S Packname Progard® 2) tak, aby koncentrace proteinů ve vzorku byla v rozmezí 1 – 20 µg na 200 µl, promíchat na vortexu.
- 2) Naředěný roztok vzorku rozpipetovat do tripletů po 200 µl do mikrozkušavek Eppendorf, připravit slepý vzorek (5 µl 3ST + 195 µl redestilované vody) a standard (20 µl roztoku standardu (BSA) + 5 µl 3ST + 175 µl redestilované vody) také v tripletech. Promíchat na vortexu.
- 3) Přidat 20 µl 0,15 % SDC. Promíchat na vortexu, nechat 10 minut inkubovat.
- 4) Přidat 20 µl 72 % TCA. Promíchat na vortexu (vytvoří se mléčný zákal sraženiny).
- 5) Centrifugovat 10 minut při 7000 x g na mikrocentrifuze (Eppendorf Centrifuge 5415D).
- 6) Opatrně odlít supernatant, aby pelet zůstal neporušen na dně (nemusí být vidět), vysušit horní okraj a víčka mikrozkušavek do buničiny.
- 7) Pomalu, aby nedošlo ke ztrátám, přidat 200 µl redestilované vody a 200 µl roztoku A, promíchat na vortexu, nechat 10 minut inkubovat.
- 8) Přidat 100 µl roztoku B, promíchat na vortexu, nechat 30 minut inkubovat ve tmě.
- 9) Změřit absorbanci při 750 nm (spektrofotometr α-Helios, *Chromspec*) proti redestilované vodě, v pořadí slepý vzorek, standard, vzorek.
- 10) Z kalibrační křivky odečíst koncentraci standardu (pro kontrolu) a proteinů v jednotlivých vzorcích (program Microsoft Excel).

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



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

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

Elektroforetické dělení proteinů jednotlivých vzorků bylo prováděno na plochých polyakrylamidových gelech v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS) v elektroforetické soustavě Mini – PROTEAN 3 Cell firmy Bio – Rad[®] metodou podle Ogity a Markerta, 1979 ⁽¹²⁰⁾. Koncentrace polyakrylamidu ve startovacím gelu byla 4 %, v dělicím gelu 10 %. Rozměry gelů byly 65 x 85 x 0,75 mm.

Elektroforetická soustava byla sestavena podle instrukcí výrobce.

4.7.1. Příprava elektroforetických gelů

- 1) Zásobní roztoky (viz tabulka č.2) uchovávané ve 4°C nechat vytemperovat na teplotu laboratoře.

2) V kalibrované zkumavce připravit roztok pro dva dělicí gely:

- 3,32 ml roztoku I
- 2,49 ml roztoku II
- 4,15 ml redestilované vody
- 70 µl roztoku III
- 7 µl roztoku IV

Po přidání každého roztoku důkladně promíchat na vortexu.

3) Ihned naplnit aparaturu pro elektroforézu 1 cm pod okraj skel. Pomocí injekční stříkačky s jehlou roztok opatrně převrstvit redestilovanou vodou a nechat zpolymerovat (min. 40 min)

4) Po zpolymerování roztoků pro dělicí gely odlít převrstvující vodu a zbytek opatrně odsát pomocí filtračního papíru (nesmí se dotknout gelu).

5) V kalibrované zkumavce připravit roztok pro dva startovací gely:

- 0,65 ml I
- 1,25 ml V
- 3,05 ml redestilované vody
- 50 µl roztoku III
- 5 µl roztoku IV

Po přidání každého roztoku důkladně promíchat na vortexu

6) Roztokem zaplnit zbývající prostor mezi skly a zasunout do něj hřebínky pro vytvoření 15 vzorkových kapes tak, aby jejich dna byla 3 mm nad povrchem dělicího gelu. Nechat zpolymerovat (minimálně 20 min).

7) Po zpolymerování roztoků pro startovací gely vyjmout hřebínky a vzniklé jamky důkladně propláchnout redestilovanou vodou (pozor na bublinky vzduchu a kousky gelu v jamkách).

8) Aparát ponořit do elektroforetické vany s vychlazeným elektrodovým pufrem VI.

4.7.2. Příprava vzorků pro elektroforézu

1) Vzorky nechat rozmrazit, krátce zcentrifugovat (30 s, 7000 x g).

2) Podle stanovené koncentrace proteinů zředit vzorky vzorkovým pufrem VII (obvyklé ředění 1 + 2 nebo 1 + 4). Promíchat na vortexu.

- 3) Povařit 3 min na vodní lázni.
- 4) Krátce zcentrifugovat (30 s, 7000 x g).
- 5) Do jamek ve startovacím gelu nanést vzorkový roztok, před nanesením jemně promíchat na vortexu. Nanáší se pomocí pipety Eppendorf® speciálními špičkami pro nanášení na gel. Obvykle bylo nanášeno 6-15 µg proteinu z každé frakce.
- 6) Stejným způsobem nanést 5 µl směsi barevných proteinových standardů molekulových hmotností (M.W.).
- 7) K elektroforetické soustavě připojit stabilizovaný zdroj stejnosměrného napětí a nastavit tyto parametry:
 - *proud*: - 10 mA/gel (před zapuštěním vzorků do dělicího gelu – cca prvních 10 min)
- 20 mA/gel (po zapuštění vzorků do dělicího gelu)
 - *napětí*: 250 V
 - *čas*: 1 hod 40 min
- 8) Po ukončení elektroforézy vypnout zdroj napětí a vyjmout aparát z elektroforetické vany, oddělit krycí skla od gelů. Gely opláchnout redestilovanou vodou, opatrně je uvolnit od spodního skla a přenést do plastové misky Sterilin® (rozměr 100 x 100 mm) naplněné pufrem VIII (viz tabulka č.3).

Tabulka č.2 – Popis a složení roztoků pro SDS-PAGE

ROZTOK	POPIS	SLOŽENÍ
I	30% (w/v) akrylamid; 0,8% (w/v) Bisakrylamid	30g akrylamidu; 0,8 g Bisakrylamid; redest.voda do 100 ml; přefiltrovat
II	pufr 1,5 M Tris-HCl – 0,4% SDS; pH 8,8	45,5g Tris; redest.voda asi do 150 ml; upravit pH konc.HCl na 8,8; redest.voda do 250 ml; přidat 1g SDS
III	roztok APS	75 mg APS rozpustit v 0,75 ml redest.vody
IV	TEMED	-
V	pufr 0,5M Tris-HCl – 0,4% (w/v) SDS; pH 6,8	6,05g Tris; redest.voda asi do 40ml; upravit pH konc.HCl na 6,8; redest.voda do 100 ml; přidat 0,4g SDS
VI	5 x koncentrovaný elektrodotový pufr – 0,1 M Tris – 0,5% (w/v) SDS – 0,96 M glycin; pH 8,3	15,1g Tris; 72g glycin; 5g SDS; redest.voda do 1000 ml
VII	vzorkový pufr – 0,3M Tris - 10% (v/v) glycerol – 0,2% (w/v) BPB – 0,13 M DTT; pH 6,8	0,91g Tris; 2,5g SDS; 3,25 ml glycerolu; 0,5g DTT; redest.voda asi do 20 ml; upravit pH konc.HCl na 6,8; přidat 0,05 g BPB; redest.voda do 25 ml
Standard	vzorkový roztok barevných standardů M.W.	balení (3ml) M.W.standardů (Fluka 69813) rozpustit v 0,5 ml 8M močoviny; zředit 0,5ml VII; rozdělit na 20 µl alikvoty; skladovat při –40°C; před použitím povařit 5min na vodní lázni; dále skladovat ve 4°C

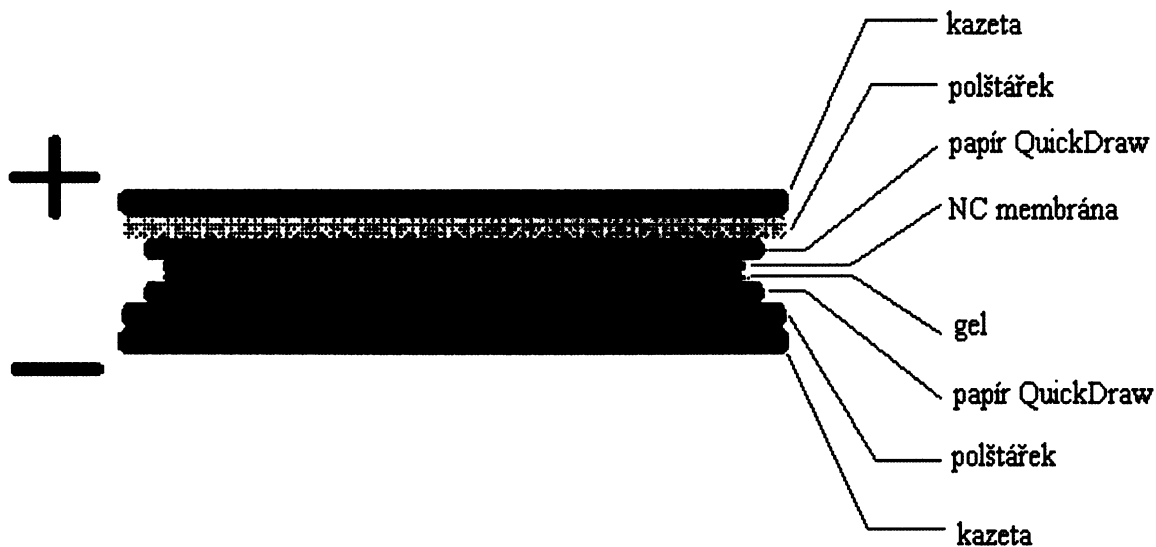
4.8. Elektropřenos proteinů na nitrocelulóзовé membrány (Western Blotting)

Elektropřenos proteinů na nitrocelulóзовé membrány byl prováděn metodou podle Towbina a spol, 1979⁽¹²¹⁾ v elektropřenosové soupravě AmershamTM pro ECL, 1997⁽¹²²⁾.

4.8.1. Postup elektropřenosu proteinů na nitrocelulóзовé membrány

- 1) Gely po ukončení elektroforézy ekvilibrovat minimálně 5 minut v plastové misce v přenosovém pufru VIII.
- 2) Z nitrocelulóзовé (NC) membrány HybondTM ECLTM a z papíru QuickDraw^(tm) nastříhat obdélníčky o rozměrech 65 x 85 mm. NC membrány ekvilibrovat asi 2 min v přenosovém pufru VIII.
- 3) Sestavit sendvič pro elektropřenos (viz obrázek č.9). Sestavování provádět v Petriho misce naplněné do poloviny pufrům VIII tak, aby byl sendvič nasáklý pufrům. Každou vrstvu před přiložením další ovlhčit pufrům VIII. Důležitý je dobrý kontakt mezi vrstvami zvláště mezi gelem a membránou, proto je potřeba po přiložení každé vrstvy opatrně zkumavkou jako válečkem vytlačit bublinky. Musí být dokonalý kontakt pro elektropřenos mezi jednotlivými vrstvami v sendviči, aby byl po celé ploše gelu konstantní tlak!
- 4) Sestavené sendviče zasunout do vany pro elektropřenos a naplnit ji vychlazeným přenosovým pufrům VIII.
- 5) Připojit k vaně stabilizovaný zdroj stejnosměrného napětí a nastavit tyto podmínky:
 - *proud*: 350 mA
 - *napětí*: 100 V
 - *čas*: 60 min
- 6) Po ukončení elektropřenosu a odpojení od zdroje napětí rozebrat sendviče, membrány přenést do barvicího roztoku IX (Ponceau 2S) na cca 20 sekund. Barvení Ponceau červení slouží ke kontrole kvantitativního přenosu proteinů. Opláchnout redestilovanou vodou a v případě, že dojde ke správnému elektropřenosu proteinů, zalít roztokem TTBS.

Obrázek č.9 – Sendvič pro elektropřenos proteinů na NC membrány



Tabulka č.3 – Popis a složení roztoků pro elektropřenos proteinů na NC membrány

ROZTOK	POPIS	SLOŽENÍ
VIII	Tris-glycinový přenosový pufr – 0,025M Tris -0,192M glycin – 20 % (v/v) methanol; pH 8,3	6,07 g Tris; 28,8 g glycinu; 400ml methanolu; redest.voda do 2000 ml (pH se neupravuje)
IX	0,1% (w/v) červeň Ponceau 2S červeň v 1% (v/v) kyselině octové	5ml ledové kyseliny octové zředit redest.vodou; za míchání rozpustit 500 mg Ponceau 2S; redest.voda do 500 ml

4.9. Protilátky

Primární protilátka proti iPLA₂:

iPLA₂ králičí antisérum (Cayman) proti syntetickému peptidu Pro-Arg-Phe-Asn-Gln-Asn-Ile-Asn-Leu-Lys-Pro-Pro-Thr-Gln-Pro-Ala-Asp-Gln-Leu-Val odpovídající aminokyselinám 557-576 ve struktuře iPLA₂ konjugované s hemocyaninem

Konjugát sekundární protilátky:

SwARb-Px chromatograficky čištěná imunoglobulinová frakce z prasečího antiséra proti králičím imunoglobulinům, konjugovaná oxidační metodou s křenovou peroxidasou (HRP – Horse Radish Peroxidase) (Sevapharma Praha)

4.10. Imunodetekce iPLA₂

Imunodetekce iPLA₂ na NC membránách byla prováděna podle doporučených standardních postupů – podle návodu firmy AmershamTM pro ECL, 1997⁽¹²²⁾, a podle návodu firmy Bio-Rad[®] pro Immun-Blot[®], 1996⁽¹²³⁾. Veškeré inkubace a promývání membrán bylo prováděno za míchání na laboratorní kývačce ve čtvercových plastových miskách Sterilin[®] o rozměru 100 x 100 mm. Použité primární protilátky byly ředěny 1:2000, sekundární protilátka byla ředěna 1:4000. Popis a složení roztoků používaných při imunodetekci jsou uvedeny v tabulce č.4.

4.10.1. Postup imunodetekce iPLA₂

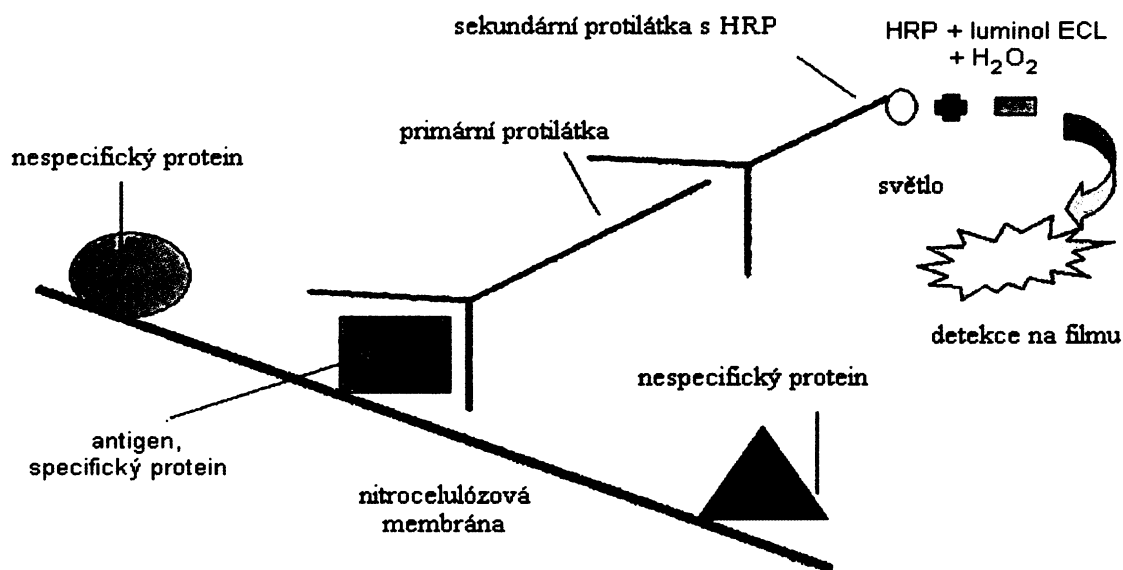
- 1) Membrány blokovat 1 hod roztokem M (50 ml na jednu membránu).
- 2) Membrány promýt 3krát krátce v roztoku TTBS (cca 20 ml TTBS) a toto opakovat 2krát po 5 minutách (celkem 9 promytí).
- 3) V malých plastových zkumavkách s víčkem připravit primární protilátku v TTBS (10 ml TTBS + 5 µl primárního antiséra na jednu membránu). Obsah zkumavky pomalým překlápěním dokonale promíchat.
- 4) Po promytí membrány inkubovat 90 min v roztoku primární protilátky.
- 5) Membrány promýt 3krát krátce v roztoku TTBS (cca 20 ml TTBS) a toto opakovat 2krát po 5 minutách (celkem 9 promytí).
- 6) V plastové lahvičce s víčkem připravit roztok sekundární protilátky v TTBS (20 ml TTBS + 5 µl sekundární protilátky na jednu membránu). Obsah lahvičky pomalu a dokonale promíchat.
- 7) Po promytí membrány inkubovat 1 hod v roztoku sekundární protilátky.

- 8) Membrány promýt 3krát krátce v roztoku TTBS (cca 20 ml TTBS) a toto opakovat 2krát po 5 minutách (celkem 9 promytí).

Tabulka č.4 – Roztoky pro imunodetekci na NC membránách

ROZTOK	POPIS	SLOŽENÍ
TTBS	Roztok NaCl pufrovaný Trisem (0,1M Tris – 2,5 M NaCl – pH 7,5– 0,5 % (v/v) Tween 20)	12,1 g Tris; 146,1 g NaCl; redest.voda do 800 ml; upravit konc.HCl pH na 7,5; přidat 5 ml Tweenu 20; redest.voda do 1000 ml
M	Blokovací roztok (5 % (w/v) sušené mléko v TTBS)	5,0 g nízkotučného sušeného mléka za míchání rozsuspendovat ve 100 ml TTBS

Obr. č.10 – Imunodetekce specifického proteinu technikou ECL



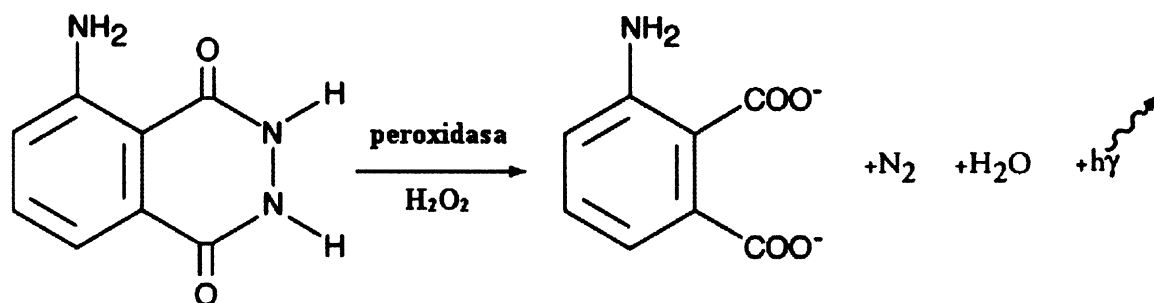
Na specifický protein se naváže primární protilátka, na níž se naváže sekundární protilátka s HRP. Metoda ECL používá cyklického diacylhydrazidu luminolu, který je v mírně alkalickém prostředí oxidován peroxidem vodíku za katalýzy křenovou peroxidasou (HRP). Dochází tak k emisi světla, maximum emise při dané vlnové délce je zachytitelná na film citlivý k modrému světlu ⁽¹²⁴⁾.

4.11. Metoda zesílené chemiluminiscence (ECL)

4.11.1. Princip metody

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

Obrázek č.11 – Oxidace luminolu peroxidem vodíku v zásaditém prostředí katalyzované HRP



4.11.2. Postup ECL

Při této metodě bylo postupováno podle instrukcí výrobce AmershamTM pro ECL, 1997⁽¹²²⁾, některé doporučované materiály ale byly nahrazeny jejich ekonomicky výhodnějšími ekvivalenty. Místo fólie SaranWrapTM byla použita běžná potravinová fólie. Membrány byly exponovány na film Medical X-Ray Film od firmy Foma. Bylo provedeno vždy několik různě dlouhých expozic, aby byl zachycen optimální rozsah denzitometrických objemů pro kvantitativní vyhodnocení.

Pro iPLA₂ byla vyzkoušena optimální doba expozice. Jako výchozí doba expozice byla 1 min. Vždy bylo exponováno ještě několik filmů v časech okolo optima..

Při vyvolávání filmů byla použit přístroj Fomei Optima X-Ray Film Processor[®] od firmy Protec Medizintechnik GmbH & Co. KG. ECL bylo prováděno v temné komoře.

Postup:

- 1) Membrány po imunodetekci okapat a pinzetou přenést proteinovou stranou nahoru na opláchnuté víčko misky Sterilin[®].
- 2) V plastové zkumavce s víčkem připravit vždy čerstvý roztok smícháním roztoků XI a XII v poměru 1:1 (viz tabulka č.5). Obsah zkumavky důkladně promíchat.
- 3) Detekční roztok nalít na připravenou membránu a nechat reagovat 1 min.
- 4) Membránu okapat a pinzetou přenést na fólii tak, aby mezi lícovou stranou membrány a fólií nebyly bubliny a záhyby. Fólie musí být z vnitřní strany naprosto suchá.
- 5) Zabalenou membránu vložit do papírové autoradiografické kazety a za tmy na membránu přiložit autoradiografický film. Kazetu zavřít a zatížit. Nechat exponovat.
- 6) Exponovaný film vložit do přístroje Fomei Optima X-Ray Film Processor[®] a vyčkat, než se film vyvolá.

Tabulka č.5 – Složení roztoků pro ECL

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

4.12. Skenování filmů na stolním skeneru

4.12.1. Princip metody

Při snímání skenerem je objekt osvětlován zdrojem bílého světla. Intenzita prošlého záření je snímána řadou CCD elementů, pohybujících se podél jedné z os přístroje. Signál snímacích elementů je digitalizován, což znamená, že analogové hodnotě odezvy detektoru pro každý snímáný bod je přiřazen jeden z 256 odstínů šedi (tj. celé číslo z intervalu 0 – 255; v případě 8bitové hloubky), diskrétně rozložených přes dynamický rozsah detektoru. Digitální podoba snímané předlohy je uložena do souboru ve formátu .tif na počítači obsluhujícím skener.

4.12.2. Postup skenování

Filmy s ECL byly označeny a skenovány v prošlém světle na skeneru Epson Perfection 1240 U®.

Postup skenování:

- 1) Položit film na čisté sklo skeneru a srovnat ho tak, aby osa tvořená proužky stejné molekulové hmotnosti na filmu byla rovnoběžná s podélnou nebo příčnou osou skeneru.
- 2) Přiklopit víko přístroje a provést předběžné skenování.
- 3) Pro skenování nastavit tyto podmínky:
 - *jas:* 138
 - *kontrast:* 146
 - *typ obrazu:* Black & White Photo
 - *nastavení:* adaptér pro pozitivní film
 - *rozlišení:* 300 dpi
 - *rozměry:* 100 %
 - *formát:* 8bit TIFF uncompressed (přípona .tif)
- 4) Film skenovat za těchto podmínek do souboru pojmenovaného podle označení předlohy.

4.13. Vyhodnocení signálu

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

4.13.1. Postup vyhodnocování

- 1) Soubor s příponou .tif s naskenovaným obrazem filmu otevřít a zobrazit v paletě Pseudo ve falešných barvách mapujících odstíny šedi.
- 2) Skvrny $iPLA_2$ ohraničit objektem typu Rectangle (okolo největší skvrny myší vytvořit obdélník). Překopírujeme objekt na všechny hodnocené skvrny na filmu.
- 3) Objekty skvrn označit čísly stop a uložit.

- 4) Provést objemovou integraci na označených skvrnách s automatickým odečtem hodnoty pozadí (jako hodnota pozadí pro danou skvrnu je brán průměr hodnot pixelů ležících pod obdélníkem ohraničujícím skvrnu (nastavení Local Background). Výsledkem integrace je bezrozměrná hodnota – denzitometrický objem (D.V.) skvrny, získaná sečtením hodnot všech pixelů zahrnutých do skvrny, zmenšená o hodnotu pozadí.
- 5) Obsah výsledkového okna zkopírovat do sešitu programu Microsoft Excel do listu příslušejícího vyhodnocovanému filmu.

4.14. Zpracování dat

Zpracování dat pro jednotlivé filmy bylo částečně automatizováno systémem vzorců provádějících korekce, přepočty na nanášku 1 μg proteinu a výpočty průměru. Data byla zpracována v programu Microsoft Excel, pomocí kterého byly také vynášeny grafy. Denzitometrický objem skvrny byl přepočítán na 1 μg aplikovaného celkového proteinu vzorku. Grafy a tabulky (v kapitole 5) jsou uvedeny v arbitrárních jednotkách nebo v procentech cytosolu. Arbitrární jednotky jsou dány součtem hodnocených denzitometrických objemů, který je roven 100. Procento cytosolu vyjadřuje poměr denzitometrického objemu (přepočítaného na 1 μg proteinu) příslušné partikulární frakce k denzitometrickému objemu (přepočítanému na 1 μg proteinu) cytosolu $\times 100$.

4.15. Statistické zpracování výsledků

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

5. VÝSLEDKY

5.1. Hmotnostní parametry

Tabulka č.6 ukazuje vliv adaptace na chronickou hypoxii na hmotnostní parametry pokusných potkanů. Po adaptaci na chronickou hypoxii se signifikantně snížila hmotnost těla (BW) u hypoxické skupiny na 85 % hodnoty normoxických potkanů. Vyšší hmotnost srdce (HW) u zvířat hypoxické skupiny (105 % normoxických potkanů) byla způsobena především hypertrofií pravé komory (RV; 131 % normoxické kontroly). Hmotnost levé komory (LV) se mírně snížila u hypoxické skupiny (99 % normoxické hodnoty). Relativní hmotnost srdce (HW/BW) se zvýšila ve srovnání s normoxickou skupinou na 123 %. Relativní hmotnost pravé komory (RV/BW) se zvýšila na 150 % odpovídajících normoxických potkanů, zatímco relativní hmotnost levé komory (LV/BW) se po adaptaci na IHA hypoxii zvýšila jen mírně (117 % normoxické kontroly).

Tabulka č.6 – Hmotnostní parametry

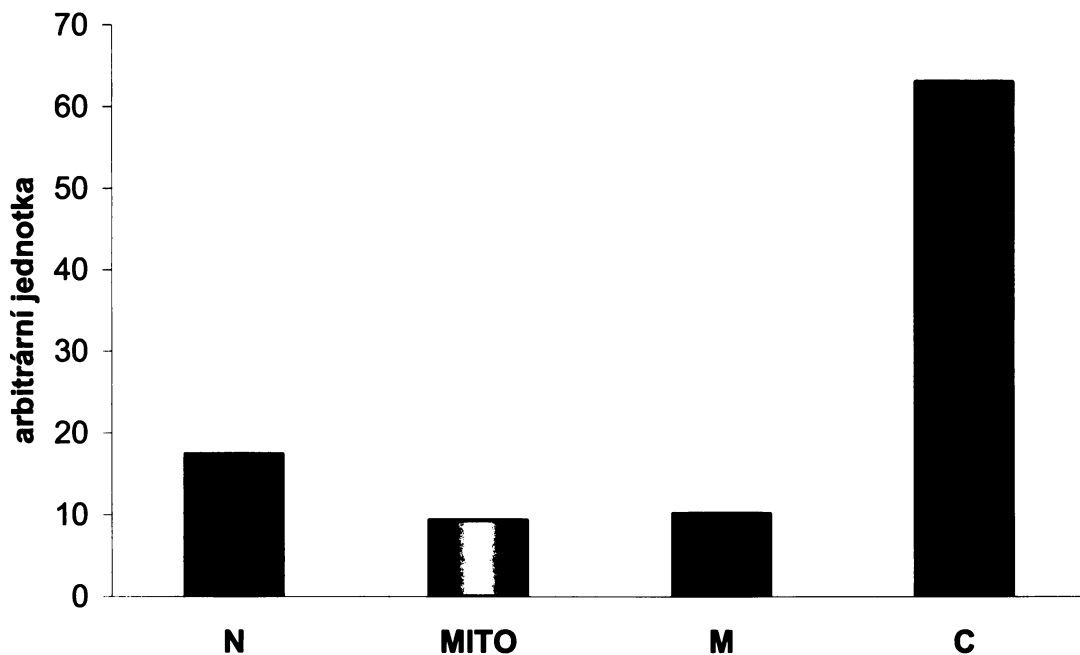
parametry	normoxie	hypoxie
n	4	4
BW [g]	373 ± 2	318 ± 12 *
HW [mg]	831 ± 24	872 ± 34
RV [mg]	177 ± 6	231 ± 15 *
LV [mg]	470 ± 21	465 ± 10
S [mg]	185 ± 7	176 ± 12
HW/BW ($\cdot 10^{-3}$)	2,23 ± 0,07	2,75 ± 0,10 *
RV/BW ($\cdot 10^{-3}$)	0,48 ± 0,02	0,72 ± 0,03 *
LV/BW ($\cdot 10^{-3}$)	1,26 ± 0,06	1,47 ± 0,05 *
S/BW ($\cdot 10^{-3}$)	0,49 ± 0,02	0,55 ± 0,05
RV/LV	0,38 ± 0,03	0,50 ± 0,02 *

Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ± S.E.M. n – počet zvířat ve skupině, BW – hmotnost těla, HW – hmotnost srdce, RV – pravá komora, LV – levá komora, S – septum, HW/BW – relativní hmotnost srdce, RV/BW – relativní hmotnost pravé komory, LV/BW – relativní hmotnost levé komory, S/BW – relativní hmotnost septa.
* - statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$)

5.2. Distribuce iPLA₂ v buněčných frakcích normoxického myokardu

Graf č.2 ukazuje distribuci iPLA₂ v buněčných frakcích normoxického myokardu. Největší relativní zastoupení iPLA₂ je v cytosolu (63 %), následuje nukleární-cytoskeletární-myofibrilární frakce (17 %) a přibližně stejné je zastoupení v membránové (10 %) a mitochondriální frakci (9 %).

Graf č.2 – Relativní zastoupení proteinu iPLA₂ v cytosolu a partikulárních frakcích v levé komoře normoxického myokardu potkana



Výsledky jsou z jednoho frakcionačního pokusu. Vzorky byly hodnoceny z identického filmu. Hodnoty jsou aritmetickým průměrem ze dvou blotů. Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 µg proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. N – nukleární-cytoskeletární-myofibrilární frakce, MITO – mitochondriální frakce, M – membránová frakce, C – cytosol.

5.3. Extrakce iPLA₂ Tritonem X-100

5.3.1. Distribuce iPLA₂ v buněčných frakcích normoxického myokardu po extrakci Tritonem X-100

V tabulce č.7 jsou uvedeny koncentrace proteinů v buněčných frakcích z normoxických srdcí neextrahovaných a extrahovaných 1 % Tritonem X-100. Po extrakci do nukleárního-cytoskeletárního-myofibrilárního extraktu přešlo 21 %, do mitochondriálního extraktu 52 % a do membránového extraktu 48 % proteinu.

Tabulka č.8 a graf č.3 ukazují relativní zastoupení proteinu iPLA₂ v cytosolu a v nukleární-cytoskeletární-myofibrilární, mitochondriální a membránové frakci. Z výsledků vyplývá, že iPLA₂ je velmi dobře extrahovatelná 1 % Tritonem X-100. Po extrakci jednotlivých frakcí došlo k podstatnému zvýšení koncentrace iPLA₂ u nukleární-cytoskeletární-myofibrilární frakce cca 4krát, mitochondriální frakce přibližně 2krát a membránové frakce téměř 6krát.

Tabulka č.7 – Koncentrace proteinů v jednotlivých buněčných frakcích a odpovídajících tritonových extraktech

Koncentrace proteinů ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)			
buněčná frakce	normoxie	buněčná frakce	normoxie - extrakce Tritonem X-100
N	16,18	NE	3,38
MITO	3,54	MITE	1,83
M	5,57	ME	2,66
C	5,34	C	5,32

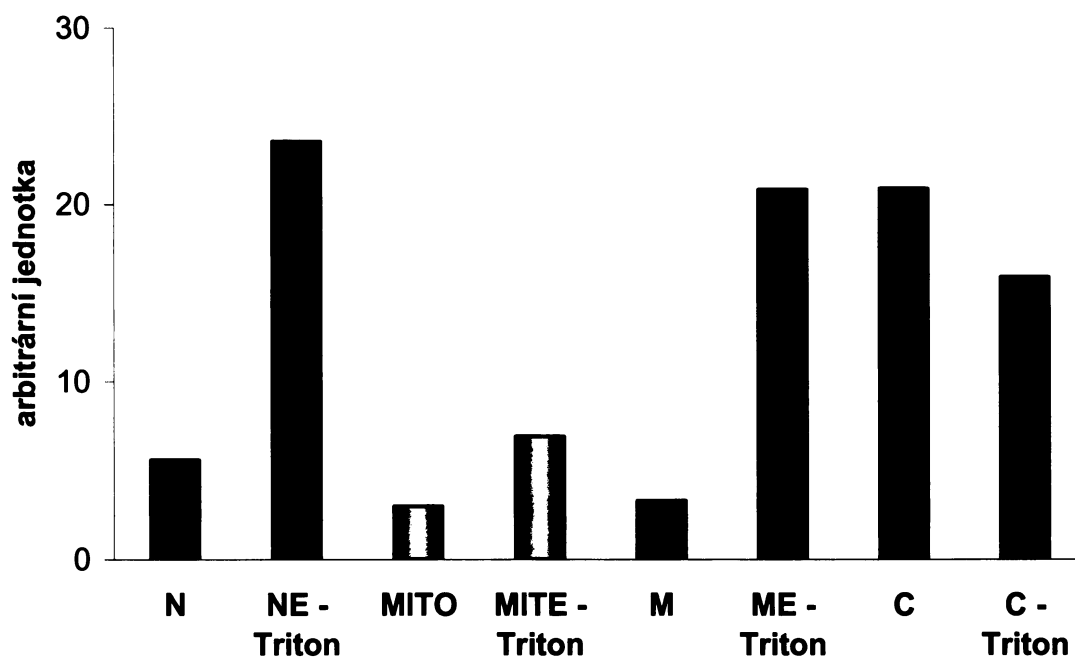
Hodnoty vyjadřují koncentrace proteinů z jednoho frakčního pokusu. N – nukleární-cytoskeletární-myofibrilární frakce, NE – nukleární-cytoskeletární-myofibrilární extrakt, MITO – mitochondriální frakce, MITE – mitochondriální extrakt, M – membránová frakce, ME – membránový extrakt, C – cytosolu.

Tabulka č.8 – Relativní zastoupení proteinu iPLA₂ v cytosolu a partikulárních frakcích z levé komory myokardu potkana neextrahované a extrahované 1 % Tritonem X-100

iPLA ₂ (arbitrární jednotka)			
buněčná frakce	normoxie	buněčná frakce	normoxie - extrakce Tritonem X-100
N	5,59	NE	23,56
MITO	3,00	MITE	6,91
M	3,31	ME	20,85
C	20,90	C	15,89

Výsledky jsou z jednoho frakcionačního pokusu. Vzorby byly hodnoceny z identického filmu. Hodnoty jsou aritmetickým průměrem ze dvou blotů. Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 µg proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. N – nukleární-cytoskeletární-myofibrilární frakce, NE – nukleární-cytoskeletární-myofibrilární extrakt, MITO – mitochondriální frakce, MITE – mitochondriální extrakt, M – membránová frakce, ME – membránový extrakt, C – cytosolu.

Graf č.3 – Relativní zastoupení proteinu iPLA₂ v cytosolu a partikulárních frakcích z levé komory myokardu potkana neextrahované a extrahované 1 % Tritonem X-100



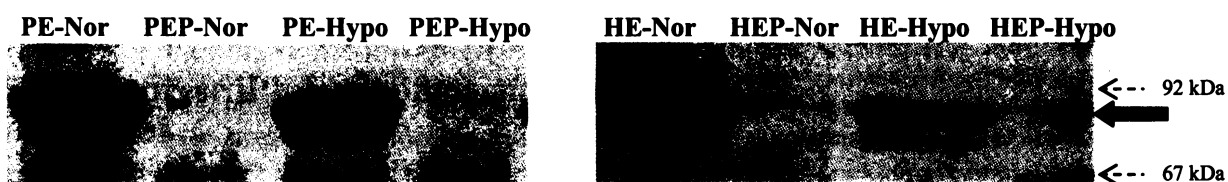
Výsledky jsou z jednoho frakcionačního pokusu. Vzorby byly hodnoceny z identického filmu. Hodnoty jsou aritmetickým průměrem ze dvou blotů. Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 µg proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. N – nukleární-cytoskeletární-myofibrilární frakce, NE – extrakt nukleární-cytoskeletární-myofibrilární frakce, MITO – mitochondriální frakce, MITE – mitochondriální

extrakt, M – membránová frakce, ME – membránový extrakt, C – cytosol, Triton – buněčná frakce extrahovaná 1 % Tritonem X-100.

5.3.2. Účinnost extrakce iPLA₂ Tritonem X-100

Extrakce 1 % Tritonem X-100 představuje částečný purifikační krok, kdy iPLA₂ vázaná na membrány přechází po centrifugaci do supernatantu a proteiny nerozpustné v Tritonu X-100 zůstávají v sedimentu (peletu). Srovnání množství proteinu iPLA₂ v supernatantu partikulárních frakcí a homogenátů normoxické a hypoxické srdeční tkáně s peletem ukázalo, že je extrakce iPLA₂ z membrán 1 % Tritonem X-100 kvantitativní (viz obrázek č.12). Proto jsme v další experimentální sérii analyzovali pouze cytosolu a extrakty homogenátu a partikulární frakce.

Obrázek č.12 – Účinnost extrakce Tritonem X-100



Filmy s ECL signálem, expozice 1 minuta. PE – extrakt partikulární frakce, PEP – pelet partikulární frakce, HE – extrakt homogenátu, HEP – pelet homogenátu, Nor – normoxie, Hypo – adaptace na chronickou hypoxii. Nanášky jsou shodné pro kontrolní i experimentální skupinu: PE a PEP – 12 µg proteinu; HE a HEP – 10 µg proteinu.

5.4. Koncentrace proteinů v cytosolu, extraktech homogenátu a partikulární frakce

Pro každou frakcionaci byla použita levá srdeční komora. V tabulce č.9 jsou uvedeny koncentrace proteinů v cytosolu, extraktech homogenátu a partikulární frakce normoxické a hypoxické tkáně. Statisticky významný rozdíl byl pozorován pouze v případě cytosolu. Koncentrace proteinu byla o 25 % vyšší v cytosolu hypoxické skupiny ve srovnání s normoxickou skupinou.

Tabulka č.9 – Koncentrace proteinů v cytosolu, extraktech (1 % Triton X-100) homogenátu a partikulární frakce z normoxické a hypoxické levé komory myokardu potkana

Koncentrace proteinů ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)		
buněčná frakce	normoxie	hypoxie
HE	3,59 ± 0,18	3,77 ± 0,14
C	4,19 ± 0,29	5,24 ± 0,16 *
PE	3,65 ± 0,14	3,85 ± 0,23

Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr koncentrací proteinů ze čtyř nezávislých pokusů ± S.E.M. HE – extrakt homogenátu, C – cytosol, PE – extrakt partikulární frakce. * - statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$)

5.5. Exprese iPLA₂ v normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komoře myokardu potkana

5.5.1. Exprese iPLA₂ v homogenátu

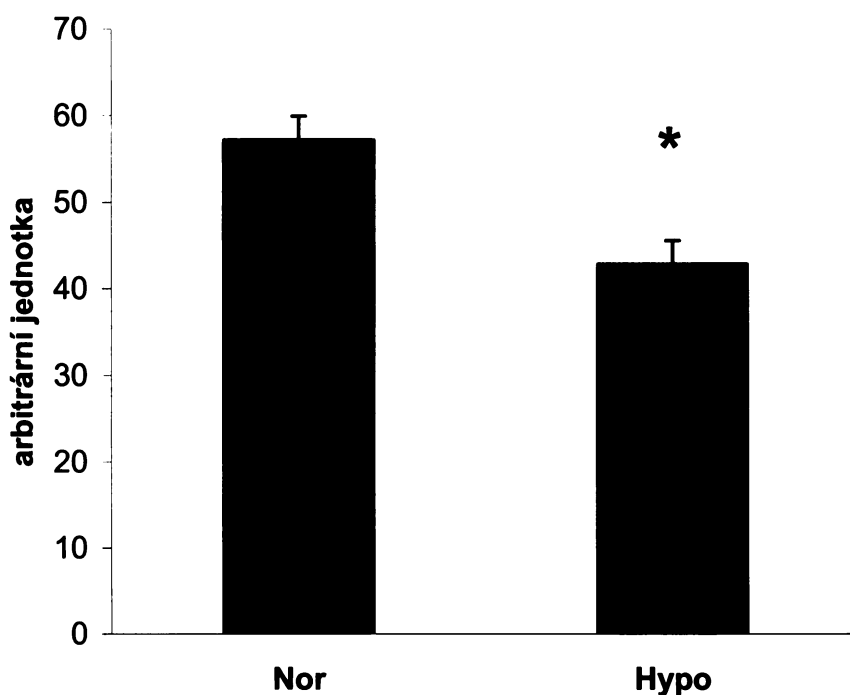
Tabulka č.10 a graf č.4 ukazují expresi iPLA₂ v extraktech homogenátu z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana. Lze pozorovat, že adaptace na chronickou hypoxii snížila expresi iPLA₂ na 75 % normoxické skupiny.

Tabulka č.10 – Exprese iPLA₂ v extraktech homogenátu normoxické a hypoxické levé komory myokardu potkana

iPLA ₂ (arbitrární jednotka)		
buněčná frakce	normoxie	hypoxie
HE	57,19 ± 2,31	42,81 ± 2,31 *

Vzorky byly hodnoceny z identického filmu. Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr z pěti nezávislých pokusů ± S.E.M. Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 μg proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. HE – extrakt homogenátu. * - statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$).

Graf č.4 – Exprese iPLA₂ v extraktech homogenátu z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana



Vzorky byly hodnoceny z identického filmu. Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr z pěti nezávislých pokusů. Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 μ g proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. Nor – normoxie, Hypo – hypoxie. * - statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie ($p < 0,05$).

5.5.2. Exprese iPLA₂ v cytosolu a partikulární frakci

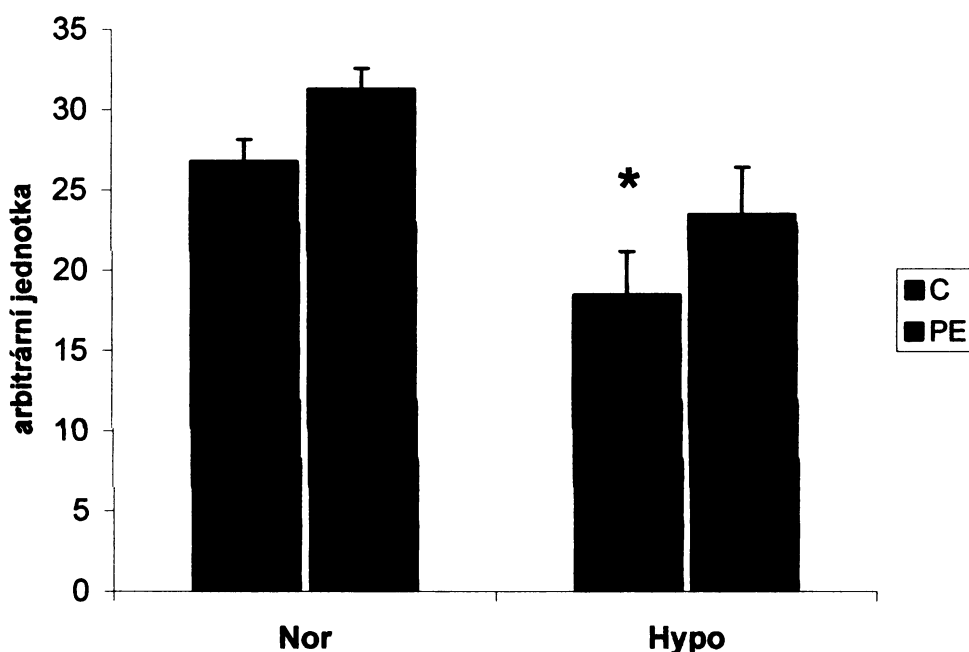
Tabulka č.11 a graf č.5 ukazují expresi iPLA₂ v cytosolu a extraktech partikulární frakce z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana. Po adaptaci na IHA hypoxii bylo pozorováno signifikantní snížení exprese iPLA₂ v cytosolu u hypoxické skupiny na 69 % normoxické skupiny. Podobnou tendenci ke snížení lze pozorovat také v případě partikulární frakce.

Tabulka č.11 – Exprese iPLA₂ v cytosolu a v extraktech partikulární frakce z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana

iPLA ₂ (arbitrární jednotka)		
buněčná frakce	normoxie	hypoxie
C	26,76 ± 1,39	18,46 ± 1,28 *
PE	31,31 ± 2,70	23,47 ± 2,93

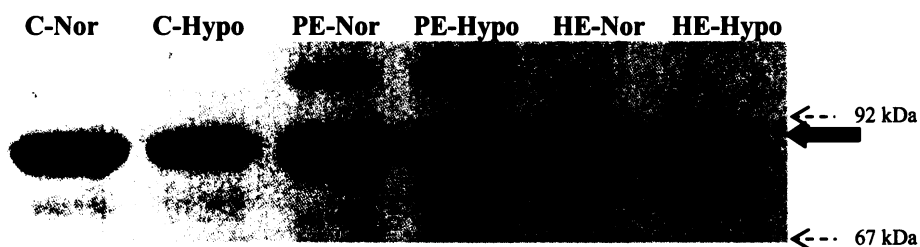
Vzorky byly hodnoceny z identického filmu. Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ze čtyř nezávislých pokusů ± S.E.M. Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 µg proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. C – cytosol, PE – extrakt partikulární frakce. * - statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie (p < 0,05).

Graf č.5 – Exprese iPLA₂ v cytosolu a v extraktech partikulární frakce z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana



Vzorky byly hodnoceny z identického filmu. Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ze čtyř nezávislých pokusů. Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 µg proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. C – cytosol, PE – extrakt partikulární frakce, Nor – normoxie, Hypo – hypoxie. * - statisticky významný rozdíl hypoxie vs. normoxie (p < 0,05).

Obrázek č.13 – Reprezentativní imunoblot exprese iPLA₂ v cytosolu, extraktech homogenátu a partikulární frakce z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana



Filmy s ECL signálem, expozice 1 minuta. C – cytosol, PE – extrakt partikulární frakce, HE – extrakt homogenátu, Nor – normoxie, Hypo – hypoxie. Nanášky pro experimentální skupiny: C – 10 µg proteinu, PE – 12 µg proteinu, HE – 10 µg proteinu.

5.5.3. Distribuce iPLA₂ mezi cytosolem a partikulární frakcí

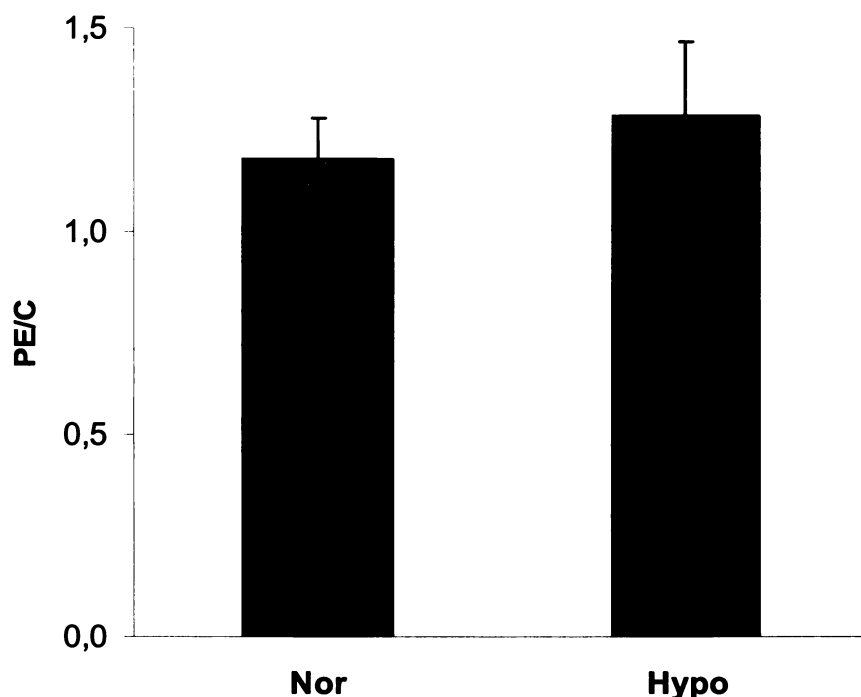
Tabulka č.12 ukazuje distribuci iPLA₂ mezi cytosolem a partikulární frakcí vyjádřenou jako poměr partikulární frakce k cytosolu (PE/C). Graf č.6 ukazuje expresi iPLA₂ vyjádřenou jako poměr extraktu partikulární frakce ku cytosolu (PE/C). Z výsledků vyplývá, že iPLA₂ je téměř rovnoměrně distribuována mezi cytosolem a partikulární frakcí. Adaptace na chronickou hypoxii významně neovlivnila distribuci iPLA₂ mezi partikulární frakcí a cytosolem.

Tabulka č.12 – Distribuce iPLA₂ mezi cytosolem a partikulární frakcí v normoxické a hypoxické levé komoře myokardu potkana

iPLA ₂		
buněčná frakce	normoxie	hypoxie
PE/C	1,18 ± 0,10	1,28 ± 0,18

Denzitometrické objemy vzorků (vztaženo na 1 µg proteinu) pro výpočet PE/C byly hodnoceny z identického filmu. Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ze čtyř nezávislých pokusů ± S.E.M. C – cytosol, PE – extrakt (1 % Triton X-100) partikulární frakce.

Graf č.6 – Distribuce iPLA₂ mezi cytosolem a partikulární frakcí



Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ze čtyř nezávislých pokusů. Denzitometrické objemy vzorků (vztaheno na 1 μ g proteinu) pro výpočet PE/C byly hodnoceny z identického filmu. Chybové úsečky vyjadřují S.E.M. C – cytosol, PE – extrakt (1 % Triton X-100) partikulární frakce, Nor – normoxie, Hypo – hypoxie.

5.6. Vliv NAC na expresi iPLA₂ v extraktech homogenátu v normoxickém a na chronickou hypoxii adaptovaném myokardu

Tabulka č.13 a graf č.7 ukazují vliv NAC na expresi iPLA₂ v extraktech homogenátu z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana. Podobně jako v předchozím experimentu (viz kapitola 5.5.1.) lze pozorovat, že adaptace na chronickou hypoxii snížila expresi iPLA₂ v homogenátu na 61 % normoxické skupiny. Na rozdíl od předchozího experimentu však pokles vyvolaný adaptací na chronickou hypoxii nebyl signifikantní vzhledem k velkému rozptylu hodnot.

Podání NAC snížilo relativní množství iPLA₂ v normoxické tkáni, kdežto v hypoxické tkáni dochází k návratu relativního množství iPLA₂ na původní kontrolní hodnotu. Lze pozorovat, že podání NAC vedlo u normoxické skupiny ke snížení exprese

iPLA₂ na 65 % odpovídající kontroly. Avšak u hypoxické skupiny NAC naopak zvýšil expresi iPLA₂ o 66 % ve srovnání s odpovídající hypoxickou skupinou.

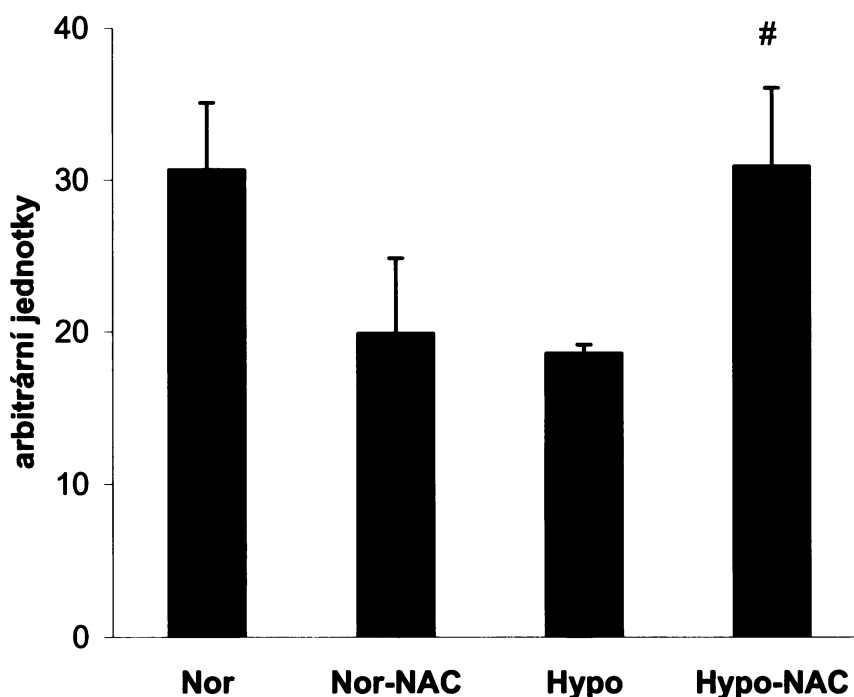
Tyto výsledky dobře korelují s vlivem NAC na velikost infarktu ⁽⁴⁹⁾ u normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana.

Tabulka č.13 – Expresie iPLA₂ v extraktech homogenátu z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana: vliv NAC

iPLA ₂ (arbitrární jednotka)				
buněčná frakce	normoxie	normoxie + NAC	hypoxie	hypoxie + NAC
HE	30,66 ± 4,2	19,88 ± 4,96	18,57 ± 0,58	30,89 ± 5,18 #

Vzorky byly hodnoceny z identického filmu. Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ze čtyř nezávislých pokusů ± S.E.M. Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 µg proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. HE – extrakt homogenátu, NAC – N-acetylcystein. # - statisticky významný rozdíl hypoxie + NAC vs. hypoxie (p < 0,05).

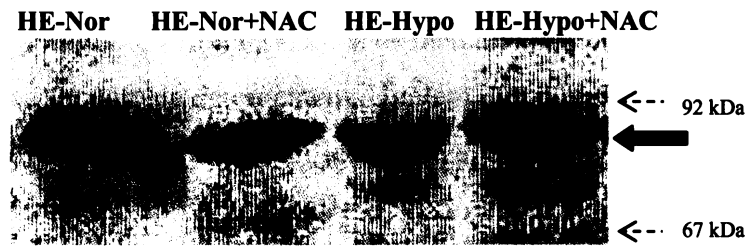
Graf č.7 – Expresie iPLA₂ v extraktech homogenátu z normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana: vliv NAC



Vzorky byly hodnoceny z identického filmu. Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr ze čtyř nezávislých pokusů. Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (vztaženo na 1 µg proteinu) všech experimentálních skupin je 100 %. Chybové úsečky

vyjadřují S.E.M. Nor – normoxie, Hypo – hypoxie, NAC – N-acetylcystein. # - statisticky významný rozdíl hypoxie vs. hypoxie + NAC ($p < 0,05$).

Obrázek č.14 – Reprezentativní imunoblot exprese iPLA₂ v extraktech homogenátu z normoxického a na chronickou hypoxii adaptovaného myokardu: vliv NAC.



Filmy s ECL signálem, expozice 1 minuta. HE – extrakt homogenátu, Nor – normoxie, Hypo – hypoxie, NAC – N-acetylcystein. Nanášky jsou pro všechny čtyři experimentální skupiny stejné – 10 μ g proteinu.

6. DISKUZE

Problematika spojená s úlohou iPLA₂ v mechanismu protekce myokardu indukované chronickou hypoxií zatím nebyla na našem pracovišti studována, proto prvním úkolem diplomové práce bylo zavedení stanovení exprese tohoto enzymu metodou imunodetekce pomocí specifické protilátky. Dalším metodickým problémem bylo vyřešit otázku, zda je iPLA₂ extrahovatelná detergentem. Úkolem druhé experimentální části práce bylo zjistit, jak je iPLA₂ distribuovaná mezi jednotlivými buněčnými frakcemi v srdeční tkáni, jaký vliv bude mít na její expresi adaptace na chronickou hypoxii a jakou úlohu zde hrají ROS.

6.1. Imunodetekce iPLA₂ v srdci

Pro detekci iPLA₂ jsme použili primární protilátku od firmy Cayman, která je v současné době jedinou komerčně dostupnou protilátkou běžně používanou pro stanovení exprese tohoto enzymu i v ostatních studiích^(91, 94, 125). Specifitu ECL signálu sledovaného enzymu jsme ověřili srovnáním s pozicí barevných proteinových standardů o známých molekulových hmotnostech. Kontrolní buněčné extrakty ani imunizační peptid k blokaci protilátky nejsou komerčně dostupné. Výhodou je, že se v okolí ECL signálu iPLA₂ nevyskytuje žádný nespecifický signál jiného proteinu. Podobně jako v jiných studiích jsme iPLA₂ detekovali jako proužek o průměrné molekulové hmotnosti 85 – 88 kDa^(76, 91, 94, 125).

6.2. Distribuce iPLA₂ v buněčných frakcích normoxického myokardu, extrakce detergentem

Homogenizační a frakcionační postupy v experimentu s buněčnými frakcemi normoxického myokardu vycházejí z metod, které v naší laboratoři zavedla Irena Marková^(126, 127). Frakcionovali jsme tkáň uchovávanou v tekutém dusíku, rozdrčenou na jemný prášek a poté homogenizovanou v Potter-Elvehjemově homogenizátoru podobně jako jiní autoři^(115, 116).

Diferenciální centrifugací jsme získali čtyři buněčné frakce (nukleární-cytoskeletární-myofibrilární, mitochondriální, membránovou frakci a cytosol). Z literatury vyplývá, že se údaje o distribuci iPLA₂ na membránách a v cytosolu značně liší. Některé práce říkají, že v nestimulovaných buňkách myokardu je největší relativní zastoupení iPLA₂ v cytosolu a teprve po stimulaci (např. při ischemii a reperfúzi) tento enzym translokuje na mitochondriální membrány ⁽⁶⁸⁾ a na nukleární membrány ⁽¹⁴¹⁾, a stimuluje tak jejich katabolismus. Jiné práce uvádějí, že je iPLA₂ převážně asociována s membránovými frakcemi ^(77, 94, 109). Zdá se, že její přítomnost v jednotlivých buněčných frakcích závisí na typu tkáně ⁽⁷²⁾, a co se týče myokardu, záleží na živočišném druhu. Výše citované práce studovaly iPLA₂ především v králíčích a lidských myocytech. V našem experimentu, který jsme prováděli na myokardu potkana, je iPLA₂ za normoxických podmínek nejvíce zastoupena v cytosolu, dále v nukleární-cytoskeletární-myofibrilární frakci a následuje přibližně stejné relativní množství v mitochondriální a membránové frakci.

Z literatury je známo, že periferní enzymy jsou dobře extrahovatelné z membrán detergenty. Tohoto jevu se využívá k obohacení membránových frakcí daným proteinem, příkladem takového enzymu je PKC ⁽⁴⁹⁾. V případě iPLA₂ v myokardu se analýzy doposud prováděly pouze na buněčných frakcích bez extrakce detergentem ^(94, 125, 128). Existuje však studie na basofilních leukemických buňkách potkana, kde tuto metodu použili, a ukázalo se, že iPLA₂ je Tritonem X-100 z membrán velmi dobře extrahovatelná ⁽⁷⁶⁾. V našem experimentu srovnání neextrahovaných buněčných frakcí a frakcí po extrakci detergentem Tritonem X-100 tento fakt potvrdilo. Extrakce detergentem představovala částečný purifikační krok, při němž došlo k největšímu obohacení proteinem iPLA₂ u nukleární-cytoskeletární-myofibrilární frakce, následovala membránová frakce a k nejmenšímu obohacení proteinem iPLA₂ došlo u frakce mitochondriální. Je třeba zdůraznit, že extrakce detergentem je výhodná v případě, srovnáváme-li různé experimentální skupiny a chceme-li daný protein ve zkoumaném vzorku tkáně obohatit. Tento přístup jsme proto zvolili v naší další experimentální studii, kde jsme srovnávali expresi iPLA₂ v normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komoře myokardu.

6.3. Exprese a distribuce iPLA₂ v normoxickém a na chronickou hypoxii adaptovaném myokardu – vliv NAC

6.3.1 Hmotnostní parametry

Adaptace potkanů na výškovou hypoxii vedla ke snížení jejich tělesné hmotnosti. Tento výsledek je v souladu s pracemi, které se zabývají adaptací na chronickou hypoxii ve vysoké nadmořské výšce ^(13, 17, 112, 126, 127, 129, 130). Vlivem adaptace na výškovou hypoxii zřejmě dochází ke stresu, který vede ke sníženému příjmu potravy, a také k retardaci růstu.

V průběhu adaptace na výškovou hypoxii dochází k plicní hypertenzi, která ovlivňuje zejména hmotnost a funkci pravé komory srdeční. Dochází ke zvýšení její zátěže a k rozvoji hypertrofie. Na zvýšení hmotnosti srdce se tedy podílí především růst hmotnosti pravé komory srdeční, což je v souladu s předchozími pracemi ^(17, 112, 126, 129, 130). Relativní hmotnost pravé komory (RV/BW) se podstatně zvýšila, zatímco relativní hmotnost levé komory (LV/BW) se po adaptaci na IHA hypoxii zvýšila jen mírně, což je v souladu ostatními pracemi ^(112, 126, 127, 130).

6.3.2. Exprese a distribuce iPLA₂

V tomto experimentu jsme sledovali změny relativního zastoupení iPLA₂ v cytosolu, v extraktech homogenátu a partikulární frakce v levé komoře myokardu potkana při normoxii a po adaptaci na IHA hypoxii. Z výsledků vyplývá, že po adaptaci na chronickou hypoxii se snížila exprese iPLA₂ v homogenátu, tento pokles je způsoben především nižším množstvím tohoto enzymu v cytosolu.

Je třeba konstatovat, že naše studie poprvé analyzovala expresi iPLA₂ v myokardu po dlouhodobé adaptaci na hypoxické podmínky a byl zde pozorován její pokles. Existuje další práce na kultuře buněk endotelu vystavených dlouhodobému působení chronické hypoxie, kde podobně jako my pozorovali snížení aktivity PLA₂ na polovinu ⁽¹³¹⁾. Naopak, McHowat a spol. pozorovali na kardiomyocytech králíka vystavených krátké hypoxické epizodě zvýšení aktivity na membránu vázané iPLA₂, provázené vzestupem hladiny kyseliny arachidonové a lysoplasmenylcholinu. Prokázali zde také souvislost iPLA₂ s elektrofyziologickými změnami vedoucími k arytmiogenezi, která byla pomocí specific-

kého inhibitoru tohoto enzymu (BEL) potlačena ⁽¹²⁵⁾. Zvýšená incidence letálních ventrikulárních arytmií ve spojení se zvýšenou expresí iPLA₂ byla prokázána na modelu transgenních myší, u nichž byla v srdci exprimována lidská srdeční iPLA₂. Srdce těchto myší vystavená ischemii/reperfúzi vykazovala podstatně vyšší incidenci letálních ventrikulárních arytmií než srdce kontrolní. Inhibitor BEL podaný těsně před ischemií zabránil těmto arytmiím ⁽¹³²⁾.

Z dosavadních studií vyplývá, že iPLA₂ může působit protektivně prostřednictvím remodelace fosfolipidů v poškozených membránách. Podle těchto studií hraje iPLA₂ význačnou roli v ochraně buněčných membrán před oxidačním poškozením ⁽¹⁰⁹⁾. Vlivem konformačních změn, které v membráně nastanou u oxidačně modifikovaných fosfolipidů, se zvýší aktivita iPLA₂ na membránách ^(94, 95). To znamená, že iPLA₂ přednostně hydrolyzuje peroxidované FA z membránových fosfolipidů, které jsou pak v recylačně-deacylačním cyklu reparovány, čímž iPLA₂ pomáhá udržovat fyziologickou funkci membrán ^(62, 96, 97). Tento význam iPLA₂ lze demonstrovat v případě kardiotoxických účinků anthracyklinů, které jsou účinnými farmaky při protinádorové terapii. Vedlejší toxické účinky anthracyklinů totiž spočívají ve zvyšování oxidační zátěže indukci tvorby superoxidových radikálů, které způsobují peroxidaci fosfolipidů v membráně ⁽⁹⁴⁾. Bylo prokázáno, že inhibice iPLA₂ způsobená anthracykliny v srdečních buňkách je jednou z příčin jejich kardiotoxicity, protože se sníží schopnost kardiomyocytů opravovat fosfolipidy poškozené oxidačním stresem ^(94, 128).

Na druhou stranu však může iPLA₂ za určitých podmínek působit poškozujícím účinkem. Při srdeční ischemii a reperfúzi, kdy dochází ke snížení zásob ATP v srdečních buňkách, iPLA₂ již pouze fosfolipidy odbourává, nedochází k jejich obnově, a tak membrány poškozuje a přispívá k buněčné smrti ^(81, 75, 111).

V našem experimentu jsme po adaptaci na chronickou hypoxii pozorovali signifikantní pokles relativního zastoupení iPLA₂ v levé komoře myokardu potkana. Jak bylo řečeno v úvodu, adaptace na IHA hypoxii způsobí dlouhodobé zvýšení odolnosti myokardu k ischemicko/reperfúznímu poškození potvrzené menším rozsahem infarktového ložiska, snížením kontraktilní dysfunkce a zmírněním arytmogeneze ^(16, 17). Mechanismus tohoto protektivního účinku není dosud plně objasněn, ale výsledky naší skupiny a jiných naznačují, že se zde uplatňují mitochondriální na ATP závislé draslíkové kanály (mitoK_{ATP}), PKC a ROS ^(11, 112). Z literárních údajů vyplývá, že existuje úzký vztah mezi iPLA₂ vázané na mitochondriální membrány a otevíráním mitoK_{ATP} kanálů. Otevření těchto kanálů vyvolá protekci a naopak inhibice těchto kanálů během dějů vyvolávajících

protekcí tento protektivní efekt potlačuje ⁽¹¹⁾. AA uvolněná z fosfolipidů prostřednictvím iPLA₂ uzavírá mitoK_{ATP} kanály, a tím ruší protekcí ⁽¹³³⁾. Předpokládá se tedy, že při ischemii/reperfúzi redukce velikosti infarktu pozorovaná po inhibici iPLA₂ může být způsobena nejen omezením degradace fosfolipidů, ale také prostřednictvím mechanismu zahrnujícího mitoK_{ATP} kanály ⁽⁶⁸⁾. Bylo také prokázáno, že mitoK_{ATP} kanály, PKCε a iPLA₂ jsou zahrnuty v ochraně srdečních mitochondrií vyvolané urokortinem, malým „cortikotropin releasing“ hormonem, který chrání myocyty jak před nekrózou, tak před apoptózou ⁽¹³⁴⁾.

Studie McHowat a spol. naznačuje, že se PKCε uplatňuje při aktivaci trombinem stimulovaných králičích kardiomyocytů ⁽¹³⁵⁾. PKCε patří mezi skupinu nových isoform PKC, které se uplatňují v mechanismu kardioprotekce preconditioningu ^(7, 136) i adaptace na chronickou hypoxii ⁽¹³⁷⁾. Bylo ukázáno, že po adaptaci na chronickou hypoxii se v levé komoře myokardu potkana zvyšuje exprese PKCδ v negativní korelaci s velikostí infarktu, zatímco PKCε klesá ⁽¹³⁸⁾. Zda má toto pozorování spojitost s funkcí iPLA₂ a její úlohou v kardioprotekci, je zatím nejasné.

6.3.3. Úloha ROS a vliv N-acetylcysteinu

Sledovali jsme vliv antioxidantu NAC na relativní zastoupení iPLA₂ v extraktech homogenátu u normoxické a na chronickou hypoxii adaptované levé komory myokardu potkana. Chronická hypoxie je spojena s nárůstem oxidačního stresu ^(139, 140). Zároveň bylo prokázáno, že se ROS podílejí na indukci kardioprotekce vyvolané adaptací na chronickou hypoxii přesto, že v podmínkách akutní ischemie a reperfúze mají škodlivé účinky ⁽¹¹⁾. Potvrzením byl zejména experiment, v němž podávání antioxidantu NAC během adaptace na chronickou hypoxii odstranilo protektivní efekt chronické hypoxie na snížení velikosti infarktu ⁽⁴⁹⁾. NAC zde zablokoval produkci ROS, které vznikají během adaptace na chronickou hypoxii, působení ROS je pravděpodobně nezbytné k vyvolání protekce ⁽⁴⁹⁾.

Položili jsme si proto otázku, zda se na pozorovaném snížení exprese iPLA₂ v chronicky hypoxickém myokardu mohou podílet také ROS. Výsledky našeho experimentu ukázaly, že u skupiny potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii podávání NAC během adaptace vrátilo množství iPLA₂ v homogenátu na hodnoty normoxických kontrol. Tento výsledek velmi dobře koreluje s měřením velikosti infarktu v předchozí práci, kde

taktéž došlo k eliminaci kardioprotekce po podání NAC u chronicky hypoxické skupiny ⁽⁴⁹⁾. Zdá se tedy, že v procesu adaptace na chronickou hypoxii jsou ROS důležité nejen k indukci kardioprotekce, ale jsou přinejmenším jednou z příčin poklesu exprese iPLA₂.

Prokázali jsme, že se exprese iPLA₂ v podmínkách adaptace na chronickou hypoxii snižuje. V experimentální sérii s antioxidantem NAC jsme došli k závěru, že exprese iPLA₂ při adaptaci na chronickou hypoxii je také negativně ovlivňována zvýšenou produkcí ROS. Zda a do jaké míry hraje snížení iPLA₂ roli v mechanismu kardioprotekce vyvolané po adaptaci na chronickou hypoxii ve vysoké nadmořské výšce proti akutnímu ischemicko/reperfúznímu poškození zbývá objasnit např. pomocí specifických inhibitorů iPLA₂. Je však možné předpokládat, že vyřešení této otázky by mohlo mít značný význam v klinické praxi.

7. SHRNU TÍ

Výsledky této diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

- **Distribuce iPLA₂ v buněčných frakcích normoxického myokardu**
 - iPLA₂ je v normoxickém myokardu nejvíce zastoupena v cytosolu (63 %), dále v nukleární-cytoskeletární-myofibrilární frakci (17 %) a přibližně stejně v membránové (10 %) a mitochondriální frakci (9 %)

- **Extrakce detergentem Tritonem X-100**
 - extrakce iPLA₂ z membrán 1% Tritonem X-100 je kvantitativní
 - po extrakci Tritonem X-100 došlo k výraznému zvýšení koncentrace iPLA₂ u membránové frakce (6krát), nukleární-cytoskeletární-myofibrilární frakce (4krát) a mitochondriální frakce (2krát)

- **Vliv chronické hypoxie na expresi iPLA₂**
 - adaptace na chronickou hypoxii snížila relativní množství iPLA₂ v homogenátu o 25 %, v cytosolu o 31 % a obdobný trend lze pozorovat i u partikulární frakce

- **Vliv NAC na expresi iPLA₂**
 - dlouhodobé podávání antioxidantu NAC během adaptace na chronickou hypoxii odstranilo efekt chronické hypoxie na expresi iPLA₂

ZÁVĚR:

Naše výsledky ukázaly, že 85 kDa iPLA₂ je za normoxických podmínek přítomna v myokardu potkana především v cytosolu. Po adaptaci na chronickou hypoxii se její množství proporcionálně snižuje jak v cytosolu, tak v partikulární frakci. Je pravděpodobné, že se na pozorovaném efektu podílí zvýšená produkce ROS během adaptace na chronickou hypoxii, protože podávání antioxidantu NAC efekt hypoxie na iPLA₂ kompletně potlačilo. Roli iPLA₂ v mechanismu kardioprotekce vyvolané po adaptaci na chronickou hypoxii proti akutnímu ischemicko/reperfúznímu poškození však zbývá objasnit.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1) Hearse, D.J.: Ischemia, reperfusion, and the determinant of tissue injury. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **4**, 767-776 (1990)
- 2) Solaini, G., Harris, D.A.: Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischemia and reperfusion; *Biochem. J.* **390**, 377-394 (2005)
- 3) Murry, C.E., Jennings, R.B., Reimer, K.A.: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium; *Circulation* **74** (5), 1124-1136 (1986)
- 4) Bolli, R.: The Late Phase of Preconditioning; *Circ. Res.* **87**, 972-983 (2000)
- 5) Kloner, R.A., Jennings, R.B.: Consequences of Brief Ischemia: Stunning, Preconditioning, and Their Clinical Implications: Part 1; *Circulation* **104**, 2981-2989 (2001)
- 6) Ytrehus, K., Liu, Y., Downey, J.M.: Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation; *Am. J. Physiol.* **267**, H2383-H2390 (1994)
- 7) Speechly – Dick, M.E., Mocanu, M.M., Yellon, D.M.: Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat; *Circ. Res.* **75**, 586-590 (1994)
- 8) Moret, P.R.: Hypoxia and the heart; V knize: *Hearts and Heart-like Organs* (Bourne, G.H. ed.), Academic Press, New York, str. 333-387 (1980)
- 9) <http://cs.wikipedia.org/wiki/Hypoxie>
- 10) Ošťádal, B., Kolář, F., Pelouch, V., Procházka, J., Widimský, J.: Intermittent high altitude and cardiopulmonary system; v knize *The adapted heart*, (Nagano, M., Takeda, N., Dhalla, N.S., ed.) Raven Press, New York, p.173-182 (1994)
- 11) Kolář, F., Ošťádal, B.: Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia *Physiol. Res.* **53** (1), S3-S13 (2004)
- 12) Kopecký, M., Daum, S.: Adaptace tkáně myokardu potkana na anoxii; *Českoslov. Fyziol.* **7**, 518-521 (1958)
- 13) Widimský, J., Urbanová, D., Ressler, J., Ošťádal, B., Pelouch, V., Procházka, J.: Effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in the rat; *Cardiovasc. Res.* **7**, 798-808 (1973)
- 14) McGrath, J.J., Procházka, J., Pelouch, V., Ošťádal, B.: Physiological responses of rats to intermittent high-altitude stress: effects of age; *J. Appl. Physiol.* **34**, 289-293 (1973)

- 15) Kolář, F., Ošťádal, B., Procházka, J., Pelouch, V., Rajecová, O., Štrece, V., Barta, E.: *Physiol. Bohemoslov.* 37, 433-449 (1988)
- 16) Neckář, J.: Protektivní vliv chronické hypoxie na akutní ischemické poškození myokardu. Diplomová práce PřF UK Praha, Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie, str. 50-58 (1998)
- 17) Koten, L.: Vliv chronické hypoxie na ischemické poškození kontraktilní funkce myokardu. Diplomová práce PřF UK Praha, Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie, str. 59-78 (1998)
- 18) Dhalla, N.S., Elmoselhi, A.B., Hata, T., Makino, N.: Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury, *Cardiovasc. Res.* 47, 446-456 (2000)
- 19) Richalet, J.-P., Hornych, A., Rathat, T., Aumont, J., Larmignat, P., Rémy, P.: Plasma prostaglandins, leukotrienes and thromboxane in acute high altitude hypoxia; *Resp. Physiol.* 85, 205-215 (1991)
- 20) Iwaki, K., Shun-Hua, Ch., Dillmann, W.H., Mestril, R.: Induction of HSP70 in cultured rat neonatal cardiomyocytes by hypoxia and metabolic stress; *Circulation* 87, 2023-2032 (1993)
- 21) Hrbasová, M., Novotný, J., Hejnová, L., Kolář, F., Neckář, J., Svoboda, P.: Altered myocardial G_s protein and adenylyl cyclase signaling in rats exposed to chronic hypoxia and normoxic recovery; *J. Appl. Physiol.* 94, 2423-2432 (2003)
- 22) Bass, A., Ošťádal, B., Procházka, J., Pelouch, V., Šamánek, M., Stejskalová, M.: Intermittent high altitude-induced changes in energy metabolism in the rat myocardium and their reversibility; *Physiol. Bohemoslov.* 38, 155-161 (1989)
- 23) Kolář, F., Ošťádal, B., Procházka, J., Pelouch, V., Widimský, J.: Comparison of cardiopulmonary response to intermittent high-altitude hypoxia in young and adult rats; *Respiration* 56, 57-62 (1989)
- 24) Kolář, F., Ošťádal, B.: Right ventricular function in rats with hypoxic pulmonary hypertension; *Pflug. Arch.* 419, 121-126 (1991)
- 25) Ošťádal, B., Widimský, J.: Intermittent hypoxia and cardiopulmonary system; *Academia, Prague* (1985)
- 26) Jacobson, M.D.: Reactive oxygen species and programmed cell death; *Trends Biochem. Sci.* 21 (1996)
- 27) Ošťádal, B., Procházka, J., Pelouch, V., Urbanová, D., Widimský, J., Faltová, E., Staněk, V.: Pharmacological treatment and spontaneous reversibility of

- cardiopulmonary changes induced by intermittent high altitude hypoxia; *Prog. Resp. Res.* 29, 17-25 (1985)
- 28) Iverson, S.L., Orrenius, S.: The cardiolipin-cytochrome c interaction and the mitochondrial regulation of apoptosis; *Arch. Biochem. Biophys.* 423 (1), 37-46, (2004)
 - 29) Petrosillo, G., Di Venosa, N., Ruggiero, F.M., Pistolese, M., D'Agostino, D., Tiravanti, E., Fiore, T., Paradies, G.: Mitochondrial dysfunction associated with cardiac ischemia/reperfusion can be attenuated by oxygen tension control. Role of oxygen-free radicals and cardiolipin; *Biochim. Biophys. Acta* 1710 (2-3), 78-86, (2005)
 - 30) Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., Federici, A., Ruggiero, F.M.: Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin; *Circ. Res.*, 94 (1), 53-9, (2004)
 - 31) Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., Lesnefsky, E.J.: Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III; *J. Biol. Chem.* 278 (38), 36027-31 (2003)
 - 32) Goldenthal, M.J., Marin-Garcia, J.; Mitochondrial signaling pathways: a receiver/integrator organelle; *Mol. Cell. Biochem.* 262 (1-2), 1-16 (2004)
 - 33) Skulachev, V.P.; The programmed death phenomena, aging, and the Samurai law of biology; *Exp. Gerontol.* 36 (7), 995-1024 (2001)
 - 34) <http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh294/images/koopfig3.gif&imgrefurl=http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh294/274-280.htm&h=363&w=400&sz=20&hl=cs&start=19&um=1&tbnid=DTKp1btsRVVb3M:&tbnh=113&tbnw=124&prev=/images%3Fq%3Dsource%2Breactive%2Boxxygen%2Bspecies%26um%3D1%26hl%3Dcs%26lr%3D%26sa%3DN>
 - 35) Kamata, H., Hirata, H.: Redox Regulation of cellular signalling; *Cell Signal.* 11 (1), 1-14 (1999)
 - 36) Martínez, J., Moreno, J.J.: Role of Ca²⁺-independent phospholipase A₂ on arachidonic acid release induced by reactive oxygen species; *Arch. Biochem. Biophys.* 392 (2), 257-262 (2001)
 - 37) Adibhatla, R.M., Dempsey, R., Hatcher, J.F.: Integration of cytokine biology and lipid metabolism in stroke; *Front Biosci.* 13, 1250-1270 (2008)

- 38) Finkel, T.: Oxygen radicals and signaling; *Curr. Opin. Cell Biol.*; 10, 248-253 (1998)
- 39) Kelly, G.S.: Clinical applications of N-acetylcysteine; *Alter. Med. Rev.*; 3 (2), 114-127 (1998)
- 40) De Caro, L., Ghizzi, A., Costa, R.: Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcystein in healthy volunteers; *Fortschr. Arzneimittelforsch.*; 39, 382-385 (1989)
- 41) Bonanomi, L., Gazzaniga, A.: Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine; *Eur. J. Respir. Dis.*; 61, 45-51 (1980)
- 42) De Vries, N., De Flora, S.: N-Acetyl-1-Cystein; *J. Cell. Biochem.*; 17F, S270-S277 (1993)
- 43) De Flora, S., Bennicelli, C., Camoirano, A.: In vivo effect of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds; *Carcinogenesis.*; 6, 1735-1745 (1985)
- 44) Štípek, S., a kol.: kniha Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci; Grada Publishing, str. 287-288 (2000)
- 45) Gavish, D., Breslow, J.L.: Lipoprotein(a) reduction by N-acetylcystein; *Lancet.* 337, 203-204 (1991)
- 46) Wiklund, O., Fager, G., Andersson, A.: N-acetylcystein treatment lowers plasma homocysteine but not serum lipoprotein(a) levels; *Atherosclerosis* 119, 99-106 (1996)
- 47) Ceconi, C., Curello, S., Cargnoni, A.: The role of glutathione status in the protection against ischemic and reperfusion damage: effects of N-acetylcysteine; *J. Mol. Cell. Cardiol.* 20, 5-13 (1988)
- 48) Rossoni, G., Radice, S.: Influence of Acetylcysteine on Aggravation of Ischemic Damage in ex vivo Hearts of Rats Exposed to Hyperbaric Oxygen; *Drug. Res.* 47 (I): 710-715 (1997)
- 49) Kolář, F., Ježková, J., Balková, P., Břeh., J., Neckář, J., Novák, F., Nováková, O., Tomášová, H., Srbová, M., Ošťádal, B., Wilhelm, J., Herget, J.: Role of oxidative stress in PKC- δ upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia; *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, H224-H230 (2007)
- 50) Balková, P., Neckář, J., Milerová, M., Novák, F., Kolář, F., Nováková, O.: Mitochondrial MnSOD in protection of the heart adapted to chronic hypoxia; abstrakt (2005)

- 51) Burdon, R.H., Rice-Evans, C.: Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation; *Free Radic. Res. Commun.* 6, 345-358 (1989)
- 52) Nose, K.: Role of reactive oxygen species in the regulation of physiological functions; *Biol. Pharm. Bull.* 23, 897-903 (2000)
- 53) Brown, M.R., Miller, F.J.Jr., Li, W.G., Ellingson, A.N., Mozena, J.D., Chatterjee, P., Engelhardt, J.F., Zwacka, R.M., Oberley, L.W., Fang, X., Spector, A.A., Weintraub, N.L.: Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells; *Circ. Res.* 85, 524-533 (1999)
- 54) Zhang, W., Wang, Y., Chen, Ch., Xing, K., Vivekanandan, S., Lou, M.F.: The positive feedback role of arachidonic acid in the platelet-derived growth factor-induced signaling in lens epithelial cells; *Mol. Vis.* 12, 821-831 (2006)
- 55) Yellon, D.M., Downey, J.M.: Preconditioning the myocardium: From cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol. Rev.* 83, 1113-1151, (2003)
- 56) Tang, J., Kriz, W.K., Shaffer, M., Sehra, J., Jones, S.S.: A novel cytosolic calcium-independent phospholipase A₂ contains eight ankyrin motifs; *J. Biol. Chem.* 272 (13), 8567-8575 (1997)
- 57) Bernardi, G., Vance, D.E., Vance, J.E; *Biochemistry of Lipids, Lipoprotein, Membranes*, 4th Edition (New comprehensive biochemistry Volume 36), Elsevier (2002)
- 58) http://home.pusan.ac.kr/~human/Cyb_lect/Biochem_med/Lipid_intro/lipo_intro_fig/lipo_intro_F37.JPG
- 59) Rhee, S.G., Bae, Y.S.; Regulation of Phosphoinositide-specific Phospholipase C Isozymes; *J. Biol. Chem.* 272 (24), 15045-15048 (1997)
- 60) Asemu, G., Dhalla, N.S., Tappia, P.S.: Inhibition of PLC improves postischemic recovery in isolated rat heart; *Am. J. Physiol. Heart* 287, H2598-H2605
- 61) Van Bilsen, M., Van der Vusse, G.J.: Phospholipase A₂-dependent signalling in the heart; *Cardiovasc. Res.* 30, 518-529 (1995)
- 62) Charkraborti, S.: Phospholipase A₂ isoforms: a perspective; *Cell. Signal.* 15, 637-665 (2003)
- 63) Murakami, M., Kudo, I.; Phospholipase A₂; *Lipid Signaling* 131 (3), 285-292, (2002)
- 64) Tischfield, J.A.: A reassessment of the low molecular weight phospholipase A₂ gene family in mammals; *J. Biol. Chem.* 272 (28), 17247-17250 (1997)

- 65) Leslie, Ch.C.; Properties and Regulation of Cytosolic Phospholipase A₂; *J. Biol. Chem.* 272 (27), 16709-16712 (1997)
- 66) Jenkins, Ch.M., Mancuso, D.J., Yan, W., Sims, H.F., Gibson, B., Gross, R.W.: Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A₂ family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities; ; *J. Biol. Chem.* 279, (47), 48968-48975 (2004)
- 67) Cummings, B.S., McHowaat, J., Schnellmann, R.G.: Role of an endoplasmic reticulum Ca²⁺-independent phospholipase A₂ in cisplatin-induced renal cell apoptosis; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, (3), 921-928 (2004)
- 68) Williams, S.D., Gottlieb, R.A.: Inhibition of mitochondrial calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂) attenuates mitochondrial phospholipid loss and is cardioprotective; *Biochem. J.* 362, 23-32 (2002)
- 69) Zhongmin, M., Wang, X., Nowatzke, W., Ramanadham, S., Turk, J.: Human pancreatic islets express mRNA species encoding two distinct catalytically active isoforms of group VI phospholipase A₂ (iPLA₂) that arise from an exon-skipping mechanism of alternative splicing of the transcript from the iPLA₂ gene on chromosome 22q13.1; *J. Biol. Chem.* 274 (14), 9607-9616 (1999)
- 70) Liu, S.J., McHowat, J.: Stimulation of different phospholipase A₂ isoforms by TNF- α and IL-1 β in adult rat ventricular myocytes; *News Physiol. Sci.* H1462-H1472 (1998)
- 71) Larsson, P.K.A., Kennedy, B.P., Claesson, H.: The human calcium-independent phospholipase A₂ gene; *Eur. J. Biochem.* 262, 575-585 (1999)
- 72) Winstead, M.V., Balsinde, J., Dennis, E.A.: Calcium-independent phospholipase A₂: structure and function; *Biochim. Biophys. Acta* 1488, 28-29 (2000)
- 73) Jenkins, Ch.M., Han, X., Mancuso, D.J., Gross, R.W.: Identification of calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂) β , and not iPLA₂ γ , as the mediator of arginine vasopressin-induced arachidonic acid release in A-10 smooth Musile cells; *J. Biol. Chem.* 277 (36), 32807-32814 (2002)
- 74) Balsinde, J., Dennis, E.A.; Function and Inhibition of Intracellular Calcium-independent Phospholipase A₂; *J. Biol. Chem.* 272 (26), 16069-16072, (1997)
- 75) Akiba, S., Takashi, S.: Cellular function of calcium-independent phospholipase A₂; *Biol. Pharm. Bull.* 27 (8), 1174-1178 (2004)

- 76) Csutora, P., Zarayskiy, P., Peter, K., Monje, F., Smani, T., Zakharov, S.I., Litvinov, D., Bolotina, V.M.: Activation mechanism for CRAC current and store-operated Ca^{2+} entry; *J. Biol. Chem.* 281 (46), 34926-34935 (2006)
- 77) Cummings, B.S., Gelasco, A.K., Kinsey, G.R., McHowat, J., Schnellmann, R.G.: Inactivation of endoplasmic reticulum bound Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 in renal cells during oxidative stress; *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 1441-1451 (2004)
- 78) Gross, G.J., Auchampach, J.A.: Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs; *Circ. Res.* 70, 223-233 (1992)
- 79) Tay, H.K., Alirio, J.M.: Fc γ RI-triggered generation of AA and eicosanoids requires iPLA $_2$ but not cPLA $_2$ in human monocytic cells; *J. Biol. Chem.* 279 (21), 22505-22513 (2004)
- 80) Mancuso, D.J., Jenkins, Ch.M., Sims, H.F., Cohen, J.M., Yang, J., Gross, R.W.: Complex transcriptional and translational of iPLA $_2$ resulting in multiple gene products containing dual competing sites for mitochondrial or peroxisomal localization; *Eur. J. Biochem.* 271, 4709-4724 (2004)
- 81) Balsinde, J., Balboa, M.A.: Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A_2 in activated cells; *Cell Signal.* 17, 1052-1062 (2005)
- 82) Song, H., Bao, S., Ramanadham, S., Turk, J.: Effects of biological oxidants on the catalytic activity and structure of group VIA phospholipase A_2 ; *Biochemistry* 45 (20), 6392-6406 (2006)
- 83) Underwood, K.W., Song, Ch., Kriz, R.W., Chang, X.J., Knopf, J.L., Lin, L.: A novel calcium-independent phospholipase A_2 , cPLA $_2$ - γ , that is prenylated and contains homology to cPLA $_2$; *J. Biol. Chem.* 273 (34), 21926-21932 (1998)
- 84) Yan, W., Jenkins, Ch.M., Han, X., Mancuso, D.J., Sims, H.F., Yang, K., Gross, R.W.: The highly selective production of 2-arachidonoyl lysophosphatidylcholine catalyzed by purified calcium-independent phospholipase $\text{A}_2\gamma$; *J. Biol. Chem.* 280 (29), 26669-26679 (2005)
- 85) Mancuso, D.J., Jenkins, Ch.M., Gross, R.W.: The genomic organization, complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A_2 ; *J. Biol. Chem.* 275 (14), 9937-9945 (2000)

- 86) Pérez, R., Matabosch, X., Llebaria, A., Balboa, M.A., Balsinde, J.: Blockade of arachidonic acid incorporation into phospholipids induces apoptosis in U937 promonocytic cells; *J. Lipid Res.* 47, 484-491 (2006)
- 87) Balsinde, J.: Role of various phospholipase A₂ in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling; *Biochem. J.* 364, 695-702 (2002)
- 88) Gilroy, D.W., Newson, J., Sawmynaden, P., Willoughby, D.A., Croxtall, J.D.: A novel role for phospholipase A₂ isoforms in the checkpoint control of acute inflammation; *FASEB J.* 18, 489-498 (2004)
- 89) Balboa, M.A., Balsinde, J.: Involvement of calcium-independent phospholipase A₂ in hydrogen peroxide-induced accumulation of free fatty acids in human U937 cells; *J. Biol. Chem.* 277 (43), 40384-40389 (2002)
- 90) Balsinde, J., Bianco, I.D., Ackermann, E.J., Condeelis, K., Dennis, E.A.: Inhibition of calcium-independent phospholipase A₂ prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D₁ macrophages; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8527-8531 (1995)
- 91) McHowat, J., Creer, M.H., Hicks, K.H., Jones, J.H., McCrory, R., Kennedy, R.H.: Induction of Ca²⁺-independent PLA₂ and conservation of plasmalogen polyunsaturated fatty acids in diabetic heart; *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279, E25-E32 (2000)
- 92) Fuentes, L., Pérez, R., Nieto, M.L., Balsinde, J., Balboa, M.A.: Bromenol lactone promotes cell death by a mechanism involving phosphatidyl phosphohydrolase-1 rather than calcium-independent phospholipase A₂; *J. Biol. Chem.* 278 (45), 44683-44690 (2003)
- 93) Seleznev, K., Zhao, Ch., Zhang, X.H., Song, K., Ma, Z.A.: Calcium-independent phospholipase A₂ localizes in and protects mitochondria during apoptotic induction by staurosporine; *J. Biol. Chem.* 281 (31), 22275-22288 (2006)
- 94) McHowat, J., Swift, L.M., Arutunyan, A., Sarvazyan, N.: Clinical concentrations of doxorubicin inhibit activity of myocardial membrane-associated, calcium-independent phospholipase A₂; *Cancer Res.* 61, 4024-4029 (2001)
- 95) McHowat, J., Tappia, P.S., Liu, S., McCrory, R., Panagia, V.: Redistribution and abnormal activity of phospholipase A₂ isoenzymes in postinfarct congestive heart failure; *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C573-C580 (2001)

- 96) Cummings, B.S., McHowat, J., Schnellmann, R.G.: Phospholipase A₂s in cell injury and death; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294 (3), 793-799 (2000)
- 97) Cummings, B.S., McHowat, J., Schnellmann, R.G.: Role of endoplasmic reticulum Ca²⁺-independent phospholipase A₂ in oxidant-induced renal cell death; *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 283, F492-F498 (2002)
- 98) McHowat, J., Creer, M.H.: Catalytic features, regulation and function of myocardial phospholipase A₂; *Curr. Med. Chem.* 2 (3), 209-218 (2004)
- 99) Navarro, F., Navas, P., Burgess, J.R., Bello, R.I., De Cabo, R., Arroyo, A., Villalba, J.M.: Vitamin E and selenium deficiency induces expression of the ubiquinone-dependent antioxidant system at the plasma membrane; *FASEB J.* 12, 1665-1673 (1998)
- 100) Kim, S.J., Gershov, D., Ma, X., Brot, N., Elkon, K.B.: iPLA₂ activation during apoptosis promotes the exposure of membrane lysophosphatidylcholine leading to binding by natural immunoglobulin M antibodies and complement activation; *J. Exp. Med.* 196 (5), 655-665 (2002)
- 101) Taketo, M.M., Sonoshita, M.: Phospholipase A₂ and apoptosis; *Biochim. Biophys. Acta* 1585, 72-76 (2002)
- 102) Balsinde, J., Pérez, R., Balboa, M.A.: Calcium-independent phospholipase A₂ and apoptosis; *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1344-1350 (2006)
- 103) Zhao, X., Wang, D., Zhao, Z., Xiao, Y., Sengupta, S., Xiao, Y., Zhang, R., Lauber, K., Wesselborg, S., Feng, L., Rose, T.M., Shen, Y., Zhang, J., Prestwich, G., Xu, Y.: Caspase-3-dependent activation of calcium-independent phospholipase A₂ enhances cell migration in non-apoptotic ovarian cancer cells; *J. Biol. Chem.* 281 (39), 29357-29368 (2006)
- 104) Murakami, M., Masuda, S., Ueda-Semmyo, K., Yoda, E., Kuwata, H., Takanezawa, Y., Aoki, J., Arai, H., Sumimoto, H., Ishikawa, Y., Ishii, T., Nakatani, Y., Kudo, I.: Group VIB Ca²⁺-independent phospholipase A₂γ promotes cellular membrane hydrolysis and prostaglandin production in a manner distinct from other intracellular phospholipase A₂; *J. Biol. Chem.* 280 (14), 14028-14041 (2005)
- 105) Atsumi, G., Murakami, M., Kojima, K., Hadano, A., Tajima, M., Kudo, I.: Distinct role of two intracellular phospholipase A₂s in fatty acid release in the cell death pathway; *J. Biol. Chem.* 275 (24), 18248-18258 (2000)

- 106) Ackermann, E.J., Dennis, E.A.: Mammalian calcium-independent phospholipase A₂; *Biochim. Biophys. Acta* 1259, 125-136 (1995)
- 107) Portilla, D., Dai, G.: Purification of a novel calcium-independent phospholipase A₂ from rabbit kidney; *J. Biol. Chem.* 271 (26), 15451-15457 (1996)
- 108) McHowat, J., Swift, L.M., Crown, K.N., Sarvazyan, N.A.: Changes in phospholipid content and myocardial calcium-independent phospholipase A₂ activity during chronic anthracycline administration; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311 (2), 736-741 (2004)
- 109) Kinsey, G.R., Cummings, B.S., Beckett, C.S., Saavedra, G., Zhang, W., McHowat, J., Schnellmann, R.G.: Identification and distribution of endoplasmic reticulum iPLA₂; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327, 287-293 (2005)
- 110) Martinson, B.D., Albert, C.J., Corbett, J.A., Wysolmerski, R.B., Ford, D.A.: Calcium-independent phospholipase A₂ mediates CREB phosphorylation in double-stranded RNA-stimulated endothelial cells; *J. Lipid Res.* 44, 1686-1691 (2003)
- 111) Hazen, S.L., Ford, D.A., Gross, R.W.: Activation of a membrane-associated phospholipase A₂ during myocardial ischemia which is highly selective for plasmalogen substrate; *J. Biol. Chem.* 266 (9), 5629-5633 (1991)
- 112) Břeh, J.: Vliv N-acetylcysteinu na expresi protein kinasy C v myokardu potkana adaptovaného na chornickou hypoxii, Diplomová práce PřF UK Praha, Katedra biochemie, str.75 (2005)
- 113) Gu, X., Bishop, S.P.: *Circ. Res.* 75, 926-931 (1994)
- 114) Tyler, D.D., Gonze, J.: *Meth. Enzymol.* 10, 75-77 (1976)
- 115) Albert, C.J., Ford, D.A.: Protein kinase C translocation and PKC-dependent protein phosphorylation during myocardial ischemia; *Am. J. Physiol.* 276, (Heart Circ. Physiol. 45) H642-H650 (1999)
- 116) Yoshida, K., Hirata, T., Akita, Y., Miyukami, Y., Yamaguchi, K., Sorimachi, Y., Ishihara, T., Kawashima, S.; *Biochim. Biophys. Acta* 1376, 36-44 (1996)
- 117) Strasser, R.H., Simonis, G., Schön, S.P., Braun, M.U., Ihl-Vahl, R., Weinbrenner, C., Marquetant, R., Kübler, W.: Two distinct mechanisms mediate a differential regulation of protein kinase C isozymes in acute and prolonged myocardial ischemia; *Circ. Res.* 85, 77-87 (1999)
- 118) Peterson, G.L.: A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable; *Anal. Biochem.* 83, 346-356 (1977)

- 119) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent; *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)
- 120) Ogita, Z.I., Markert, C.L.: A miniaturized system for electrophoresis on polyacrylamide gels; *Anal. Biochem.* 99, 233-241 (1979)
- 121) Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354 (1979)
- 122) Amersham: ECL Western blotting detection reagents ECL Western blotting analysis system; Instruction manual, procedures & troubleshooting (1997)
- 123) Bio-Rad: Immun-Blot[®] Assay Kit; Instruction manual (1996)
- 124) <http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.molecularstation.com/images/westernblot.gif&imgrefurl=http://www.molecularstation.com/id/protein/westernblot/&h=356&w=600&sz=15&hl=cs&start=3&um=1&tbnid=sP-CJ9m-5DMOVM:&tbnh=80&tbnw=135&prev=/images%3Fq%3Dwestern%2Bblotting%26um%3D1%26hl%3Dcs%26lr%3D%26sa%3DN>
- 125) McHowat, J., Liu, S., Creer, M.H.: Selective hydrolysis of plasmalogen phospholipids by Ca²⁺-independent PLA₂ in hypoxic ventricular myocytes; *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 274, 1727-1737 (1998)
- 126) Marková, I.: Úloha proteinkinasy C při prevenci ischemického poškození myokardu adaptovaného na chronickou hypoxii. Diplomová práce PŘF UK Praha, Katedra biochemie, str.51
- 127) Lacinová, V.: Vliv akutní ischemie proteinkinasy C v myokardu potkana adaptovaném na chronickou hypoxii, Diplomová práce PŘF UK Praha, Katedra biochemie, str.53 (2002)
- 128) Swift, L., McHowat, J., Sarvazyan, N.: Inhibition of membrane-associated calcium-independent phospholipase A₂ as a potential culprit of atherocycline cardiotoxicity; *Cancer Res.* 63, 59992-5998 (2003)
- 129) Ježková, J.: Vliv chronické hypoxie na profil membránových fosfolipidů ischemickým myokardu, Diplomová práce PŘF UK Praha, Katedra biochemie, str. 42-76 (2000)
- 130) Hlaváčková, M.: Proteinkinasa C v mechanismu protekce myokardu adaptovaného na chronickou hypoxii: vliv diety o různém složení PUFA, Diplomová práce PŘF UK Praha, Katedra biochemie, str. 47 (2004)

- 131) Tretyakov, A.V., Farber, H.W.: Endothelial cell phospholipid distribution and phospholipase activity during acute and chronic hypoxia; *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **265**, C770-C780 (1993)
- 132) Mancuso, D.J., Abendschein, D.R., Jenkins, Ch. M., Han, X., Saffitz, J.E., Schuessler, R.B., Gross, R.W.: Cardiac ischemia activates calcium-independent phospholipase A₂β, precipitating ventricular tachyarrhythmias in transgenic mice; *J. Biol. Chem.* **278** (25), 22231-22236 (2003)
- 133) Kim, D., Duff, R.A.: Regulation of K⁺ channels in cardiac myocytes by free fatty acids; *Circ. Res.* **67**, 1040-1046; 135 (1990)
- 134) Lawrence, K.M., Townsend, P.A., Davidson, S.M., Carroll, C.J., Baton, S., Hubank, M., Knight, R.A., Stepanou, A., Latchman, D.S.: The cardioprotective effect of urocortin during ischaemia/reperfusion involves the prevention of mitochondrial damage; *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **321**, 479-486 (2004)
- 135) Meyer, M.C., Kell, P.J., Creer, M.H., McHowat, J.: Calcium-independent phospholipase A₂ is regulated by a novel protein kinase C in human coronary artery endothelial cells; *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **288** (2), C475-82 (2005)
- 136) Mitchell MB, Meng X, Ao L, Brown JM, Harken AH, Banerjee A Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C; *Circ. Res.* **76**, 73–81 (1995)
- 137) Neckář, J., Marková, I., Novák, F., Nováková, O., Szárszoi, O., Ošťádal, B., Kolář, F.: Increased expression and altered subcellular distribution of PKC-δ in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection; *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **288** (4), H1566-72 (2005)
- 138) Hlaváčková, M., Neckář, J., Ježková, J., Balková, P., Staňková, B., Nováková, O., Kolář, F., Novák, F.: Dietary polyunsaturated fatty acids alter myocardial protein kinase C expression and affect cardioprotection induced by chronic hypoxia; *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **232** (6), 823-32 (2007)
- 139) Yoshikawa, T., Furikawa, Y., Wakamatsu, Y., Takemura, S., Tahala, H., Kondo, M.: Experimental hypoxia and lipid peroxide in rats; *Biochem. Med.* **27**, 207-213 (1982)
- 140) Nakanishi, K., Tajima, F., Nakamura, A., Yagura, S., Ookawara, T., Yamashita, H., Suzuki, K., Taniguchi, N., Ohno, H.: Effect of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats; *J. Physiol. (Lond.)* **489**, 869-876 (1995)

- 141) Williams, S.D., Hsu, F.F., Ford, D.A.: Electrospray ionization mass spectrometry analyse of nuclear membrane phospholipid loss after reperfusion of ischemic myocardium; *J. Lipid. Res.* 41, 1585-1595 (2000)

