

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecké fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Tereza Blahová

**Genová exprese enzymů zapojených v regulaci apoptózy v myokardu
potkana - vliv chronické a akutní hypoxie**

**Gene expression of enzymes involved in the regulation of apoptosis
in rat myocardium - effect of chronic and acute hypoxia**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.
Kozultantka: doc. RNDr. Olga Nováková, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení

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

V Praze, 12. 8. 2014

Podpis

Poděkování

Chtěla bych na tomto místě poděkovat své školitelce RNDr. Jitce Žurmanové, Ph.D. za odborné rady a vstřícný přístup, kterého si velmi vážím. Ráda bych poděkovala také RNDr. Olze Novákové, CSc za čas, který mi věnovala, a cenné rady při psaní této diplomové práce. Děkuji RNDr. Vlastě Korenkové, Ph.D. a Ing. Vendule Novosadové, Ph.D za rady při vyhodnocování čipové analýzy genové exprese a také Mgr. Dítě Kašparové a Mgr. Ivetě Brabcové za pomoc a zaškolení při metodě Real time PCR. Celému kolektivu naší laboratoře děkuji za příjemnou pracovní atmosféru a za to, že jsem je kdykoliv mohla požádat o radu. Velmi děkuji své rodině a příteli za všestrannou podporu a pomoc.

ABSTRAKT

Adaptace na chronickou hypoxii zvyšuje odolnost srdce k ischemicko-reperfúznímu (IR) poškození. Kardioprotektivní účinky adaptace jsou závislé na intenzitě hypoxie, délce jejího trvání a denním režimu adaptace. Bylo prokázáno, že některé protektivní režimy adaptace na hypoxii aktivují proapoptotické signální dráhy. Výzkumy posledních let ukazují, že na regulaci apoptózy v srdci se mohou podílet i bioaktivní molekuly sfingolipidů. Cílem této práce bylo stanovit expresi mRNA transkriptu vybraných genů apoptotických drah a genů metabolismu sfingolipidů. Použili jsme dva hypoxické modely, kontinuální normobarickou hypoxii (CNH, 10% O₂) v různých časových intervalech (4h, 48h, 120h, 21 dní), kde jsme analyzovali pravou a levou komoru (RV, LV) a intermitentní hypobarickou hypoxii (IHH, 7000 m, 8h/denně), kde byla analyzovaná pouze LV. Zjistili jsme, že CNH zvyšuje expresi proapoptotických genů převážně v RV a IHH v LV. Dále, v protektivních hypoxických režimech byla aktivace exprese proapoptotických genů doprovázena zvýšením exprese enzymů produkujících protektivní druhy sfingolipidů. Objasnění přesné úlohy apoptózy a signálních molekul sfingolipidů v endogenní protekci myokardu však vyžaduje další výzkum.

Klíčová slova: apoptóza, sfingolipidy, hypoxie, myokard, Real time PCR, BioMark HD System (Fluidigm), Light Cyclor 480 (Roche)

ABSTRACT

Adaptation to chronic hypoxia provides myocardial protection against ischemia – reperfusion injury (IR). Cardioprotective effect of adaptation depends on the degree and duration of hypoxic exposure and daily regime of adaptation. Certain protective regimes of adaptations to hypoxia have been reported to activate proapoptotic signaling pathways and bioactive sphingolipids were recently shown to play important role in the regulation of apoptosis in the heart. We aimed to determine the mRNA level of selected genes related to apoptotic pathways and to sphingolipid metabolism in two models of hypoxic adaptation, continuous normobaric hypoxia (CNH 10% O₂) with different exposures (4h, 48h, 120h, 21days) and intermittent hypobaric hypoxia (IHH 7000 m, 8h/day). Both ventricles, LV and RV, were analysed after adaptation to CNH and only LV was analysed after IHH adaptation. Our results show that both types of adaptation increased mRNA of proapoptotic genes, CNH mainly in RV and IHH in LV. Furthermore, increased expressions of proapoptotic genes were accompanied by the increase of expression of enzymes producing predominantly protective kinds of sphingolipids. The exact role of apoptosis and sphingolipid signaling molecules in endogenous myocardial protection requires further research.

Key words: Apoptosis, Sphingolipids, Hypoxia, Myocardium, Real time PCR, BioMark HD System (Fluidigm), Light Cyclor 480 (Roche)

OBSAH

| | |
|--|----|
| 1. SEZNAM ZKRATEK | 1 |
| 2. ÚVOD | 4 |
| 3. LITERÁLNÍ PŘEHLED | 5 |
| 3.1. Hypoxie | 5 |
| 3.1.1. Hypoxické modely..... | 6 |
| 3.1.2. Pravá a levá komora myokardu..... | 7 |
| 3.1.3 Mechanismy endogenní kardioprotekce | 8 |
| 3.2. Typy buněčné smrti | 10 |
| 3.3. Apoptóza | 11 |
| 3.3.1. Vnější dráha | 11 |
| 3.3.2. Vnitřní dráha | 13 |
| 3.3.3. Apoptóza v hypoxii | 16 |
| 3.4. Sfingolipidy v apoptóze | 17 |
| 3.4.1. Ceramid..... | 17 |
| 3.4.2. Sfingosin | 18 |
| 3.4.3. Sfingosin-1-fosfát | 19 |
| 3.4.4. Ceramid-1-fosfát..... | 19 |
| 3.5. Dráhy produkce a degradace biokativních molekul sfingolipidů | 21 |
| 3.5.1. Syntéza..... | 23 |
| 3.5.2. Degradace..... | 25 |
| 4. CÍLE PRÁCE: | 29 |
| 5. MATERIÁL A METODY | 30 |
| 5.1. Adaptace potkanů | 30 |
| 5.2. Odběr tkáně | 30 |
| 5.3. Analýzy mRNA transkriptů | 31 |
| 5.3.1. Homogenizace srdeční tkáně a izolace RNA pro analýzy mRNA transkriptů | 31 |
| 5.3.2. Izolace RNA..... | 31 |
| 5.3.3. Měření koncentrace RNA | 32 |
| 5.3.4. Ověření kvality RNA | 32 |
| 5.3.5. Reverzní transkripce | 33 |
| 5.3.6. Real time PCR (Light Cycler 480, Roche Applied Science)..... | 33 |
| 5.3.7. Real time PCR čipová analýza (BioMark HD System, Fluidigm) | 34 |
| 5.3.8. Vyjádření relativní exprese | 35 |
| 5.3.9. Statistické vyhodnocení | 35 |

| | |
|--|----|
| 5.4. Proteinové analýzy | 36 |
| 5.4.1. Homogenizace srdečního svalu pro proteinové analýzy | 36 |
| 5.4.2. Stanovení proteinů | 36 |
| 5.4.3. Detekce proteinů metodou Western blotting | 37 |
| 5.4.4. Příprava vzorku pro elektroforézu | 37 |
| 5.4.5. Elektroforéza | 37 |
| 5.4.6. Přenos proteinů na membránu | 37 |
| 5.4.7. Blokování nespecifických interakcí | 38 |
| 5.4.8. Detekce | 38 |
| 5.4.9. Statistické vyhodnocení | 38 |
| 6. VÝSLEDKY | 39 |
| 6.1. Hmotnostní parametry | 39 |
| 6.2. Ověření přesnosti čipové analýzy BioMark HD System, Fluidigm pomocí Real time PCR v systému LightCycler 480, Roche Applied Science | 40 |
| 6.2.1. Kontinuální normobarická hypoxie | 40 |
| 6.2.2. Intermitentní hypobarická hypoxie | 42 |
| 6.3. Expres vybraných genů apoptotických drah a metabolismu sfingolipidů v průběhu adaptace na kontinuální normobarickou hypoxii | 44 |
| 6.3.1. Geny apoptotických drah | 44 |
| 6.3.2. Geny metabolismu sfingolipidů | 49 |
| 6.3.3. Souhrn výsledků | 55 |
| 6.4. Expres vybraných genů apoptotických drah a metabolismu sfingolipidů po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii | 56 |
| 6.4.1. Geny apoptotických drah | 56 |
| 6.4.2. Geny metabolismu sfingolipidů | 59 |
| 7. DISKUZE | 61 |
| 7.1. Ověření přesnosti čipové analýzy | 61 |
| 7.2. Vliv hypoxie na genovou expresi vybraných proteinů apoptotických drah a metabolismu sfingolipidů | 63 |
| 7.3. Souhrn | 69 |
| 8. ZÁVĚR | 69 |
| 9. LITERATURA | 70 |

1. SEZNAM ZKRATEK

| | |
|--------|--|
| ACER | alkalická ceramidáza |
| AIF | apoptosis inducing factor |
| Apaf-1 | apoptotic protease activating factor-1 |
| ARD | apoptotic repressor with CARD (caspase recruitment domain) |
| BAD | BCL2-associated agonist of cell death |
| BAK | BCL2-antagonist/killer |
| BAX | BCL2-associated X protein |
| BCL2 | B-cell CLL/lymphoma 2 |
| BCL-xL | BCL-x protein long isoform |
| BID | BH3 interacting domain death agonist |
| BID | BH3 interacting domain death agonist |
| BNIP3 | BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3 |
| BW | hmotnost těla (body weight) |
| C1P | ceramid-1-fosfát (ceramide-1-phosphate) |
| CASP | kaspáza |
| Cer | ceramid |
| CERK | ceramidkináza |
| CerS | ceramidsyntáza |
| CERT | ceramide transfer protein |
| CNH | kontinuální normobarická hypoxie |
| Cp | crossing point |
| DAG | diacylglycerol |
| DES1 | dihydroceramiddesaturáza |
| DIABLO | (Direct IAP-Binding protein with Low PI) |
| DISC | death inducing signaling complex |
| DTT | dithiothreitol |
| E | efektivita |
| EGLN3 | Egl nine homolog 3 |
| ER | endoplazmatické retikulum |
| ERK | extracellular regulated kinase |
| FADD | Fas-associated via death domain |
| FasL | Fas ligand |
| FLIP | fllice inhibitory protein |

| | |
|--------------------|--|
| FVT-1 | follicular lymphoma variant translocation-1 |
| HIF | hypoxií indukovaný faktor |
| HM | homogenizační médium |
| HPRT | hypoxantin-guaninfosforibosyltransferáza |
| HtrA2 | high temperature requirement protein A2 |
| ICAD | inhibitor of caspase-activated DNase |
| IHH | intermitentní hypobarická hypoxie |
| JNK | c-Jun N terminal kinase |
| LV | levá komora (left ventricle) |
| m.n.m. | metry nad mořem |
| MA-nSMase | mitochondrial-associated nSMase |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase |
| MCRMs | mitochondrial ceramide-rich macrodomains |
| MDM2 | mouse double minute 2 |
| MnSOD | manganová superoxiddismutáza |
| mPTP | mitochondrial permeability transition pore |
| mTOR | <i>mammalian target</i> of rapamycin |
| NF- κ B | nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells |
| NF- κ B | nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells |
| PCR | polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction) |
| PDI | protein disulfide-isomerase |
| PI3K | fosfatidylinositol-3-kináza (phosphatidylinositol-3-kinase) |
| PKC | protein kináza C |
| PKG | protein kináza G |
| PP1 | protein phosphatase 1 |
| PP2A | protein phosphatase 2A |
| Puma | p53 upregulated modulator of apoptosis |
| RIN | RNA integrity number |
| ROS | reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species) |
| RV | pravá komora (right ventricle) |
| S1P | sfinhosin-1-fosfát (sphingosine-1-phosphate) |
| S1P ₁₋₅ | S1P receptory 1-5 |
| SDK | sphingosine-dependent protein kinase |
| SDS | dodecylsírán sodný |

| | |
|----------|---|
| SDS-PAGE | elektroforézou v polyakrylovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) |
| SGMS | sfingomyelinsyntáza |
| Smac | (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases) |
| SMase | sfingomyelináza (alk - alkalická, n - neutální, a - kyselá) |
| SMPD2 | sfingomyelinofosfodiesteráza (sphingomyelin phosphodiesterase) |
| SMSr | sfingomyelin synthase-related protein |
| Sph | sfingosin (sphingosine) |
| SPHK | sfingosinkináza (sphingosine kinase) |
| SPL | sfingosin-1-fosfát-lyáza |
| SPT | serinpalmitoyltransferáza |
| SPTLC1 | serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 1 |
| ssSPT | small subunit of SPT |
| TAE | solný roztok (tris base, acetic acid, ethylenediaminetetraacetic acid) |
| TBS | solný roztok (tris buffered saline) |
| TNF | tumor necrosis factor |
| TNFR | tumor necrosis factor receptor |
| TRADD | TNFR associated death domain |
| TRAIL-R | TNF-related apoptosis-inducing ligand |
| TTBS | solný roztok (tween tris buffered saline) |
| XIAP | X-linked inhibitor of apoptosis |

2. ÚVOD

Nejčastější příčinou úmrtí jsou nemoci oběhové soustavy, mezi nimi má největší zastoupení ischemická choroba srdeční. Během tohoto onemocnění je omezeno krevní zásobení srdce, které je tedy nedostatečně vyživováno a zásobeno kyslíkem. Ischemie pak může vést až k odumření buněk myokardu – k infarktu. Aby velikost ložiska infarktu dále nevzrůstala, je důležité co nejdříve obnovit krevní zásobení v postižené oblasti srdce. Reperfúze mimo jiné může vést ke smrti dalších buněk, které byly ischemií pouze poškozené. Proto se stále studují mechanismy, které mohou zmenšit velikost infarktu a zmírnit ischemicko referfúzní poškození srdce. Jedním ze způsobů, jak zvýšit odolnost srdce při ischemii je předchozí adaptace na hypoxii. Poprvé byly pozorovány kardioprotektivní účinky chronické hypoxie u populací žijících ve vysokých nadmořských výškách. Následně bylo prokázáno, že k ochraně srdce přispívá i pravidelné působení hypoxie jen několik hodin denně a že podobné účinky může navodit také normobarická hypoxie, při které je část kyslíku ve vzduchu nahrazena dusíkem. Adaptace na oba typy hypoxie (kontinuální normobarická i intermitentní hypobarická) snižují velikost infarktu, ale se liší svým účinkem na komorové arytmie. Rozsah infarktu je snížen také tím, že méně buněk podléhá apoptotické buněčné smrti. Přesto je během hypoxie apoptóza aktivovaná. V souvislosti s apoptózou jsou studovány také bioaktivní molekuly sfingolipidů. Ty mohou stimulovat i potlačovat aktivaci apoptotických drah. Ukazuje se, že hrají významnou roli také v kardioprotekci. Cílem mojí práce proto bylo stanovit změny genové exprese vybraných genů apoptotických drah a metabolismu sfingolipidů po působení kontinuální normobarické hypoxie a intermitentní hypobarické hypoxie.

3. LITERÁLNÍ PŘEHLED

3.1. Hypoxie

Hypoxie je stav, při kterém dochází k nedostatku kyslíku v tkáních vzhledem k jeho aktuální potřebě. Podle příčiny jejího vzniku rozeznáváme několik typů hypoxie. V případě, kdy dojde k omezení nebo přerušení krevního zásobení mluvíme o ischemické hypoxii (ischemii), kde se k nedostatku kyslíku ještě přidává nedostatečné zásobení živinami a nedostatečné odplavování metabolitů (shrnutí v Ošťádal and Kolář , 1999, Hearse, 1994). K hypoxii ale dochází i při dostatečném krevním zásobení v případě, že je snižená kapacita krve pro přenos kyslíku (anemická hypoxie) nebo v případě, kdy je snižená schopnost buněk kyslík zužítkovat, i když je k nim dodáván v dostatečném množství (histotoxická hypoxie). Hypoxická hypoxie nastává při poklesu parciálního tlaku kyslíku v arteriální krvi. Příčinami mohou být na jedné straně patologické stavy, jako některá plicní onemocnění, vrozené srdeční vady nebo spánková apnoe, ale i fyziologické podmínky, se kterými se setkáváme ve vysokých nadmořských výškách na straně druhé (shrnutí v Ostadal et al., 1999). Tohoto druhu hypoxie se bude moje práce týkat a termínem hypoxie bude nadále označována právě hypoxická hypoxie. Již více než 50 let je známo, že adaptace organismu na chronickou hypoxickou hypoxii působí kardioprotektivně. V roce 1960 byla publikována studie ukazující, že u osob žijících ve vysokých nadmořských výškách je snížený výskyt akutního infarktu myokardu (Hurtado, 1960). Tyto závěry byly mnohokrát potvrzeny v laboratorních podmínkách simulujících snížené množství kyslíku v hypobarické komoře. Adaptace organismu na chronickou hypoxii snižuje riziko vzniku akutního infarktu myokardu, zmenšuje oblast postiženou infarktem, omezuje vznik a závažnost arytmií po infarktu (Vovc, 1998) a přispívá k návratu kontraktility myokardu (McGrath et al., 1973; Baker et al., 1995).

3.1.1. Hypoxické modely

Studium vlivů hypoxie *in vivo* probíhá na různých modelových zvířatech i za různých hypoxických podmínek. Účinky hypoxie se přitom liší podle druhu, pohlaví a stáří zvířete (shrnuto v Ošťádal and Kolář, 1999; Kolář and Ostádal, 2004). Jsou ale také závislé na stupni hypoxie i doby jejího působení i na tom, zda hypoxie působí kontinuálně nebo je přerušována návratem do normoxických podmínek. Hypoxie může být kombinovaná se sníženým tlakem ve vysoké nadmořské výšce, což lze simulovat v hypobarické komoře, nebo může být vliv hypoxie studován samostatně v normobarických podmínkách snížením pouze parciálního tlaku kyslíku, obohacováním dusíkem.

V této práci byli dospělí samci potkana vystaveni dvěma typům hypoxie:

- 1) kontinuální normobarická hypoxie (CNH) (PO_2 10%), po 4h, 48h, 120h a 21 dní
- 2) intermitentní hypobarická hypoxie (IHH), ve 25 expozicích podmínkám 7000 m.n.m, 8h denně

Oba typy hypoxie mají kardioprotektivní efekt, působí-li hypoxie dostatečně dlouho a jsou-li dostatečně intenzivní. Pokud byli potkani adaptováni na normobarickou hypoxii (CNH), tak 5 denní adaptace ještě neovlivnila velikost infarktu vyvolaného okluzí koronární arterie, ovšem 15 denní adaptace už vedla ke zmenšení velikosti infarktu a tento protektivní efekt se ještě prohloubil po 30 denní adaptaci. Zároveň byly po 5 denní adaptaci omezeny ischemické komorové arytmie, po delších časových intervalech však antiarytmický efekt vymizel (Neckár et al., 2013; Neckár et al., 2003). Podobný trend byl pozorován po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii (IHH). Zatímco adaptace na IHH odpovídající nadmořské výšce 5000 m.n.m intermitentně pouze 6 h denně v 30 expozicích neměla žádný vliv na velikost infarktu (Kolar et al., 2008), po 8h adaptaci na tyto podmínky (8h denně, 24-32 expozic, 5000 m.n.m.) už bylo pozorováno zmenšení infarktu (Neckár et al. 2002a), které bylo ještě výraznější při 7000 m.n.m (8h denně, 24-32 expozic nebo 35 expozic, 7000 m.n.m) (Neckár et al., 2002b, Neckár et al., 2004). Antiarytmický účinek IHH byl zaznamenán už při 4000 m.n.m při 40 expozicích trvajících 5h (Vovc, 1998), ale na rozdíl od CNH se ještě zvyšoval při intenzivnější hypoxii (8 hodin denně, v 25-30 expozic, 7000 m.n.m) (Asemu et al., 2000).

Současně jsou vedle adaptace na chronickou hypoxii studovány kardioprotektivní účinky i jiných modelů, jedním z nich je preconditioning. Bylo zjištěno, že krátké několikaminutové ischemické epizody střídané reperfúzí také zmenšují rozsah experimentálně

vyvolaného infarktu (Murry et al. 1986), následně snižují výskyt arytmií a zlepšují kontraktilitu (Kloner et al., 1998). Protektivní účinek preconditioningu je však pouze krátkodobý (hodiny až dny) zvláště ve srovnání s adaptací na chronickou hypoxii, jejíž účinek přetrvává týdny až měsíce (Neckár et al., 2004). Pro úplnost je třeba dodat, že toto střídání krátkých úseků ischemie a reperfúze působí kardioprotektivně, i když je aplikováno až po dlouhodobé okluzi koronární arterie a vzniku infarktu. V tomto případě je označováno jako postconditioning (Zhao et al., 2003).

3.1.2. Pravá a levá komora myokardu

V této práci byl sledován vliv hypoxie jak na levou (LV - left ventricle) tak na pravou komoru (RV - right ventricle), které se morfologicky i funkčně liší. Rozdíly mezi komorami se promítají i do odlišné reakce na ischemii a hypoxii. Ve většině případů zasáhne infarkt levou komoru srdeční, zatímco infarkt pouze pravé komory se vyskytne přibližně ve 3 % všech případů (Andersen et al., 1987). Menší náchylnost RV k infarktu je dána tím, že RV má méně svalové hmoty, žene krev proti menšímu odporu v plicním oběhu, a tudíž vykonává méně práce. Má tedy menší nároky na krevní zásobení, které přivádí kyslík a živiny. Navíc zde není krevní zásobení během srdečního cyklu omezeno, jak se děje v LV. Během systoly totiž tlak v tkáni LV převyšuje hodnoty tlaku krve v koronárních artériích, cévy jsou stlačeny a krevní zásobení LV je proto omezeno především na diastolu. Z těchto důvodů je LV náchylnější k ischemickému poškození a rozvoji infarktu (shrnuto v Kinch and Ryan, 1994; Goldstein, 1998). Proto je při hledání mechanismu kardioprotekce pozornost soustředěna především na LV. Nicméně při studiu účinků systémové hypoxie, je důležité zaměřit se i na RV. Adaptace na hypoxii totiž vyvolává výraznější změny právě u ní v důsledku rozvoje plicní hypertenze

Plicní hypertenze je následek vazokonstrikce v plicním řečišti, která nastupuje poměrně rychle a v případě, že je dlouhodobá, dochází i k zesílení vrstvy hladké svaloviny v plicních artériích, což zvyšuje odpor krevního řečiště (Heath, 1977). RV se pak na zvýšené nároky adaptuje a hypertrofuje, a to jak za CNH (Morel et al., 2006; Neckár et al., 2013) tak za IHH (Widimský et al., 1973; Asemu et al., 2000). Hranice, kdy se u lidí rozvíjí plicní hypertenze a dochází k hypertrofii RV je 3000 m.n.m (Hurtado, 1960). RV je také náchylnější k tvorbě nekrotických ložisek, které vznikají na začátku adaptace na IHH (7000 m.n.m, 4 hodiny denně) (Ostádal et al., 1981). Naproti tomu hypertrofie LV se rozvíjí až v náročnějších hypoxických podmínkách při menším parciálním tlaku kyslíku nebo při delší expozici

hypoxii. Zatímco při expozicích 4h denně 5000 m.n.n byla pozorována pouze hypertrofie RV, expozice 8h denně 7000 m.n.m vyvolaly i hypertrofii LV (Asemu et al., 2000).

3.1.3 Mechanismy endogenní kardioprotekce

Adaptace na hypoxii je komplexní děj, při němž se uplatňuje řada mechanismů. Hypoxickým podmínkám se přizpůsobuje energetický metabolismus buňky (shrnuto v Essop, 2007) i kontraktilní aparát myocytů (exprese izoforem těžkého řetězce myosinu), což pravděpodobně umožňuje efektivnější využití ATP při poklesu energie (Pissarek et al., 1997; Letout et al., 2005). V reakci na zvýšenou tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species) se zvyšuje kapacita antioxidačního systému (Viganò et al. 2011; Balková et al., 2011). Také se zintenzivňuje degradace poškozených proteinů (Viganò et al., 2011).

Protektivní dráhy aktivované za hypoxie zvyšují přežívání buněk při následné ischemii a reperfúzi. ROS, které za hypoxie a v reperfúzi vznikají ve zvýšené míře, mohou poškodit buněčné struktury. V nízkých koncentracích fungují ale zároveň jako důležité kardioprotektivní signální molekuly. V hypoxii ROS aktivují PKC δ (proteinkinázu C δ) (Kolář et al., 2007), zvyšují expresi antioxidačního enzymu manganové superoxiddismutázy (MnSOD) (Balková et al., 2011) a jsou nezbytnou součástí adaptačních mechanismů, které snižují velikost infarktu při ischemii a reperfúzi. Pokud bylo množství ROS během adaptace na IHH snižováno podáváním antioxidantu, kardioprotektivní účinek hypoxie zcela vymizel (Kolář et al., 2007; Balková et al., 2011). Ke kardioprotektivním účinkům hypoxie přispívá také aktivace K_{ATP} kanálu, která snižuje velikost infarktu a zlepšuje postischemickou kontraktilitu srdce (Neckář et al. 2002a). K_{ATP} kanály by mohly být aktivované přes PKC δ právě působením ROS (Kolář et al., 2007). Zdá se, že aktivace K_{ATP} kanálů brání hromadění Ca^{2+} iontů v buňce při ischemii a reperfúzi (Zhu et al. 2003). Hypoxická adaptace navíc zvyšuje odolnost mitochondrií proti poškození nadměrným množstvím Ca^{2+} . Právě mechanismy, které brání porušení mitochondrií jsou zřejmě klíčové (Javadov et al., 2003). Během ischemie a reperfúze je pro přežití buněk důležité, aby zůstaly neporušené membrány mitochondrií. Pokud se vytvoří pór procházející skrz obě mitochondriální membrány mPTP (mitochondrial permeability transition pore), mizí elektrochemický gradient nutný pro tvorbu ATP. Navíc do mitochondrie vstupují tekutiny a ta bobtná. Při poškození hraničního množství mitochondrií buňka rychle umírá (shrnuto v Yang et al., 2010).

Protektivní mechanismus, který zabraňuje vytvoření mPTP je dobře popsán v případě preconditioningu a postconditioningu: Nejprve jsou aktivovány membránové receptory spřažené s G-proteiny. Z nich je signál přenášen řadou kináz jako PKC (protein kináza C), PKG (protein kináza G), fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K), Akt (také zvaná protein kináza B) a ERK (extracellular regulated kinase) až na mitochondrie. Součástí tohoto mechanismu protekce je právě i aktivace mitochondriálního K_{ATP} kanálu, která vede alkalizaci mitochondriální matrix a další tvorbě signálních ROS (shrnutí v Yang et al., 2010).

Signálem pro buněčnou smrt je ale i vytvoření póru pouze ve vnější mitochondriální membráně a únik cytochromu c z mezimembránového prostoru, čímž dochází k aktivaci mitochondriální apoptotické dráhy. Apoptóza se podílí na buněčné smrti myocytů během ischemie i reperfúze (Kajstura et al., 1996; Fliss and Gattinger, 1996). Bylo publikováno, že adaptace na hypoxii může snížit i apoptotickou buněčnou smrt při následné ischemii (Dong et al., 2003). Na druhou stranu ale bylo zjištěno, že myocyty během hypoxie podléhají apoptóze (Jung et al., 2001) a antiapoptotické proteiny převažují jen v počátku adaptace (Lee et al., 2006). Z výše uvedeného je zřejmé, že protektivní vliv adaptace na hypoxii závisí na délce jejího trvání a na denním režimu působení hypoxie. Je velmi zajímavé, že v modelech, které jsou protektivní, pravděpodobně dochází k apoptotickým procesům. Z tohoto důvodu jsme se při sledování změn, ke kterým dochází během adaptace na kontinuální normobarickou hypoxii CNH a po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii IHH, soustředili na apoptózu za těchto podmínek.

3.2. Typy buněčné smrti

Apoptóza patří spolu s nekrózou a autofágií mezi tři nejvíce popsané typy buněčné smrti v srdci. Pro nekrotickou buněčnou smrt je charakteristické nabývání na objemu organel i cytoplazmy, které vede k narušení buněčné membrány a uvolnění obsahu buňky do extracelulárního prostoru. Nekróza byla dlouho považovaná za neřízený proces odehrávající se bez nároků na energii. Ukázalo se ale, že toto platí pouze při vážném poškození buňky, a že nekróza může být vyvolána aktivací přísně regulovaných signálních drah. V tomto případě bývá pro nekrózu používán zvláštní termín nekroptóza (Degterev et al., 2005). Nekrotické buňky vyvolávají prozánětlivou odpověď pasivním uvolňováním prozánětlivých látek nebo aktivní sekrecí cytokinů. Jsou odstraňovány pomalu a až po narušení integrity buněčné membrány. Autofágie je regulovaný proces, který umožňuje degradovat a recyklovat buněčné složky, a tak se podílí na udržení stálého vnitřního prostředí buňky. Nicméně v umírajících buňkách byly pozorovány autofagické vakuoly a autofágie může vést až k jejich zániku (Yu et al., 2006). Bylo prokázáno, že autofágie buněčnou smrt spíše doprovází, než jí přímo způsobuje (Qu et al., 2007; shrnuto v Scarlatti et al., 2009; Duprez et al. 2009). Dalším typem buněčné smrti je apoptóza (Kerr et al., 1972).

3.3. Apoptóza

Při apoptóze dochází k degradaci cytoskeletu a smrštění buňky, chromatin kondenzuje, je štěpen a formuje pro apoptózu charakteristické pŕlměsíité tvary. Dále se ztrácí se asymetrie rozložení fosfolipidů mezi vnější a vnitřní vrstvou plazmatické membrány a do vnější vrstvy se dostává fosfatidylserin, ten je pak zřejmě signálem pro ostatní buňky, aby fagocytovaly apoptotická tělíška. Během apoptózy se totiž neztrácí integrita buněčné membrány a nedochází k uvolnění obsahu buňky do mezibuněčného prostoru, ale obsah buňky je rozdělen do váčků obalených membránou – apoptotických tělíšek, které jsou pohlcené sousedními buňkami a makrofágy (shrnuto v Buja and Vela, 2008) Celý proces apoptózy musí být dobře regulován a vyžaduje kontrolu exprese specifických genů (shrnuto v Suleiman et al., 2007). Podstatné články apoptotických signální drah tvoří třída proteolytických enzymů – kaspázy. Kaspázy mají v aktivním místě cystein a štěpí protein za aspartátovým zbytkem, odtud jejich název (Alnemri et al., 1996). Jsou syntetizovány jako neaktivní prokaspázy s katalytickou doménou na C konci. Mnohé morfologické změny typické pro apoptózu vznikají činností efektorových kaspáz (kaspáza 3, 6 a 7), které jsou z prokaspáz do své aktivní formy štěpeny signálními kaspázami (kaspáza 2, 8, 9, 10 a 12). K aktivaci signálních kaspáz dochází ve dvou hlavních apoptotických drahách: vnější receptorové a vnitřní mitochondriální (shrnuto v Crow et al., 2004).

3.3.1. Vnější dráha

Vnější apoptotická dráha je spuštěna aktivací receptorů náležících do TNFR rodiny [jako jsou Fas a TNFR (tumor necrosis factor receptor) a TRAIL-R (TNF-related apoptosis-inducing ligand)]. Po vazbě ligandu, kterým může být membránovým proteinem jiné buňky nebo rozpustný extracelulární protein, vytváří tyto receptory homotrimery a dochází u nich ke konformační změně. Po změně konformace se, přes strukturní doménu zvanou doména smrti, na cytosolickou část receptorů vážou adaptorové FADD (Fas-associated via death domain) nebo TRADD (TNFR associated death domain). Přes druhou doménu smrti je k adaptorovým proteinům vázána prokaspáza 8, možná i prokaspáza 10, a tak vzniká multiproteinový komplexu DISC (death inducing signaling complex). DISC může obsahovat i další kofaktory a regulační proteiny. Prokaspázy 8 se v komplexu DISC ocitají v těsném kontaktu, který umožní jejich dimerizaci a autoaktivaci. Aktivní kaspázy 8 pak štěpí, a tím aktivují efektorové kaspázy a proapoptotický protein BID (BH3 interacting domain death agonist). Aktivace kaspázy 3 a BID propojuje vnější apoptotickou dráhu s vnitřní. Signál přes receptory TNFR

rodiny nemusí vždy vést k apoptóze, může navodit proliferaci nebo diferenciaci. Vazbou TNF (tumor necrosis factor) na receptor dojde nejprve k vytvoření komplexu I vázanému na membránu, kterým jsou aktivovány NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) a MAPK (mitogen-activated protein kinase). Po endocytóze TNFR dojde k vytvoření komplexu II, který váže a umožní aktivaci kaspázy 8 (shrnutí v Duprez et al., 2009).

Při zkoumání role vnější apoptotické dráhy v srdci bylo zjištěno, že zvýšení exprese TNF- α a FasL (Fas ligand) nevedlo k výraznému nárůstu apoptotických buněk (Nelson et al., 2000; Li et al., 2000), Proto se předpokládalo, že vnější apoptotická dráha nemá na indukci apoptózy v srdci velký podíl. Signál vedoucí vnější apoptotickou dráhou mohou blokovat FLIP (flice inhibitory protein) a ARD [apoptotic repressor with CARD (caspase recruitment domain)]. FLIP má velkou sekvenční homologii s kaspázou 8. Při aktivaci Fas receptoru FLIP kompetuje s kaspázou 8 o vazbu na adaptorový protein FADD a znemožňuje tak aktivaci kaspázy 8. ARD váže a specificky blokuje kaspázy 2 a 8 (také může bránit uvolnění cytochromu c z mitochondrií, a tím omezuje i mitochondriální apoptotickou cestu). V srdci je exprese obou těchto proteinů běžně vysoká (Irmeler et al., 1997; Koseki et al., 1998). Určité stresové podmínky, ale mohou expresi obou proteinů snižovat: Množství FLIP se snižuje během ischemie a reperfúze (Rasper et al., 1998), množství ARC zas působením ROS, které při ischemii a reperfúzi vznikají (Neuss et al., 2001). Úlohu vnější apoptotické dráhy při indukci apoptózy v srdci připouští pozdější studie (Lee et al., 2003), podle které myši bez funkčního membránového receptoru Fas, po 30 min ischemie následované 24h reperfúzí, měly o více než polovinu méně apoptotických myocytů než kontrolní myši.

3.3.2. Vnitřní dráha

V centru vnitřní apoptotické dráhy stojí mitochondrie. Vlivem apoptotických signálů dojde k vytvoření pórů ve vnější mitochondriální membráně. Cytochrom c se nachází u vnitřní vrstvy mitochondriální membrány asociovaný s membránivým lipidem kardiolipinem (Ott et al., 2002). Pokud je tvorba póru ve vnější membráně doprovázena uvolněním cytochromu c od vnitřní membrány, cytochrom c spolu s dalšími apoptogenní faktory uniká do cytoplazmy. V cytoplazmě váže cytochrom c adaptorový protein Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1). Apaf-1 dále interaguje s dATP a/nebo ATP. To stimuluje konformační změny, které vedou k oligomerizaci Apaf-1 a navázání prokaspázy 9. Vytvoření apoptozomu, jak se celý tento komplex nazývá, umožní dostatečné přiblížení prokaspáz 9, jejich dimerizaci a aktivaci. Aktivní kaspázy 9 pak štěpí efektorovou prokaspázu 3, ta dále ve zpětné vazbě aktivuje další prokaspázy 9. Kaspázy potom štěpí cytoskeletární proteiny nebo jsou součástí komplexních dějů jako např. štěpením ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) uvolní nukleázu, kterou ICAD blokuje, umožní její přesun do jádra a štěpení DNA. Z mitochondrií jsou také uvolněny Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low PI) a HtrA2 (high temperature requirement protein A2), které vážou a štěpí XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis). Aktivní XIAP váže a inhibuje kaspázy 9, 3 a 7 a brání aktivaci prokaspázy 9. Smac/DIABLO a HtrA2 tedy inhibují inhibitor kaspáz. Dalšími apoptogenními faktory jsou AIF (apoptosis inducing factor) a EndoG, které se po uvolnění z mitochondrií přesouvají do jádra, kde spolupracují a štěpí DNA (shrnutí v Crow et al., 2004).

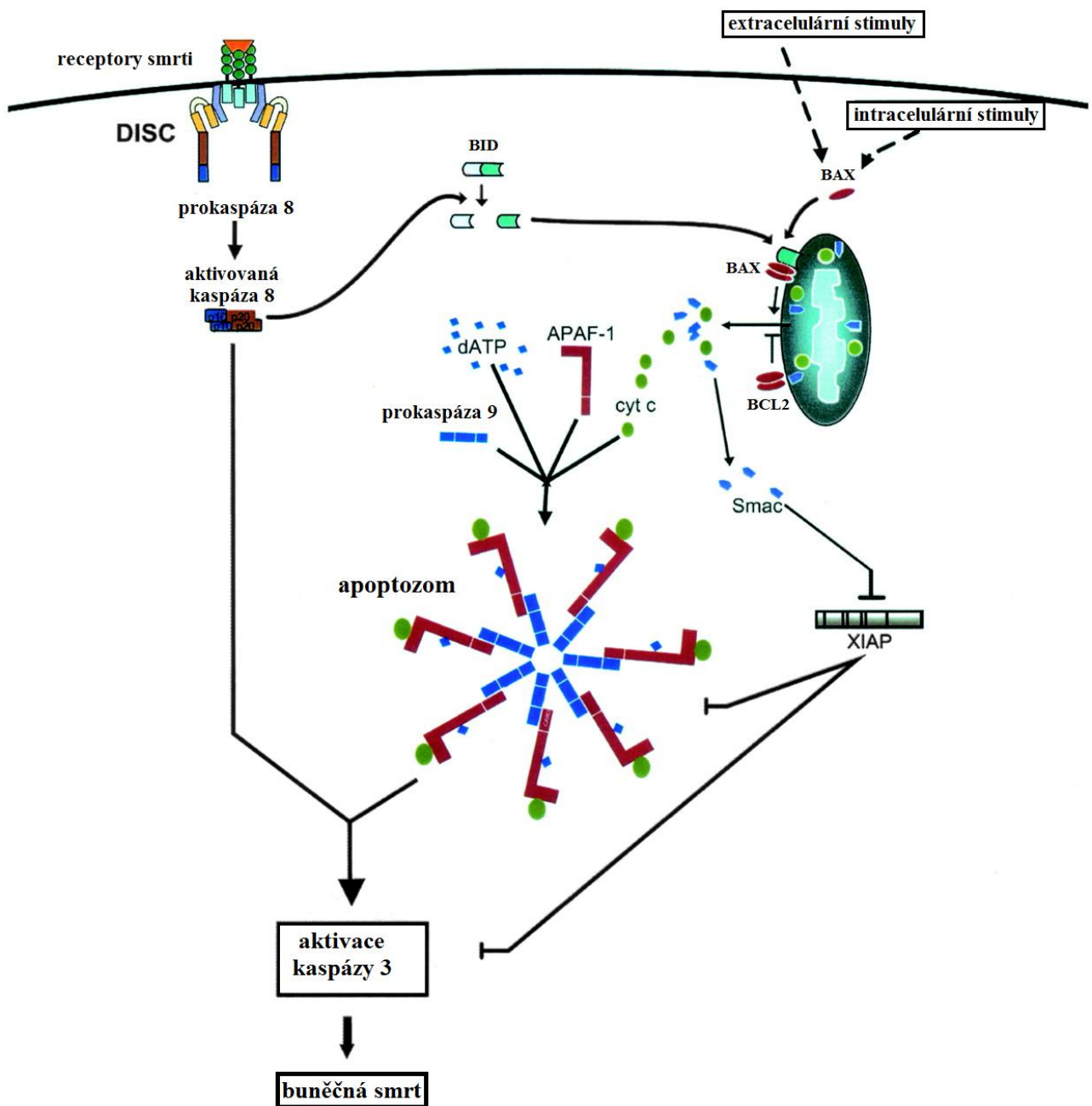
O tom, zda dojde k vytvoření póru ve vnější mitochondriální membráně, rozhodují interakce mezi proapoptotickými a antiapoptotickými proteiny BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2) rodiny. Tyto proteiny jsou v normálních podmínkách v rovnováze, která ovšem může být vychýlena směrem k apoptóze řadou stimulů. Mezi proapoptotické stimuly se řadí vnější signály jako nedostatek živin, radiace, hypoxie nebo vnitřní děje jako poškození DNA, špatné skládání proteinů, oxidativní stres (shrnutí v Crow et al., 2004).

Proteiny BCL2 rodiny se dělí podle struktury a funkce do tří skupin. První skupinu tvoří antiapoptotické proteiny se čtyřmi BCL2 homologními doménami (BH). Patří sem například BCL-2 (B-cell CLL/lymphoma 2) a BCL-xL (Bcl-x protein long isoform). Tyto proteiny brání apoptóze tak, že váží a inhibují proteiny zbylých dvou proapoptotických skupin. Každá z těchto proapoptotických skupin BCL2 rodiny má jinou funkci. Efektorové

proteiny se strukturními doménami BH1-3 přímo tvoří pór v mitochondriální membráně, skupina proteinů s pouze BH3 doménou je zas výrazně ovlivňovaná apoptotickými stimuly.

V efektorové BH1-3 skupině jsou proteiny BAX (BCL2-associated X protein) a BAK (BCL2-antagonist/killer). Za homeostatických podmínek, kdy nejsou aktivované apoptotické dráhy, se BAX nachází v cytosolu a BAK je v mitochondriální membráně blokován antiapoptotickými proteiny nebo, podle jiné teorie, vazbou na napěťově závislý aniontový kanál. Tyto proteiny BH1-3 skupiny jsou ovšem po aktivaci schopné oligomerizovat, a vytvořit tak pór ve vnější mitochondriální membráně, kterým unikají apoptogenní faktory nebo přispět k otevření mitochondriálního póru mPTP propojujícího vnitřní a vnější membránu (shrnutí v Crow et al., 2004).

Druhou proapoptotickou skupinu tvoří proteiny pouze s BH3 doménou. Jednotlivé proteiny této skupiny jsou schopné reagovat na odlišné stresové signály a přenášet je dál přímo, nebo nepřímo na efektorové proteiny BH1-3 skupiny. Hypoxie stejně jako ischemie a reperfúze patří mezi stimuly schopné aktivovat BH3 proteiny. Hypoxie doprovázená acidózou například zvyšuje expresi BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3). BID (BH3 interacting domain death agonist) je štěpen a aktivován nejen kaspázami 8 a 3, ale i proteinem kalpainem v reakci na zvýšení množství vápenných iontů v buňce. Při hypoxii nebo ischemii jsou aktivované různé signální fosfatázy, které defosforylují BAD (BCL2-associated agonist of cell death) a uvolní ho tak z blokáce proteinem 14-3-3. Poškození DNA zvyšuje přes transkripční faktor p53 expresi BID; Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis); NOXA (latinsky poškození) i proteinu BH1-3 skupiny BAX (shrnutí v Logue et al., 2005). Proteiny BH3 skupiny mohou přímo interagovat s efektorovými BH1-3 proteiny, navodit konformační změnu, která vede k aktivaci BAX a BAK, nebo blokovat proteiny, které aktivaci BAX a BAK brání (Walensky and Gavathiotis, 2011). Antiapoptotické proteiny BCL2 a BCL-xL pak mohou fungovat dvěma způsoby: mohou vázat efektorové proteiny BH1-3 skupiny a přímo bránit jejich aktivaci nebo mohou vázat a blokovat proteiny BH3 skupiny. Některé proapoptotické BH-3 proteiny mohou usnadnit apoptózu tím, že samy nahradí jiné BH3 proteiny, a uvolní je tak z vazby na antiapoptotické proteiny. Přesné vztahy a mechanismy interakcí mezi jednotlivými antioapoptotickými a proapoptotickými členy BCL2 rodiny se stále zkoumají (shrnutí v Crow et al., 2004; Walensky and Gavathiotis, 2011). Proteiny všech tří skupin BCL2 rodiny mohou být navíc regulovány nejen intenzitou jejich transkripce, ale i posttranslačními úpravami (shrnutí v Wong and Puthalakath, 2008).



Obr. č. 1: Apoptotické dráhy. Vazba ligandu na receptory smrti umožní jejich konformační změnu, tvorbu komplexu DISC (death inducing signaling complex) a aktivaci prokaspázy 8. Aktivovaná kaspáza 8 štěpí, a tím aktivuje kaspázu 3, která spolu s dalšími efektorovými kaspázami štěpí buněčné struktury a způsobuje buněčnou smrt. Ve vnitřní apoptotické dráze jsou vnější nebo vnitřní apoptotické stimuly přenášeny na mitochondrie pomocí BH3 proteinů, které blokují antiapoptotické proteiny BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2) a BCL-xL (BCL-x protein long isoform) a naopak aktivují proapoptotické proteiny BAX (BCL2-associated X protein) a BAK (BCL2-antagonist/killer). BAX a BAK vytváří pór ve vnější mitochondriální membráně, kterým unikají proapoptogenní faktory. Cytochrom c spolu s APAF (apoptotic protease activating factor-1) a kaspázou 9 vytváří apoptozom a umožňuje následnou aktivaci kaspázy 3. Smac/DIABLO blokuje inhibitor apoptózy XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis). BID (BH3 interacting domain death agonist) je BH3 protein aktivovaný mimo jiné i kaspázou 8. Upraveno z Crow et al., 2004.

3.3.3. Apoptóza v hypoxii

Apoptóza byla pozorovaná u myocytů (neonatálních i izolovaných z dospělých potkanů) v buněčných kulturách vystavených hypoxii (Long et al., 1997; Moissac et al., 2000; Jung et al., 2001). Přesto je možné, že apoptózu nevyvolává samotná hypoxie, ale jevy, které jí doprovázejí jako snížení využitelné energie (ATP) a snižující se pH. Když bylo myocytům pravidelně dodávané čerstvé hypoxické médium obsahující glukózu, hladina ATP sice klesla na 75%, ale buňky si zachovaly kontraktilitu a nedocházelo k apoptóze. Naproti tomu buňky při stejných hypoxických podmínkách bez čerstvého média apoptóze podléhaly (Bishopric et al., 1999). Hypoxie působila apoptózu i v *in vivo* studiích. V srdcích potkanů vystavených normobarické hypoxii s 10 % O₂ po dobu tří týdnů (s několikaminutovou reoxygenací denně při údržbě klecí) bylo pozorováno signifikantně větší procento apoptotických buněk než v srdcích normoxických zvířat. Rozložení apoptotických buněk nebylo lokalizováno do specifické oblasti a bylo rovnoměrně rozděleno mezi obě komory (Jung et al., 2001). Také IHH (8 hodin denně, 12% kyslíku) ovlivňuje apoptotické dráhy v srdci. Při kratším trvání (1 a 4 dny) poklesla exprese zkoumaných proapoptotických genů a zvýšila se exprese antiapoptotických genů, ovšem když se trvání hypoxie prodloužilo na 1 a 2 týdny exprese genů BCL2 rodiny byla ovlivněna zcela opačně (Lee et al., 2006).

S apoptózou by mohla souviset i hypoxií vyvolaná hypertrofie. Je možné, že hypertrofie zvyšuje citlivost kardiomyocytů k apoptóze (Condorelli et al., 1999). I když některé signální molekuly spojované s hypertrofií mohou působit jak proapoptoticky tak antiapoptoticky. Příkladem je JNK (c-Jun N terminal kinase). JNK je v srdci aktivovaná reoxygenací a reperfúzí, kdy aktivuje signální dráhy, které pozitivně regulují FasL, nebo může fosforylovat BCL2. Antiapoptotický vliv JNK, na rozdíl od toho proapoptotického, je závislý na kontrole transkripce a byl popsán v neonatálních myocytech a diferencovaných myších embrionálních kmenových buňkách. Další takovou signální molekulou je kalcineurin, který je také zapojen v navození hypertrofie a zároveň působí antiapoptoticky. Na druhou stranu β -adrenerní stimulace působí přes kalcineurin a zvyšuje uvolňování cytochromu c. O souvislosti hypertrofie s apoptózou by tedy mohly rozhodovat konkrétní podmínky, které hypertrofii navodily (shrnuto v Kang and Izumo, 2003).

3.4. Sfingolipidy v apoptóze

Jak již bylo řečeno, o aktivaci apoptotických drah rozhoduje rovnováha mezi proapoptotickými a antiapoptotickými proteiny v buňce. Tato rovnováha může být vychylována řadou bioaktivních molekul, mezi které patří i rodina sfingolipidů. Sfingolipidy sdílí společný strukturní motiv – sfingoidní bázi, ale v buňce mají mnoho rozdílných funkcí. Dlouho se na sfingolipidy pohlíželo jen jako na strukturní složku buněčných membrán. Až byla v roce 1993 odhalena role ceramidu při indukci apoptózy (Obeid et al., 1993). Později se ukázalo, že apoptózu mohou ovlivňovat i další sfingolipidy. V následujícím textu bude přiblížena role ceramidu, který podporuje aktivaci apoptózy. Dále sfingosinu, který ve vysokých koncentracích stejně jako ceramid indukuje apoptózu, ale v nízkých koncentracích zvyšuje přežívání buněk a sfingosin-1-fosfátu, který spolu s ceramid-1-fosfátem apoptóze spíše brání (shrnutí v Hannun and Obeid, 2008).

3.4.1. Ceramid

Ceramid ovlivňuje buněčnou signalizaci jako součást membránových raftů ale i přímou interakcí s proteiny. Buněčná membrána je složená převážně z fosfolipidů, cholesterolu a sfingolipidů. Sfingolipidy interagují mezi sebou navzájem i s cholesterolem, a tak v buněčné membráně spontánně vytváří vyčleněné oblasti – membránové rafty. Ceramidy ovlivňují strukturu membrány, kompetují s cholesterolem o umístění v membránových raftech, samovolně se sdružují a vytvářejí domény s vysokým podílem ceramidů (shrnutí v Grassmé et al., 2007). Tvorba těchto ceramidových domén byla stimulována signálem přes některé membránové receptory, např. UV zářením (Charruyer et al., 2005), virovou (Grassmé et al., 2005) a nebo bakteriální infekcí (Esen et al., 2001; Grassmé et al., 2003). V ceramidových doménách jsou změněny biofyzikální vlastnosti plazmatické membrány, to vede k zachycení a koncentrování receptorů uvnitř domén, což je alespoň v některých případech, nutné pro další přenos signálu těmito receptory a apoptózu (shrnutí v Grassmé et al., 2007). Ceramidy se také mohou akumulovat ve vnější mitochondriální membráně, kde jsou schopné samy tvořit póry dostatečně velké pro únik cytochromu c (Siskind et al., 2002). Pouze malé procento ceramidů v buňce je skutečně integrováno do mitochondriální membrány, ale už tyto fyziologické koncentrace, které jsou dosaženy při spouštění apoptózy, jsou dostatečné pro tvorbu ceramidových pórů (Siskind et al., 2006). Navíc, ceramid může interagovat s aktivovaným BAX a společně tvořit pór již v nízkých koncentracích, ve kterých by bez této interakce nevznikl (Ganesan et al., 2010). Ceramidové kanály jsou ovlivňovány i

dalším členem BCL2 rodiny. Antiapoptotický BCL-xL ceramidové kanály rozloží (Siskind et al., 2008). Ceramid také aktivuje proteinové fosfatázy PP1 a PP2A (Chalfant et al., 1999), které pak mohou defosforylovat další proteiny a výrazně tak rozšířit biologické funkce ceramidu. PP2A například defosforyluje proapoptotický BAX (čímž ho aktivuje), a antiapoptotický BCL2, který se takto inaktivuje (Xin and Deng, 2006; Ruvolo et al., 1999). Další kinázou aktivovanou ceramidem je PKC ζ , která následně inaktivuje Akt (Zhou et al., 1998). Ceramid také přímo interaguje a aktivuje endolysosomální proteázu katepsin D, který dále štěpí na aktivní formu proapoptotický BH3 protein BID (Heinrich et al., 2004).

3.4.2. Sfingosin

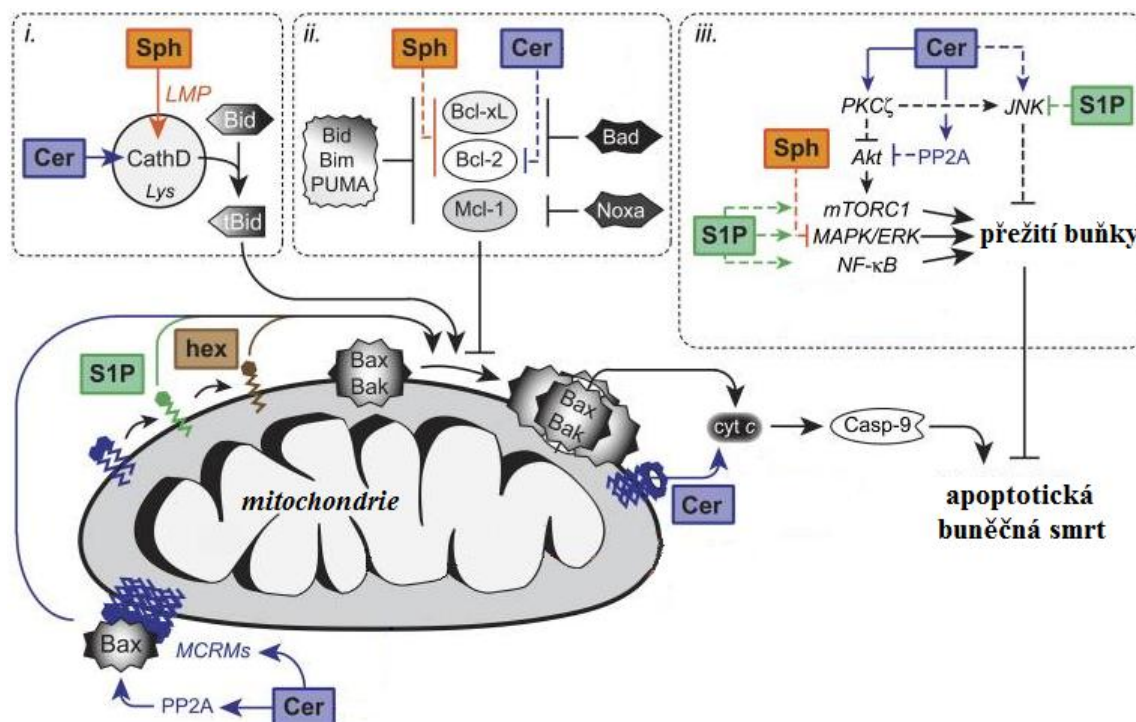
Dalším bioaktivním sfingolipidem je sfingosin, který je ve vysokých koncentracích také spojován s indukcí apoptózy. Sfingosin, stejně jako ceramid, ovlivňuje členy BCL2 rodiny. Podání exogenního sfingosinu snížilo expresi antiapoptotického BCL2 (Sakakura et al., 1996). Na rakovinných buňkách bylo ukázáno, že sfingosin je schopný snížit expresi také dalšího antiapoptotického proteinu BCL-xL (Shirahama et al., 1997). Sfingosin ovlivňuje aktivitu mnoha kináz, mezi ně patří i kinázy specificky aktivované pouze sfingosinem (a N,N-dimetylsfingosinem). Tyto kinázy byly pojmenované SDK (sphingosine-dependent protein kinase) (Megidish et al., 1995; Megidish et al., 1998). Mezi substráty SDK patří chaperonové proteiny endoplazmatického retikula PDI (protein disulfide-isomerase) a kalretikulin, který reguluje množství vápníku v buňce. SDK také fosforyluje proteiny 14-3-3 rodiny (Megidish et al., 1995; Hamaguchi et al., 2003). Autoři navrhují, že by fosforylace 14-3-3 proteinů mohla ovlivnit jejich schopnost vytvářet dimery, a mít tak dopad na jejich funkci. Fosforylace 14-3-3 proteinů by mohla uvolnit vazbu na BAD nebo BAX, umožnit tvorbu pórů v mitochondriální membráně a vést k apoptóze (Hamaguchi et al., 2003). Bylo také zjištěno, že sfingosin může být v lysosomech vlivem kyselého prostředí protonován a působit jako detergent lysosomální membrány. Výsledky naznačují, že by z lysosomů mohly díky narušení membrány unikat proteázy, např. katepsin D, který štěpí a aktivuje BID. Sfingosin by tedy mohl navodit apoptózu i působením na lysosomy (Kågedal et al., 2001). Ve všech těchto experimentech však byly použity velmi vysoké koncentrace sfingosinu (5 μM a vyšší). Novější studie potom ukazují, že sfingosin v nižších, fyziologických, koncentracích (0,4 μM) může působit protektivně a spolu s S1P bránit buněčné smrti po ischemii a reperfúzi. Vliv sfingosinu a S1P je aditivní a obě látky aktivují rozdílné signální dráhy (Vessey et al., 2008a; Vessey et al., 2008b; Vessey et al., 2009a).

3.4.3. Sfingosin-1-fosfát

Sfingosin-1-fosfát (S1P) je sekretován do extracelulárního prostoru, kde se jako ligand váže na membránové receptory spřažené s G-proteiny (Lee et al., 1998). Díky tomu může ovlivňovat migraci, diferenciaci a přežívání buněk, je důležitý pro udržení kontaktu mezi buňkami a embryonální vývoj. Dosud bylo identifikováno pět S1P receptorů S1P₁₋₅ (shrnuto v Chun et al., 2010). Tři z nich S1P₁₋₃ se nacházejí v srdci (Mazurais et al., 2002), kde zajišťují přežívání myocytů za hypoxie a po ischemii následované reperfúzí. Účinek S1P je v tomto případě zprostředkovaný aktivací protektivní proteinkinázy Akt (Means et al., 2007; Zhang et al., 2007). S1P může působit i přes další kinázy (PI-3 kináza, proteinkináza C) malé GTPázy a ovlivněním intracelulární hladiny vápenatých iontů (shrnuto v Mendelson et al., 2014). S1P působí také intracelulárně, nezávisle na svých membránových receptorech. V jádře například váže histonové deacetylázy a inhibuje jejich enzymatickou aktivitu, tímto způsobem ovlivňuje transkripci (Hait et al., 2009). Je zajímavé, že v membráně mitochondrií S1P a jeho degradační produkt hexadecenal podporují proapoptotické proteiny BAX a BAK ve vytváření póru ve vnější mitochondriální membráně (Chipuk et al., 2012). Na rozdíl od extracelulárního působení má tedy S1P v mitochondriích proapoptický účinek.

3.4.4. Ceramid-1-fosfát

Stejně jako S1P také ceramid-1-fosfát (C1P) působí antiapoptoticky, stimuluje syntézu DNA a dělení buněk (Gomez-Muñoz et al., 1995; Gómez-Muñoz et al., 2004; Gómez-Muñoz et al., 2005). Také zvyšuje fúzi membrán, a je tak pravděpodobně zapojen do procesů jako je fagocytóza (Hinkovska-Galcheva et al., 2005) nebo uvolňování neurotransmiterů (Bajjalieh et al., 1989). C1P se podílí i na přenosu zánětlivé odpovědi. Přímo aktivuje cytosolickou fosfolipázu A2. Zvyšuje tak uvolňování arachidonové kyseliny a tvorbu eikosanoidů (Pettus et al., 2004). Působení C1P, stejně jako S1P, vede k fosforylaci a aktivaci Akt. Akt potom může přes transkripční faktor NF-κB aktivovat transkripci antiapoptotického proteinu BCL-xL, jak bylo ukázáno v buňkách myších makrofágů (Gómez-Muñoz et al., 2005). C1P také ovlivňuje transport iontů iontovými kanály závislými na napětí a Na/K ATPázou (Törnquist et al., 2004; Milescu et al., 2009; Kreydiyyeh and Dakroub, 2014).



Obr. č. 2: Zobecněný pohled na regulaci apoptózy sfingolipidy Sfingolipidy přímo ovlivňují mitochondrie. Ceramid (Cer) přímo tvoří póry ve vnější mitochondriální membráně nebo zde vytváří makrodomény (MCRMs mitochondrial ceramide-rich macrodomains) a spolupracuje s BAX (BCL2-associated X protein) na vytvoření póru. Ceramid také aktivuje proteinovou fosfatázu PP2A, která defosforyluje a aktivuje proapoptotický BAX. Sfingosin-1-fosfát (S1P) a jeho degradační produkt hexadecenal také podporují proapoptotické proteiny BAX a BAK (BCL2-antagonist/killer) ve vytváření póru ve vnější mitochondriální membráně.

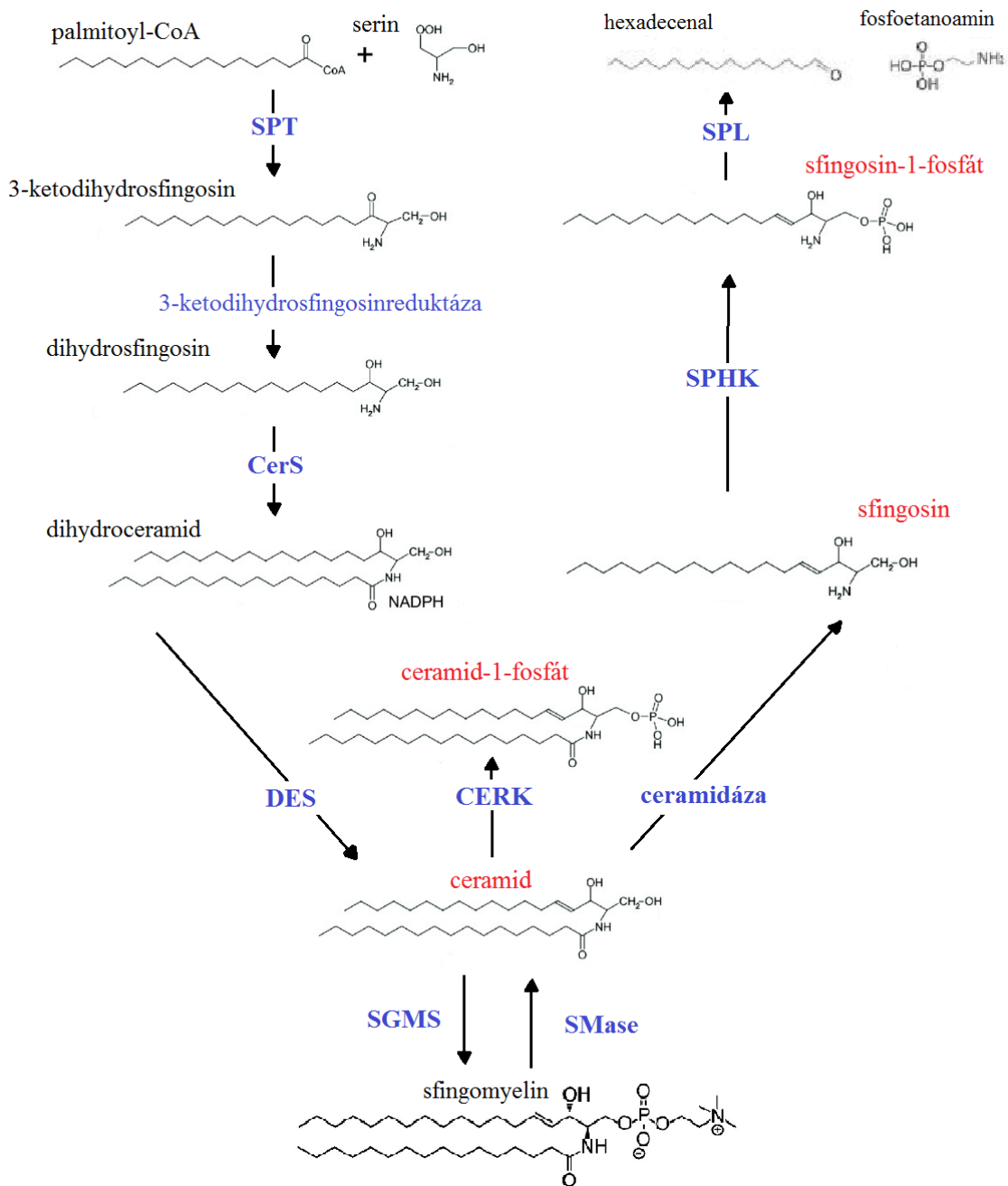
i) Lyzozomy: Ceramid přímo váže a aktivuje katepsin D, který štěpí a aktivuje proapoptotický BID (BH3 interacting domain death agonist). Sfingosin (Sph) může být v lyzozomální membráně protonován, což vede k narušení lyzozomální membrány (LMP lysosomal membrane permeabilization) a štěpení BID.

ii) BCL2 rodina: Sfingosin snižuje množství antiapoptotických proteinů BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2) a BCL-xL (Bcl-x protein long isoform). Ceramid přes PP2A inaktivuje BCL2.

iii) Kinázy: Ceramid přímo aktivuje proteinkinázu C ζ (PKC ζ), která zprostředkuje aktivaci JNK (c-Jun N-terminal kinase) a inhibici protektivní kinázy Akt. S1P potlačuje aktivaci JNK a aktivuje signalizaci protektivními kinázami Akt/mTORC1 (mammalian target of rapamycin), MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/ extracellular signal-regulated kinase) a transkripčním faktorem NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) tím, že se váže na membránové receptory. Sfingosin podporuje apoptózu tím, že potlačuje MAPK/ERK signalizaci. Upraveno z Young et al., 2013.

3.5. Dráhy produkce a degradace biokativních molekul sfingolipidů

Sfingolipidy je souhrnné označení pro molekuly obsahující základní 18 uhlíkatou animo-alkoholovou kostru nazývanou sfingoidní báze. Některé sfingolipidy jsou součástí buněčných membrán nebo působí jako signální molekuly. O jejich významu svědčí fakt, že delece enzymů syntetických a degradačních drah sfingolipidů jsou často letální. Jak ukazuje obr. 3, vznik všech sfingolipidů umožňuje reakce, v níž je syntetizována sfingoidní báze. Ta je pak upravována sérií syntetických a degradačních reakcí, až je nakonec v poslední degradační reakci rozštěpena na dvě molekuly, které už se neřadí ke sfingolipidům (shrnuto v Gault et al., 2010). Některé sfingolipidy vznikající v těchto reakcích mohou ovlivňovat apoptotické dráhy.



Obr. č. 3: Základní dráhy produkce a degradace bioaktivních molekul sfingolipidů. Serinpalmitoyltransferáza (SPT) katalyzuje první reakci při syntéze sfingolipidů, ve které vzniká sfingolipidová kostra – sfingoidní báze. Ta je dále upravována enzymy 3-ketodihydrosfingosinreduktáza, ceramidsyntáza (CerS) a desaturáza (DES) za vzniku bioaktivního ceramidu. Ceramid pak může být substrátem pro syntézu komplexních sfingolipidů, mezi které se řadí sfingomyelin. Syntézu sfingomyelinu z ceramidu katalyzuje sfingomyelinsyntáza (SGMS), degradaci sfingomyelinu na ceramid sfingomyelináza (SMase). Ceramid může být také fosforylován ceramidkinázou (CERK) na ceramid-1-fosfát nebo štěpen na sfingosin ceramidázou. Sfingosin je dále fosforylován sfingosinkinázou (SPHK) na sfingosin-1-fosfát, který je štěpen sfingosin-1-fosfát-lyázou (SPL). V této reakci je katabolizována sfingoidní báze, její produkty se už neřadí mezi sfingolipidy. Substráty a produkty reakcí jsou značené černě, bioaktivní sfingolipidy červeně a enzymy modře.

3.5.1. Syntéza

Serinpalmitoyltransferáza

První rychlost limitující reakce při *de novo* syntéze sfingolipidů je katalyzována enzymem serinpalmitoyltransferázou (SPT). Tento enzym katalyzuje kondenzaci cytosolického serinu a palmitoyl-CoA za tvorby 3-ketodihydrosfingosinu. SPT je heterodimer tvořený podjednotkou SPTLC1 (serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 1) a jednou z izoform druhé podjednotky SPTLC2 nebo SPTLC2L (serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2 nebo 2L; SPTLC2L je také nazývána SPTLC3), a asociuje s dalšími malými podjednotkami ssSPT (small subunit of SPT), které zvyšují jeho aktivitu. SPT je, stejně jako všechny enzymy podílející se na syntéze ceramidu, vázána v membráně endoplazmatického retikula (ER) s aktivním místem exponovaným do cytosolu (shrnutí v Tidhar and Futerman, 2013). Bylo prokázáno, že úplná delece jedné z podjednotek SPTLC1 nebo SPTLC2 je letální už během embrionálního vývoje. Heterozygoti pouze s jednou funkční kopií SPTLC1 nebo SPTLC2 vykazovali signifikantní změny v obsahu sfingolipidů (ceramidu a S1P) v plazmě. Z této studie také vyplývá, že bez vzájemné interakce se stabilita obou podjednotek snižuje (Hojjati et al., 2005).

3-ketodihydrosfingosinreduktáza

3-ketodihydrosfingosinreduktáza katalyzuje reakci, v níž je karbonylová skupina na 3-ketodihydrosfingosinu redukována na hydroxylovou skupinu a vzniká dihydrosfingosin (také nazývaný sfinganin). Tato reakce probíhá velmi rychle, proto je množství 3-ketodihydrosfingosinu v buňce nízké. V savčích buňkách je 3-ketodihydrosfingosin reduktáza kódovaná genem nazývaným *FVT-1* (*follicular lymphoma variant translocation-1*) podle místa jeho předchozí identifikace (Kihara and Igarashi; 2004, shrnutí v Gault et al., 2010).

Dihydroceramidsyntáza, ceramidsyntáza a dihydroceramiddesaturáza

Vzniklý dihydrosfingosin je dále acylován jednou z šesti (dihydro)ceramidsyntáz (CerS). CerS1-6 jsou kódovány šesti různými geny. Jednotlivé CerS přednostně katalyzují reakce s různě dlouhými acyl-CoA a dávají tak vzniknout (dihydro)ceramidům s odlišnou délkou acylových řetězců – 14-30 uhlíků. Ceramid je tedy souhrnné označení pro molekuly s rozdílnou délkou uhlíkatých řetězců, která jim dává odlišné vlastnosti (shrnutí v Grösch et al., 2012). Obsah jednotlivých ceramidů se mezi tkáněmi liší, stejně jako exprese jednotlivých CerS. Složení ceramidů v tkáni není závislé na dostupnosti jednotlivých acyl-CoA a ne vždy přesně odpovídá expresi a aktivitě jednotlivých CerS. Zdá se, že je ovlivněno i dalšími enzymy sfingolipidové dráhy (Schiffmann et al., 2013). Činností CerS je tedy z dihydrosfingosinu syntetizován dihydroceramid. Z dihydroceramidu vzniká ceramid vytvořením dvojité vazby mezi uhlíky C4-C5 alkoholu. Tato reakce je katalyzována enzymem dihydroceramiddesaturáza 1 (DES1). Ceramid se podílí na regulaci apoptotické odpovědi na stres, stimuluje vnější (Grassmé et al., 2001) i vnitřní apoptotickou dráhu (Siskind et al., 2002; Chalfant et al., 1999; Heinrich et al., 2004).

Sfingomyelinsyntáza, protein transferující ceramid

Sfingomyelin je nejvíce zastoupeným sfingolipidem v savčím organismu. Pro jeho syntézu musí být špatně rozpustný ceramid dopraven z membrány ER do Golgiho komplexu. Děje se tak v membránových váčcích nebo je ceramid přepravován vázaný v hydrobóbní kapse proteinu CERT (ceramide transfer protein). Inhibice CERT snižuje *de novo* syntézu sfingomyelinu a zdá se, že by přeprava ceramidu do Golgiho aparátu mohla být snížena fosforylací CERT (shrnutí v Hanada 2010). Sfingomyelin je tvořen přenosem fosfocholinové skupiny z fosfatidylcholinu na primární hydroxylovou skupinu ceramidu. Z fosfatidylcholinu tak současně vzniká diacylglycerol (DAG). Byly identifikovány dvě sfingomyelinsyntázy (SGMS), které se nachází ve většině lidských tkání (Huitema et al., 2004), třetím členem této rodiny jsou SMSr (SMS-related) enzymy, které ale výhradně tvoří ceramidfosfoetanolamin (Vacaru et al., 2009; Ternes et al., 2009). Sfingomyelinsyntázy 1 i 2 se obě nacházejí v membráně trans Golgi, ale pouze sfingomyelinsyntáza 2 je přítomná i v plazmatické membráně a orientovaná do extracelulárního prostoru (Huitema et al. 2004). Na biologickou funkci SGMS lze pohlížet ze dvou úhlů. Využívají proapoptický ceramid jako substrát, a tím snižují jeho množství. Zároveň však tvoří sfingomyelin, který je stejně jako ceramid součástí

membránových raftů důležitých pro agregaci receptorů TNFR rodiny, tvorby DISC a aktivaci vnější apoptotické dráhy (shrnutí v Holthuis and Luberto, 2010).

Ceramidkináza

Ačkoliv je ceramid substrátem pro tvorbu sfingosinu a dalších komplexních sfingolipidů, může být také fosforylován. Fosforylaci ceramidu na C1P katalyzuje enzym ceramidkináza (CERK). Přestože byla CERK identifikovaná na základě podobnosti se sfingosinkinázou, je specifická pouze pro ceramid. Sfingosin i dihydroceramid fosforyluje s velmi nízkou aktivitou. CERK mRNA byla přítomná ve většině tkání, ale lišila se intenzita její exprese. Nejvyšší množství CERK mRNA bylo v srdci (Sugiura et al., 2002). C1P působí proliferačně nebo brání buněčné smrti ať už tím, že se jeho tvorbou snižuje množství proapoptického ceramidu, nebo přímo aktivací proteinů protektivních drah.

3.5.2. Degradace

V katabolické dráze mohou být komplexní sfingolipidy štěpeny a znovu tvořit ceramid. Tyto reakce brání akumulaci komplexních sfingolipidů v buňce. Nedostatečná funkce enzymů katabolizujících sfingolipidy je příčinou mnoha chorob.

Sfingomyelinázy

V lidských buňkách je z komplexních sfingolipidů nejvíce zastoupený sfingomyelin. Rovnováha v jeho syntéze a hydrolýze je udržována sfingomyelinázami rozdělovanými do tří kategorií podle jejich optimálního pH: kyselá, neutrální a alkalická. Alkalická sfingomyelináza (alk-SMase) se nachází se pouze ve střevní mukóze a u lidí i ve žluči (Cheng et al., 2002). Kyselá sfingomyelináza (aSMase acid sphingomyelinase) je kódována jediným genem, ale exprimovaný protein prochází řadou posttraslačních modifikací. Tyto posttraslační úpravy rozhodují, zda bude aSMase sekretována na povrch buněčné membrány nebo směřována do lysosomů, kde je nejvhodnější prostředí pro její aktivitu. Aktivita aSMase je podporovaná řadou stimulů, mezi nimi jsou ligandy receptorů smrti, radiace, chemoterapeutické látky, patogeny a cytokiny. Vytvořené ceramidy pak modulují signální dráhy, ať už svým účinkem na tvorbu membránových raftů nebo přímo vazbou na proteiny (shrnutí v Zeidan and Hannun, 2010). Další skupinu tvoří neutrální sfingomyelinázy (nSMase): nSMase1 kódovaná genem *SMPD2* (*sphingomyelin phosphodiesterase*), nSMase2

(gen se nazývá *SMPD3*), nSMase3 (*SMPD4*) a MA-nSMase (mitochondrial-associated nSMase; kódovaná genem *SMPD5*). Jsou klíčové pro tvorbu ceramidu během stresu. Nejlépe prozkoumaná je nSMase2, která ovlivňuje mineralizaci kostí, zastavení buněčného růstu a zánětlivou odpověď. nSMase2 se nachází ve vnitřní vrstvě plazmatické membrány a v membráně Golgiho aparátu, přičemž se zdá, že stresové stimuly mohou vyvolat přemístění nSMase2 do plazmatické membrány, kde je její aktivita vyšší (Clarke et al., 2008; Milhas et al., 2010). nSMase1 byla první identifikovanou sfingomyelinázou této skupiny (Tomiuk et al., 1998), přesto není její role v lipidovém metabolismu jasná (Sawai et al., 1999) stejně jako úloha MA-nSMase objevené až v roce 2010 (Wu et al., 2010). V souvislosti s vlivem ceramidů na apoptózu se předpokládá výskyt MA-nSMase v mitochondriích a ER (shrnutí v Airola and Hannun, 2013).

Ceramidázy

Ceramid je dále štěpen na sfingosin. Ačkoliv celá skupina sfingolipidů získala své jméno podle sfingosinu, ten není u savců syntetizován *de novo*, ale vzniká pouze štěpením ceramidu. Savčí desaturáza totiž není schopná přeměnit dihydrosfingosin na sfingosin (Michel et al., 1997). Ceramidázy jsou také rozdělovány podle svého pH optima na kyselou, neutrální a tři alkalické. Kyselá ceramidáza je lysosomální enzym, který deacyluje ceramidy vzniklé degradací sfingolipidů plazmatické membrány. Neutrální ceramidáza je ve velkém množství exprimovaná ve střevním epitelu, kde přispívá k trávení sfingolipidů přijatých v potravě. Rodina alkalických ceramidáz (ACER) má tři členy, kteří se liší rozmístěním v buňce i specifitou pro substráty. ACER1 je převážně exprimovaná v epidermis a neštěpí dihydroceramidy a fytoceramidy. ACER2 a ACER3 se nachází ve všech tkáních. ACER3 štěpí přednostně fytoceramidy (shrnutí v Gault et al., 2010). Zatímco ceramid vždy podporuje proapoptotické dráhy, sfingosin k apoptóze přispívá nebo jí potlačuje, podle koncentrace v buňce.

Sfingosin může být znovu acylován, a být tak přeměněn zpět na ceramid. Tuto reakci také katalyzují ceramidsyntázy (CerS). Ceramid tedy vzniká činností CerS buď při syntéze *de novo* přes meziproduct dihydroceramid nebo přímo ze sfingosinu. Stejně tak dihydroceramid může být štěpen ceramidázami na dihydrosfingosin.

Sfingosinkináza

Pokud je sfingosin fosforylován, výrazně to mění jeho vlastnosti. S1P pak aktivuje dráhy důležité pro pohyb buněk, organizaci cytoskeletu, vaskularizaci, buněčný růst, přežití a imunitní odpověď (shrnutí v Karliner 2013). S1P má také výrazný kardioprotektivní efekt a zvyšuje přežívání kardiomyocytů během hypoxie (Karliner et al., 2001; Zhang et al., 2007; Vessey et al., 2009b). Syntéza S1P je katalyzovaná dvěma izoformami sfingosinkinázy SPHK1 a SPHK2 (sfingosinkináza 1 a 2) pro každou z nich existují ještě sestříhové varianty. Fenotyp myši, které měly funkční pouze jednu z izoform, se výrazně neměnil (Allende et al., 2004, Vessey et al., 2011), ale delece obou izoform byla letální už během embryonálního vývoje (Mizugishi et al., 2005). Proto se zdá, že sfingosinkinázy jsou vzájemně zastupitelné. Ačkoliv se obě sfingosinkinázy nachází ve všech tkáních, míra jejich exprese se ve tkáních liší (shrnutí v Alemany et al., 2007), v srdci potkanů se dokonce mění poměr obou kináz s věkem (Vessey et al., 2009a). Liší se také lokalizace izoform sfingosinkináz v buňce. Obě kinázy jsou schopné kromě sfingosinu fosforylovat i dihydrosfingosin a jiné substráty, avšak jejich specifita pro jednotlivé substráty se liší. Sfingosinkinázy se mohou lišit také svým účinkem, SPHK1 působí proliferačně a zvyšuje přežívání buněk (Olivera et al., 1999), SPHK2 naopak může vyvolat apoptózu. Na druhou stranu srdce myši s nefunkční SPHK2 byla více poškozená experimentální ischemií a reperfúzí (Vessey et al., 2011).

Sfingosin-1-fosfátfosfatáza

S1P je defosforylován dvěma třídami fosfatáz nespecifickými lipidovými fosfatázami a S1P specifickými fosfatázami. Lipidové fosfatázy jsou membránové proteiny s katalytickým místem mířícím do extracelulárního prostoru nebo do lumen nitrobuněčných membrán. Mohly by tak ovlivňovat množství S1P působícího z vnějšku buňky na receptory spojené s G proteiny i množství S1P uvnitř buňky. S1P specifické fosfatázy se oproti tomu nachází v ER a předpokládá se, že zvyšují množství sfingosinu pro syntézu ceramidu (shrnutí v Pyne et al., 2005).

S1P-lyáza

S1P-lyáza (SPL) zprostředkuje poslední reakci při degradaci sfingolipidů, v které jsou fosforylované sfingoidní báze (S1P, dihydrosfingosin-1-fosfát a fytosfingosin-1-fosfát) štěpené na hexadecenal a fosfoetanolamin. Je tedy důležitá pro udržení homeostázy sfingolipidů a její nedostatečná funkce se pojí s vývojovými a funkčními defekty (anémie, defekty kostí a vaskularizace, imunitní odpovědi) (shrnutí v Serra and Saba, 2010). SPL je membránový protein lokalizovaný do ER přítomný ve všech tkáních (Ikeda et al., 2004).

4. CÍLE PRÁCE:

- Ověřit přesnost čipové analýzy BioMark HD Systém, Fluidigm pomocí Real time PCR v systému LightCycler 480, Roche Applied Science
- Stanovit expresi vybraných genů apoptotických drah a metabolismu sfingolipidů v levé a pravé komoře srdce potkana v průběhu adaptace na kontinuální normobarickou hypoxii
- Stanovit expresi vybraných genů apoptotických drah a metabolismu sfingolipidů v levé komoře srdce potkana po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii

5. MATERIÁL A METODY

5.1. Adaptace potkanů

Samci dospělých potkanů kmene Wistar byli v následujících experimentech chováni v režimu 12h tmy/ 12h světla a krmení standardní dietou s dostupností vody *ad libitum*.

V této práci byly sledovány účinky dvou typů hypoxie – kontinuální normobarické hypoxie (CNH) a intermitentní hypobarické hypoxie (IHH):

Pro první experimentální část byli potkani rozděleni do 5 skupin po 6 jedincích. Kontrolní skupina byla chována po dobu tří týdnů v normoxii, (skupina N). Ostatní čtyři skupiny byly vystaveny různě dlouhé expozici kontinuální normobarické hypoxie (10% O₂), a to 4 hodiny (skupina H4), 48 hodin (skupina H48), 120 hodin (skupina H120) nebo 21 dní (skupina CH).

Ve druhé experimentální části bylo 8 potkanů vystaveno hypobarické hypoxii (odpovídající 7 000 m.n.m.) intermitentně 8 hodin denně po dobu 5 týdnů v celkem 25 expozicích (skupina IHH). Dalších 8 potkanů tvořilo kontrolní skupinu a bylo chováno v normobarických podmínkách (skupina N).

5.2. Odběr tkáně

Potkani vystavení CNH byli na konci expozice usmrceni přímo v normobarických komorách cervikální dislokací. Potkani adaptovaní na IHH byli usmrceni následující den po poslední expozici stejným způsobem. Následně bylo operativně vyjmuto srdce a po dobu dvou až tří úderů ponecháno v kádince s chlazeným fyziologickým roztokem, aby došlo k vyprázdnění komor od krve. Poté bylo srdce na ledu rozděleno na pravou komoru, levou komoru a septum. Jednotlivé vzorky byly zmrazeny v tekutém dusíku, zváženy a dále byly uchovány v tekutém dusíku pro další zpracování.

5.3. Analýzy mRNA transkriptů

5.3.1. Homogenizace srdeční tkáně a izolace RNA pro analýzy mRNA transkriptů

Pro izolaci veškeré RNA byly připraveny zkumavky se třemi malými a třemi velkými skleněnými kuličkami a 0,5 ml RNAzolu. Zkumavky s tímto obsahem byly zváženy pro pozdější určení hmotnosti srdeční tkáně. Srdeční tkáň rozdrcená v tekutém dusíku byla přenesena do takto připravených zkumavek a okamžitě zalita dalšími 0,5 ml RNAzolu. Zkumavka byla uzavřena a její obsah dynamicky protřepán rukou tak, aby tkáň rozmrzla až při styku s RNAzolem. Dále byl obsah zkumavky promíchán na třepačce Vortex a krátce zcentrifugován. Poté byla zkumavka zvážena a byla určena hmotnost vzorku tkáně. Pokud hmotnost tkáně převyšovala 120 mg, bylo ke vzorku přidáno dalších 0,5 ml RNazolu.

Vzorky byly homogenizovány ve vychlazených kyvetách homogenizátoru (MIXER MM200, Retsch) po dobu 10 minut při frekvenci 30 Hz a centrifugovány po dobu 10 minut při 11000 g. Odebraný supernatant byl uložen k pozdějšímu zpracování v -80 °C

5.3.2. Izolace RNA

K supernatantu odebranému po homogenizaci tkáně a centrifugaci bylo přidáno 400 ml RNase-free vody. Zkumavka byla ručně několikrát překllopena a ponechána inkubovat se při pokojové teplotě po dobu 15 minut. Po 15 minutové centrifugaci při 1200 g byl odebrán 1 ml supernatantu. K 1 ml odebraného supernantu byl přidán 1 ml izopropanolu. Zkumavka byla opět několikrát překllopena, aby se obsah jemně zamíchal, a ponechána inkubovat se 10 minut při pokojové teplotě. Po 10 minutách centrifugace při 12000 g byl odstraněn supernatant. K sedimentu precipitované RNA bylo následně přidáno 400 ml 75% etanolu, zkumavka byla několikrát promíchána překlopením a znovu centrifugována 3 minuty při 8000 g. Po té byl etanol důkladně odstraněn a celý krok se ještě jednou opakoval. Po konečném odebrání etanolu byly zkumavky na minutu přemístěny do termostatického boxu vyhřívávaného na 37 °C, aby se odpařily i poslední zbytky etanolu.

RNA sediment byl rozpuštěn ve 100 ul RNase-free vody při 55 °C po dobu 5 minut. Po té byl vzorek zchlazen na ledu.

5.3.3. Měření koncentrace RNA

Koncentrace a čistota RNA byly stanoveny spektrofotometriky na spektrofotometru pro měření malých objemů (1 ul) Nanodrop (Lab Mark). 1 ul vzorku izolované RNA byl 10x ředěn v 0,5 % SDS (dodecylsírán sodný). 0,5% roztok SDS byl pak použit jako blank.

O čistotě RNA vypovídá poměr absorbancí při vlnové délce 260 a 280 nm. U čisté DNA je tento poměr 1,8, pro čistou RNA 2-2,2. Přítomnost fenolů, proteinů a dalších kontaminantů snižuje hodnotu toho poměru. Hodnotu poměru 260/280 dále ovlivňuje iontová síla roztoku a pH. Kyselé roztoky mohou snižovat poměr o 0,2-0,3, bazické roztoky ho o tyto hodnoty zvyšují.

5.3.4. Ověření kvality RNA

Kvalita vzorků byla kontrolována horizontální elektroforézou na agarovém gelu. Vzorky RNA (0,2 µg RNA/ 2 µl RNase-free vody, s 1 µl loading pufru) byly naneseny na 1,5% agarózový gel v denaturujícím prostředí s obsahem ethidium bromidu pro následnou vizualizaci. Elektroforéza probíhala v pufru TAE (40mM Tris base, 20mM acetic acid, 2mM EDTA) při napětí 80 V po dobu 60 min. RNA s inkorporovaným ethidium bromidem bylo na gelu vizualizováno při osvětlení UV paprsky. RNA ve vzorku je považována za neporušenou, jestliže jsou na gelu patrné dva ostře ohraničené pruhy rRNA 18S a 28S r RNA. 28S RNA by měla mít zhruba dvakrát intenzivnější signál. Signál ve vysokých molekulových hmotnostech může vypovídat o kontaminaci vzorku DNA.

Dále byla ověřena integrita celkové RNA u 24 náhodně vybraných vzorků servisním pracovištěm BTÚ AVČR na přístroji Agilent bioanalyzer. Zde je sledována fluorescence elektroforeticky rozdělených vzorků RNA. Výsledkem analýzy je elektroforetogram, z kterého software automaticky vyjádří hodnotu RIN (RNA integrity number). Pro intaktní RNA je hodnota RIN = 10, silně degradovaná RNA má hodnotu RIN = 1. Testované vzorky se pohybovaly mezi hodnotami RIN 7,70 – 9,90. Bylo tedy dosaženo vysoce uspokojivých výsledků.

5.3.5. Reverzní transkripce

Reverzní transkripce převádí RNA na stabilnější cDNA. Reverzní transkripce probíhala podle protokolu RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Fermentas). Do reakce vstupoval vždy 1 µg RNA a 1 µl oligo(dT) primeru (0,5 µg/µl), objem byl doplněn do 7 µl sterilní injekční vodou. Směs byla po dobu 5 min inkubována při 65°C, aby došlo k denaturaci RNA. Následně byly vzorky zchlazeny na 4°C po dobu 5 min, aby došlo k nasednutí primerů, a krátce centrifugovány. Ke každému vzorku bylo přidáno 12,9 µl premixu, který byl předem připraven pro všechny vzorky tak, aby do každé reakce vstupovalo stejné množství komponent a to: 4 µl 5 x Reaction Buffer, 0,95 µl RiboLock Rnase Inhibitor (20u/µl), 2 µl 10mM dNTP Mix a 0,95 µl RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (200u/µl) a 5 µl DEPC vody. Po promíchání a rychlé centrifugaci reakční směsi probíhala reverzní transkripce po dobu 60 min při 42 °C. Reakce byla ukončena zahříváním při 70 °C po dobu 5 min. Po ukončení reakce byly vzorky ochlazeny a naředěny v poměru 1:4 sterilní injekční vodou. Tyto naředěné vzorky byly uloženy v -80 °C k pozdějšímu zpracování pod označením cDNA. Reakce vzorků z IHH skupiny a z odpovídající kontrolní skupiny potkanů probíhala v dvojnásobném množství.

5.3.6. Real time PCR (Light Cycler 480, Roche Applied Science)

Měření Real time PCR reakcí probíhala podle protokolu Light Cycler 480 DNA SYBR Green I Master (Roche Applied Science) v 384 jamkové destičce v přístroji LightCycler[®]480 System (Roche Applied Science)

Protokol reakcí byl následující – preinkubace při teplotě 95 °C po dobu 10 min následovaná 50 cykly s tímto teplotním profilem: 95 °C/ 10 sec, 60 °C/ 30 sec, 72 °C/ 1 sec. Pro každý produkt reakce byla následně zaznamenána křivka tání. Posledním krokem bylo ochlazení na teplotu 40 °C.

Do reakce vstupoval 1 µl cDNA a 9 µl reakční směsi připravené pro všechny reakce zároveň tak, aby na každou reakci připadlo: 5 µl SYBR Green premixu (Eurogentec), 3 µl sterilní injekční vody a 1 µl zásobního roztoku obou primerů 5 µmol/l.

Efektivita primerů byla vždy testována na směsi cDNA všech vzorků ředěné 1x, 10x, 100x. Analýzou křivky tání se určovalo, zda PCR reakce měla pouze jeden specifický produkt. Byl kontrolován dostatečný odstup při tvorbě produktů PCR reakce u negativních

kontrol – nejméně 10 Cp (crossing point). Každý vzorek byl na destičce měřen v triplicátech. Výsledná hodnota Cp je průměrem ze všech tří měření, pokud směrodatná odchylka nepřesáhla 0,5.

5.3.7. Real time PCR čipová analýza (BioMark HD System, Fluidigm)

Čipová analýza exprese vybraných genů metodou Real time PCR v systému BioMark HD System (Fluidigm) byla provedena na zakázku pracovištěm BTÚ AVČR. Vzorky cDNA vstupující do Real time PCR reakce měly v obou systémech měření, v systému BioMark HD System, Fluidigm (dále jen BioMark) i v systému Light Cycler 480, Roche Applied Science (dále jen LC Roche), stejnou koncentraci, která odpovídá koncentraci 10 ng/μl původní RNA. Koncentrace směsi obou primerů pro čipovou analýzu byla 10 μmol/l.

Preamplifikace

cDNA byla nejprve preamplifikována pomocí Real time PCR s použitím LC Roche. Preamplifikace probíhala ve dvou kolech, v každém byly využity primery pro polovinu měřených genů. Vždy byly použity 3 μl směsi obou primerů ředěné 6 μl vody. Do reakce dále vstupovaly 2 μl cDNA, 5 μl IQ SuperMix BioRad, 1,25 μl 200 nM preamplifikační primer mix (final. konc. 25 nM), 1,75 μl Po počáteční preinkubaci 95 °C/ 3 min probíhala preamplifikace v 18 cyklech s teplotním profilem: 95 °C/ 15 s; 59 °C/ 4 min. Po obou kolech preamplifikace byly cDNA 10x naředěny a teprve potom smíchány dohromady v poměru 1:1.

Real time PCR

Čipovou analýzou BioMark byla měřena exprese 96 genů v 96 vzorcích cDNA. Pět μl vzorkového premixu Fluidigm se skládalo z těchto reagensů: preamplifikovaná 20x ředěná cDNA 1 μl; SG loading buffer Fluidigm 0,25 μl; Sso Fast Eva Green Mastermix 2,5 μl; Invitrogen ROX (4x diluted) 0,1 μl a H₂O 1,15 μl. Každý vzorkový premix byl pak kombinován s 5 ul primerového premixu, který obsahoval: směs obou primerů 2 μl; 2x assay loading reagent Fluidigm 2,5 μl a H₂O 0,5 μl. Objem jedné Real time PCR reakce byl 6,7 nl (podle Vymetalkova et al., 2014). Reakce probíhaly za následujících teplotních podmínek 50 °C/ 5s, 98°C/ 40s; následované 30 cykly s teplotním profilem: 95 °C/10s, 60°C/ 40s.

Pro každý produkt reakce byla následně zaznamenána křivka tání. Pokud reakce měla dle křivky tání více než jeden specifický produkt, byla vyřazena z následné analýzy dat.

5.3.8. Vyjádření relativní exprese

Expres studovaných genů na úrovni mRNA byla vyjádřena relativně k hladině transkriptu referenčního genu *hypoxantin-guaninfosforibosyltransferáza (HPRT)* v daném vzorku (Bohuslavová et al., 2010). Výsledné hodnoty C_p získané z obou systémů měření (LC Roche a BioMark) byly přepočteny podle stejného vzorce (Pfaffl, 2001, Žurmanová et al., 2008):

$$\text{Relativní exprese} = (1+E)^{C_p \text{ referenční transkript}} / (1+E)^{C_p \text{ sledovaný transkript}}$$

Efektivita (E) byla na základě předběžných měření při testování primerů na přístroji LC Roche stanovena $E = 1$

5.3.9. Statistické vyhodnocení

Ke statistickému vyhodnocení byl použit software GenEx a GraphPad Prism6. Data pocházejí ze dvou pokusů. V prvním pokusu byly porovnány čtyři skupiny vystavené po různé dobu CNH s kontrolní skupinou v normoxii. V druhém pokusu byly porovnávány pouze dvě skupiny – skupina adaptovaná na IHH s odpovídající kontrolní skupinou v normoxii.

Nejprve bylo Kolmogorov-Smirnovým testem testováno, zda data mají normální rozložení.

Na základě těchto výsledků byla data prvního pokusu vyhodnocena parametrickým testem ANOVA nebo neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem. Rozdíly mezi kontrolní skupinou v normoxii a skupinami vystavenými CNH byly porovnány následným posttestem: Dunnettovým parametrickým testem nebo Dunnovým neparametrickým testem.

Data druhého pokusu (IHH) o dvou skupinách byla na základě svého rozložení vyhodnocena parametrickým T-testem nebo neparametrickým Mann-Whitneyho testem.

Výsledky všech testů byly považovány za statisticky významné, pokud byla hladina pravděpodobnosti menší než $p < 0.05$.

5.4. Proteinové analýzy

5.4.1. Homogenizace srdečního svalu pro proteinové analýzy

Vzorky byly rozdrceny v tekutém dusíku ve vychlazené třecí misce s tloučkem na jemný prášek. Rozdrcená srdeční tkáň byla přenesena do předem zvážené 2ml zkumavky se třemi skleněnými kuličkami a 300 μ l homogenizačního média HM1 (viz přílohová část 1). Obsah zkumavky byl okamžitě promíchán na třepačce Vortex a centrifugován. Zkumavka byla znovu zvážena pro určení hmotnosti srdeční tkáně. Do zkumavky bylo přidáno takové množství homogenizačního média HM1, aby konečný poměr média a tkáně byl 8:1. Vzorky byly homogenizovány ve vychlazených kyvetách homogenizátoru (MIXER MM200, Retsch) po dobu 10 minut při frekvenci 30 Hz. Homogenáty byly dále doředěny homogenizačním médiem HM1 na stejnou koncentraci. Aby se docílilo lepší solubilizace proteinů, bylo ke vzorkům v poměru 1:1 přidáno homogenizační médium s vysokým obsahem močoviny HM2 (viz přílohová část 1). Takto upravené vzorky byly označeny jako zásobní a byla v nich změřena koncentrace proteinů. Část z každého zásobního vzorku byla pak naředěna na koncentraci 4 μ g proteinu/ μ l směsí homogenizačních médií HM1 a HM2 v poměru 1:1, rozdělena do mikrozkušavek a uchována k dalšímu zpracování v -80 °C. Pro přípravu veškerých roztoků byla použita deionizovaná voda.

5.4.2. Stanovení proteinů

Koncentrace proteinů v homogenátech byla stanovena podle Bradfordové komerčním setem (Bio-Rad). Měření probíhalo v přístroji Varioscan (Thermo Scientific) na 96- jamkové mikrotitrační destičce typu P (Gama, s.p.) Kalibrační křivka byla tvořena roztoky o koncentracích 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 μ g/ μ l rozředěných ze zásobního roztoku hovězího sérového albuminu (2 mg/ml, Bio-Rad). Pro měření bylo malé množství homogenátů naředěno vodou přibližně na koncentraci 0,5 μ g/ μ l. Voda tvořící blank, roztoky kalibrační křivky a naředěné vzorky byly nanášeny v objemu 10 μ l na jamku a ponechány inkubovat se s 250 μ l Bradfordového činidla po dobu 10 minut. Následně bylo provedeno spektrofotometrické stanovení absorbance při vlnové délce 595 nm. Všechny vzorky byly měřeny v triplicátech.

5.4.3. Detekce proteinů metodou Western blotting

Proteiny v homogenátu byly nejprve rozděleny podle své molekulové hmotnosti elektroforézou v polyakrylovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). Z gelu byly následně převedeny v elektrickém poli na nitrocelulóзовou membránu, na které byly identifikovány specifickou protilátkou za následujících podmínek:

5.4.4. Příprava vzorku pro elektroforézu

Vzorky o koncentraci proteinů 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ byly ředěny na finální koncentraci 2,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Laemmliho pufru (4x Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad). K pufru byl vždy čerstvě přidán DTT (DL-dithiothreitol, Sigma) do finální koncentrace ve vzorku 50 mM. Vzorky byly poté inkubovány při 100 ° C po dobu 5 min a zchlazeny na pokojovou teplotu. Takto byly připraveny k nanesení na gel.

5.4.5. Elektroforéza

Elektroforéza byla provedena s vyžitím systému Mini PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad). Polyakrylový gel o tloušce 1 mm byl tvořen 12% separačním a 5 % zaostřovacím gelem s 15 jamkami (složení uvedeno v přílohové části). Vzorky byly nanášeny v množství 21 μg /7,5 μl proteinu na jamku. Elektroforéza probíhala v elektrodovém pufru (viz přílohová část 1) při pokojové teplotě při konstantním napětí 200 V při maximálně 700 mA po dobu cca 60 min, až čelo vzorků doputovalo na konec gelu.

5.4.6. Přenos proteinů na membránu

Po skončení SDS-PAGE byly proteiny z gelu přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Přenos probíhal v aparatuře Trans-Blot® Turbo™ Transfer System po dobu 30 min při konstantním napětí 25 V a maximálním proudu 1 A s použitím komerčního transferového pufru (Tris/Glycine Buffer, 10x, Bio-Rad) připraveného dle návodu výrobce (viz přílohová část 1)

5.4.7. Blokování nespecifických interakcí

Pro kontrolu nanášky proteinů a úspěšnosti přenosu byly proteiny na nitrocelulózové membráně reverzibilně detekovány barvením Ponceau (viz přílohová část 1), pozadí membrány bylo odbarveno v neionizované vodě. Po detekci proteinů tímto způsobem byla membrána odbarvena v pufru TBS (viz přílohová část 1) a 15 min inkubována v pufru TTBS (viz přílohová část 1). Membrána byla po dobu 1 hodiny inkubována v 5% blokačním pufru (sušené nízkotučné mléko v TTBS) před detekcí proteinu BAX a v 2% blokačním pufru před detekcí proteinu BCL2 a poté třikrát krátce promyta v TTBS, vše při pokojové teplotě.

5.4.8. Detekce

Po zablokování nespecifických interakcí a odmytí blokačního roztoku byly membrány inkubovány s primární protilátkou proti BCL2 (SAB 4500003, SIGMA) nebo s primární protilátkou proti BAX (ab7977, Abcam) ředěnými v poměru 1:1000 v 2 % mléku v TTBS. Inkubace probíhala přes noc při 4 °C, po té byla membrána opět třikrát po 15 min promývána v TTBS. Dále byla membrána inkubována se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (NA934V, GE Healthcare Life Sciences) ředěnou v poměru 1:50 000 po dobu 1h. Membrána byla promyta TBS aplikovaným třikrát po 10 min. Všechny kroky probíhaly při pokojové teplotě. Detekce na principu oxidace luminalu pomocí křenové peroxidázy byla provedena chemiluminiscenční směsí (Supersignal West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific Pierce). Chemoluminiscenční signál na membránách byl detekován v přístroji LAS-4000 (Fujifilm). Detekovaný signál byl následně densitometricky vyhodnocen pomocí kvantifikačního programu Quantity One (BioRad).

5.4.9. Statistické vyhodnocení

Naměřená data měla podle Kolmogorov-Smirnova testu normální rozložení, proto byla statisticky vyhodnocena nepárovým T-testem v programu GraphPad Prism 6. Výsledky všech testů byly považovány za statisticky významné, pokud byla hladina pravděpodobnosti menší než $p < 0.05$.

6. VÝSLEDKY

6.1. Hmotnostní parametry

Určili jsme hmotnosti zvířat a hmotnosti komor myokardu v následujících experimentálních skupinách:

- 1) Kontinuální normobarická hypoxie (CNH): levá (LV) a pravá komora (RV) potkanů vystavených normobarické hypoxii (10% O₂) o délce expozice 4h, 48h, 120h a 21dní.
- 2) Intermitentní hypobarická hypoxie (IHH): levá komora potkanů adaptovaných na hypobarickou hypoxii (7000 m.n.m.) 8 hodin denně, 5 týdnů, 25 expozic.

Tabulka č. 1: Hmotnostní parametry těla potkanů a komor myokardu v průběhu adaptace na kontinuální normobarickou hypoxii

| skupina | N | H4 | H48 | H120 | CH |
|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|---------------|
| BW[g] | 472±11 | 440±7 | 433±9 | 421±15 * | 401±15 * |
| LV[mg]/BW[g] | 1,217±0,041 | 1,271±0,050 | 1,331±0,061 | 1,287±0,064 | 1,276±0,034 |
| RV[mg]/BW[g] | 0,5070±0,019 | 0,5705±0,013 | 0,5382±0,022 | 0,7543±0,028 * | 1,138±0,075 * |

Tabulka ukazuje průměrné hodnoty ± SEM těla potkanů (BW), relativní hmotnost levé komory (LV/BW) a relativní hmotnost pravé komory (RV/BW). N – kontrolní normoxická skupina; H – skupiny vystavené akutní normobarické hypoxii 4, 48 a 120 hodin; CH – chronická 21 denní normobarická hypoxie, * signifikantní rozdíl k N ($p < 0,05$)

Tabulka č. 2: Hmotnostní parametry těla potkanů a komor myokardu po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii

| skupina | N | IHH |
|--------------|--------------|---------------|
| BW [g] | 546±23 | 355±8 * |
| LV[mg]/BW[g] | 1,236±0,052 | 1,642±0,076 * |
| RV[mg]/BW[g] | 0,4850±0,020 | 1,019±0,056 * |

Tabulka ukazuje průměrné hodnoty hmotnosti těla potkanů (BW), relativní hmotnost levé komory (LV/BW) a relativní hmotnost pravé komory (RV/BW) ± SEM. N – kontrolní normoxická skupina; IHH – skupina adaptovaná na intermitentní hypobarickou hypoxii. * značí signifikantní rozdíl ($p < 0,05$)

6.2. Ověření přesnosti čipové analýzy BioMark HD System, Fluidigm pomocí Real time PCR v systému LightCycler 480, Roche Applied Science

Porovnávali jsme statistické výsledky dat ze dvou systémů LightCycler 480, Roche Applied Science (LC Roche) a BioMark HD, Fluidigm (BioMark). Oběma systémy byla v totožných vzorcích měřena exprese genů vztažená k referenčnímu genu *hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferáza (HPRT)*. Data ze systému LC Roche jsou průměrem ze tří měření, v systému BioMark byla exprese měřena v každém vzorku pouze jednou. Pokud některá reakce v systému BioMark selhala, byl daný vzorek vyřazen i ze statistického hodnocení v systému LC Roche. Srovnali jsme statistické výsledky změny exprese genů ve všech experimentálních skupinách pro oba typy hypoxie CNH a IHH.

6.2.1. Kontinuální normobarická hypoxie

Za CNH byla pro srovnání systémů měřena exprese celkem 6 genů v LV a 5 genů v RV. Nejprve bylo Kolmorov-Smirnovým testem testováno, zda data mají normální rozložení. Data byla dále vyhodnocena statistickým testem ANOVA nebo v případě nenormálního rozložení Kruskal-Wallisovým testem. Následnými posttesty byl hodnocen rozdíl v expresi genů mezi skupinami vystavenými hypoxii a kontrolní skupinou v normoxii. V případě normálního rozložení dat byl použit Dunnettův posttest, pro data s nenormálním rozložením Dunnův posttest.

Při porovnání výsledků ze systému LC Roche a BioMark vyšly statistické testy na 5% hladině významnosti odlišně ve dvou případech z jedenácti (tabulka č 3. statistické testy s červeným pozadím). V případě *HIF1α* v RV ukázala signifikantní změnu pouze data ze systému BioMark, naopak v druhém případě byla změna exprese *EGLN3* v LV zaznamenána pouze systémem LC Roche. Posttesty pak odhalily další rozdíly mezi daty z obou systémů měření (tabulka č. 3 růžové pozadí). Stejné výsledky posttestů jsme získali v 6 případech. Ve třech případech se výsledky posttestů měření stejných vzorků systémem LC Roche a BioMark neshodovaly (*HIF2* v LV i RV, *BCL2* v LV). Data z LC Roche ukázala pro tato měření více signifikantních rozdílů, zatímco data ze systému BioMark vykazovala pouze trendy ke změnám. Výsledky statistických testů a posttestů jsou uvedené v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3 Výsledky statistických testů ze systému LC Roche a BioMark čip

| Gen | | Levá komora | | | | | Pravá komora | | | | |
|----------|----------------------|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | | N | H4 | H48 | H120 | 21 DNÍ | N | H4 | H48 | H120 | 21 DNÍ |
| HIF1 | Normální rozložení | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| | Test | ANOVA p-hodnota 0,0015 | | | | | ANOVA p-hodnota 0,2345 | | | | |
| LC Roche | p-hodnota posttestu | | >=0,05 | < 0,05 | < 0,05 | >=0,05 | | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 |
| HIF1 | Normální rozložení | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| | Test | ANOVA p-hodnota 0,0008 | | | | | ANOVA p-hodnota 0,0031 | | | | |
| BioMark | p-hodnota posttestu | | >=0,05 | < 0,05 | < 0,05 | >=0,05 | | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 |
| HIF2 | Normální rozložení | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ne | ano | ano | ano |
| | Test | ANOVA p-hodnota <0,0001 | | | | | Kruskal-Wallis p-hodnota 0,0017 | | | | |
| LC Roche | p-hodnota posttestu | | >=0,05 | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 | | >=0,05 | >=0,05 | < 0,05 | < 0,05 |
| HIF2 | Normální rozložení | ano | ano | ano | ano | ne | ano | ano | ano | ano | ne |
| | Test | Kruskal-Wallis p-hodnota 0,0002 | | | | | Kruskal-Wallis p-hodnota 0,0022 | | | | |
| BioMark | p-hodnota posttestu | | >=0,05 | < 0,05 | >=0,05 | >=0,05 | | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | < 0,05 |
| EGLN3 | Normální rozložení | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| | Test | ANOVA p-hodnota 0,0106 | | | | | ANOVA p-hodnota P<0,0001 | | | | |
| LC Roche | p-hodnota post testu | | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | < 0,05 | | >=0,05 | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 |
| EGLN3 | Normální rozložení | ne | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| | Test | Kruskal-Wallis p-hodnota 0,0741 | | | | | ANOVA p-hodnota P<0,0001 | | | | |
| BioMark | p-hodnota post testu | | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | | >=0,05 | < 0,05 | < 0,05 | < 0,05 |
| BCL2 | Normální rozložení | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ne | ano | ano | ano |
| | Test | ANOVA p-hodnota 0,0149 | | | | | Kruskal-Wallis p-hodnota 0,0500 | | | | |
| LC Roche | p-hodnota post testu | | >=0,05 | >=0,05 | < 0,05 | >=0,05 | | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 |
| BCL2 | Normální rozložení | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ne | ano | ano |
| | Test | ANOVA p-hodnota 0,0436 | | | | | Kruskal-Wallis p-hodnota 0,0643 | | | | |
| BioMark | p-hodnota posttestu | | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 |
| BAX | Normální rozložení | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| | Test | ANOVA p-hodnota 0,3899 | | | | | ANOVA p-hodnota P<0,0001 | | | | |
| LC Roche | p-hodnota posttestu | | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | | >=0,05 | >=0,05 | < 0,05 | < 0,05 |
| BAX | Normální rozložení | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| | Test | ANOVA p-hodnota 0,2153 | | | | | ANOVA p-hodnota P<0,0001 | | | | |
| BioMark | p-hodnota posttestu | | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | | >=0,05 | >=0,05 | < 0,05 | < 0,05 |
| MDM2 | Normální rozložení | ano | ano | ano | ano | ano | | | | | |
| | Test | ANOVA p-hodnota 0,1821 | | | | | | | | | |
| LC Roche | p-hodnota posttestu | | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | | | | | |
| MDM2 | Normální rozložení | ne | ano | ano | ano | ano | | | | | |
| | Test | Kruskal-Wallis p-hodnota 0,0574 | | | | | | | | | |
| BioMark | p-hodnota posttestu | | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | | | | | |

Souhrn výsledků statistických testů. Kolmorov-Smirnovým testem bylo testováno, zda data mají normální rozložení. Data byla dále vyhodnocena statistickým testem ANOVA a v případě nenormálního rozložení Kruskal-Wallisovým testem. Následnými posttesty Dunnettovým parametrickým testem nebo Dunnovým neparametrickým testem byl hodnocen rozdíl v expresi genů mezi skupinami vystavenými hypoxii 4 hodiny (H4); 48 hodin (H48), 120 hodin (H120); 21 dní (CH) a kontrolní skupinou v normoxii (N). Červená barva čísel znázorňuje signifikantní zvýšení exprese oproti normoxii, modrá signifikantní snížení. Červené pozadí mají statistické testy ANOVA a Kruskal - Wallis s rozdílnými výsledky pro data ze systémů BioMark a LC Roche. Růžově jsou podbarvené tabulky, kde se statistické vyhodnocení dat lišilo mezi oběma systémy. HIF (hypoxií indukovaný faktor), EGLN3 (Egl nine homolog 3), BCL2 (B-Cell CLL/Lymphoma 2), BAX (BCL2-asociovaný X protein), MDM2 (mouse double minute 2)

6.2.2. Intermitentní hypobarická hypoxie

V experimentální skupině IHH byla pro účely srovnání obou systémů stanovena exprese 14 genů. Hodnoty relativní exprese genů na úrovni mRNA byly nejprve testovány na normalitu rozložení. Pro statistické vyhodnocení byl použit studentův T-test. V několika případech, kdy hodnoty neměly normální rozložení, byl použit Mann-Whitneyův test. Na hladině významnosti 0,05 vedly oba testy vždy ke stejným závěrům. Ze 14 testovaných genů jsme ve 12 případech dospěli ke stejným statistickým závěrům u obou systémů (LC Roche a BioMark). Signifikantní změna relativní exprese mezi skupinami byla oběma systémy prokázána u 3 genů (*HIF1 α* , *EGLN3* a *CASP3*) a 9 genů se po adaptaci významně nelišilo vzhledem ke kontrole (tabulka č 4). Statistické výsledky exprese dvou genů nebyly v souladu u LC Roche RT-PCR a čipové analýzy BioMark. Systém LC Roche zaznamenal u genů *MFN1* a *MFN2* signifikantní snížení exprese. Čipová analýza ukázala v těchto případech také trend k poklesu, ovšem nebyl signifikantní.

Tabulka č. 4. Výsledky statistických testů ze systému LC Roche a BioMark

| Gen | LC Roche | | BioMark čip | |
|--------------------------------|-------------------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| | p-hodnoty statistických testů | | | |
| | T-test | Mann Whitney | T-test | Mann Whitney |
| HIF1α | 0,0039 | | P<0.0001 | |
| HIF2α | 0,6847 | | 0,6148 | |
| EGLN3 | 0,0041 | 0,0043 | P<0.0001 | |
| MDM2 | 0,3343 | | 0,6978 | |
| BCL2 | 0,5952 | | 0,3852 | |
| BAX | 0,4585 | 0,5190 | 0,2457 | |
| CASP3 | 0,0193 | | 0,0053 | |
| HK1 | 0,5593 | | 0,9348 | |
| HK2 | 0,9008 | 1,000 | 0,3199 | |
| MFN1 | 0,0371 | | 0,2594 | 0,3290 |
| MFN2 | 0,0392 | | 0,1401 | |
| DRP1 | 0,5766 | | 0,3195 | |
| TXN1 | 0,9742 | | 0,2170 | |
| OPA1 | 0,1885 | 1,000 | 0,1979 | 0,9307 |

Souhrn výsledků statistických testů. Rozdíly mezi skupinami N a IHH byly hodnoceny parametrickým T-testem a neparametrickým Mann-Whitneyovým testem v případě, že Kolmogorov-Smirnovův test neukázal normální rozložení dat. Červená barva znázorňuje signifikantní zvýšení exprese oproti normoxii modrá signifikantní snížení. HIF (hypoxií indukovaný faktor α), EGLN3 (Eglnine homolog 3), MDM2 (mouse double minute 2), BCL2 (B-Cell CLL/Lymphoma 2), BAX (BCL2-asociovaný X protein), CASP3 (caspase 3), HK (hexokináza), MFN (mitofusin), DRP1 (dystrophinrelated protein 1), TXN1 (thioredoxin), OPA1 (optocatrophy).

Ve většině případů se statistické výsledky dat z obou systémů LightCycler 480, Roche Applied Science (LC Roche) a BioMark HD, Fluidigm (BioMark) shodovaly. Proto budou v nadcházejících oddílech prezentovány výsledky pocházející převážně z čipové analýzy systémem BioMark.

6.3. Exprese vybraných genů apoptotických drah a metabolismu sfingolipidů v průběhu adaptace na kontinuální normobarickou hypoxii

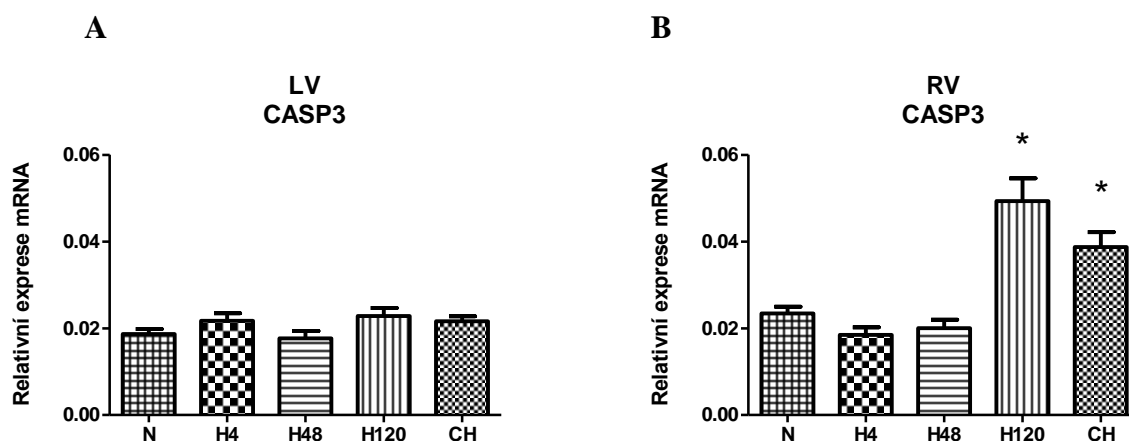
Byla měřena exprese mRNA vybraných genů zapojených v regulaci apoptózy nebo metabolismu sfingolipidů. Byl srovnán akutní vliv kontinuální normobarické hypoxie (CNH) o délce expozice 4 hodiny, 48 hodin a 120 hodin a vliv chronické normobarické hypoxie trvající 21 dní v LV a RV myokardu potkana. Měření byla provedena čipovou analýzou systémem BioMark a v případě genů *CASP8*, *CERK* a *SPHK* byla provedena na systému LC Roche.

6.3.1. Geny apoptotických drah

Kaspáza 3

Efektorová kaspáza 3 (CASP3) je aktivovaná oběma apoptotickými cestami, vnější – přes receptor smrti a vnitřní mitochondriální. 120 hodinová a chronická 21 denní expozice CNH vedly ke zvýšení exprese mRNA kaspázy 3 v RV. V LV nebyly zaznamenány signifikantní změny.

Graf č. 1: Relativní exprese mRNA kaspázy 3

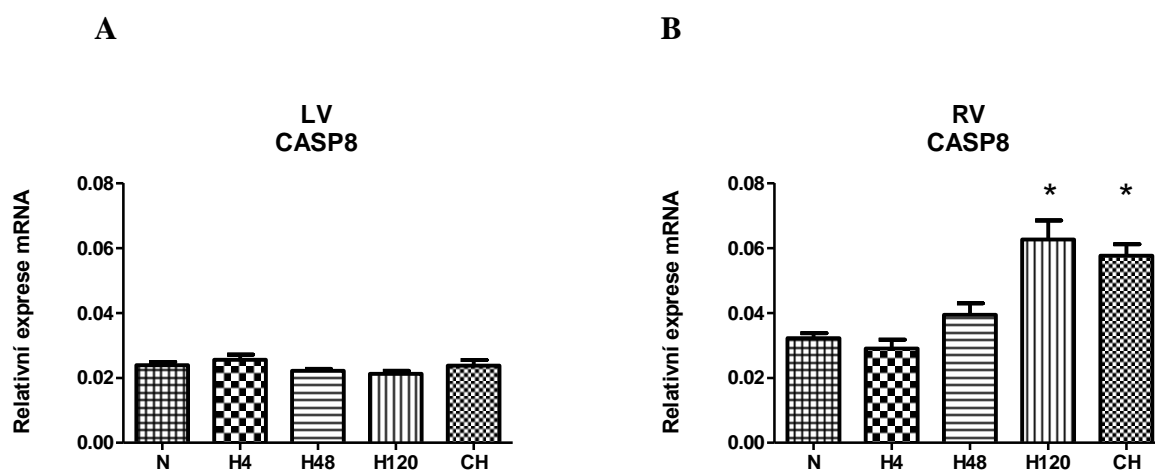


Relativní exprese mRNA transkriptu genu *CASP3* (kaspáza 3) vztahovaná k referenčnímu genu *HPRT* (hypoxantin-guaninfosforibosyltransferáza) v levé komoře (LV) a v pravé komoře (RV) myokardu potkana. N – kontrolní normoxická skupina; H – skupiny vystavené akutní normobarické hypoxii 4, 48 a 120 hodin; CH – chronická 21 denní normobarická hypoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SEM, * signifikantní rozdíl k N ($p < 0,05$)

Kaspáza 8

Kaspáza 8 (CASP8) je aktivovaná signálem přenášeným přes receptory smrti plazmatické membrány a je schopná štěpit a aktivovat efektorové kaspázy. Je tedy součástí vnější apoptotické dráhy. Expze kaspázy 8, stejně jako kaspázy 3, je zvýšená v RV po 120 hodinové a 21 denní expozici CNH, jak lze pozorovat na grafech č. 1B a 2B

Graf č. 2: Relativní expze mRNA kaspázy 8

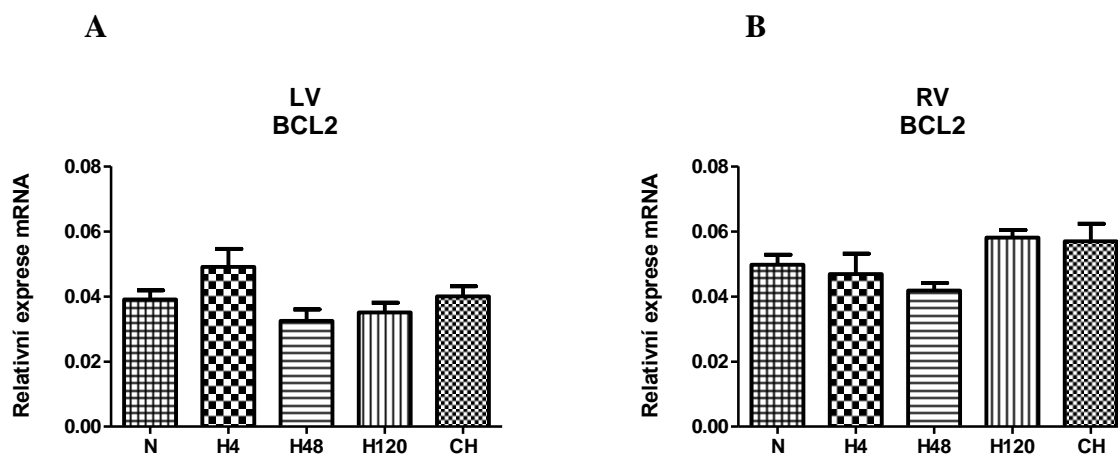


Relativní expze mRNA transkriptu genu *CASP8* (kaspáza 8) vztažená k referenčnímu genu *HPRT* (hypoxantin-guaninfosforibosyltransferáza) v levé komoře (LV) a v pravé komoře (RV) myokardu potkanů. N – kontrolní normoxická skupina; H – skupiny vystavené akutní normobarické hypoxii 4, 48 a 120 hodin; CH – chronická 21 denní normobarická hypoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SEM, * signifikantní rozdíl k N ($p < 0,05$)

B-Cell CLL/Lymphoma 2

Graf č. 3 ukazuje, že se relativní exprese mRNA antiapoptotického proteinu BCL2 (B-Cell CLL/Lymphoma 2) za žádných sledovaných podmínek v CNH signifikantně neliší od exprese u normoxické kontroly.

Graf č. 3: Relativní exprese mRNA B-Cell CLL/Lymphoma 2

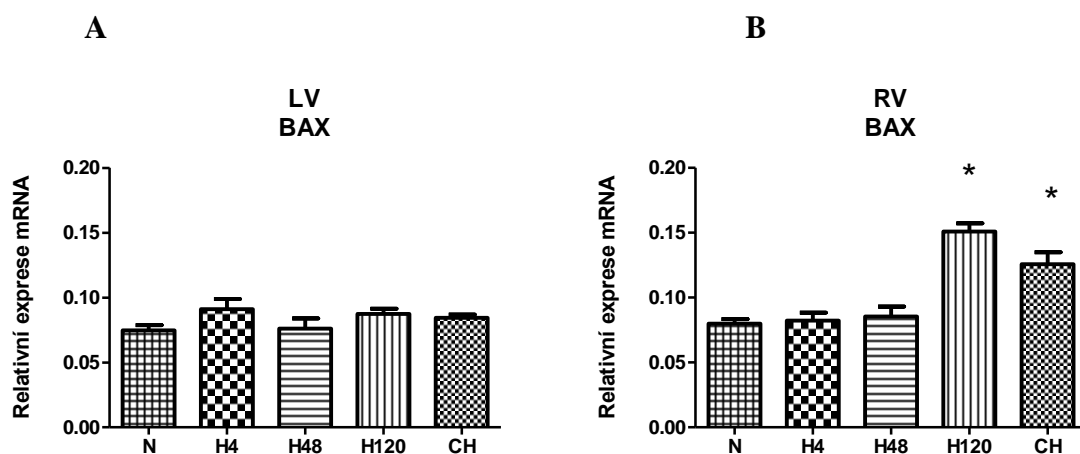


Relativní exprese mRNA transkriptu genu BCL2 (B-Cell CLL/Lymphoma 2) vztahená k referenčnímu genu HPRT (hypoxantin-guaninfosforibosyltransferáza) v levé komoře (LV) a v pravé komoře (RV) myokardu potkanů. N – kontrolní normoxická skupina; H – skupiny vystavené akutní normobarické hypoxii 4, 48 a 120 hodin; CH – chronická 21 denní normobarická hypoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SEM, rozdíl k N hodnocen na hladině významnosti ($p < 0,05$)

BCL2-asociovaný X protein

Protein BAX (BCL2-asociovaný X protein) po aktivaci oligomerizuje ve vnější mitochondriální membráně a vytváří v ní pór, kterým se z mitochondrií uvolní apoptogenní faktory. V RV lze pozorovat nárůst relativní exprese genu *BAX* na úrovni mRNA po 120 hodinové a chronické 21 denní adaptaci na CNH (graf č. 4).

Graf č. 4: Relativní exprese mRNA *BCL2* asociovaného proteinu

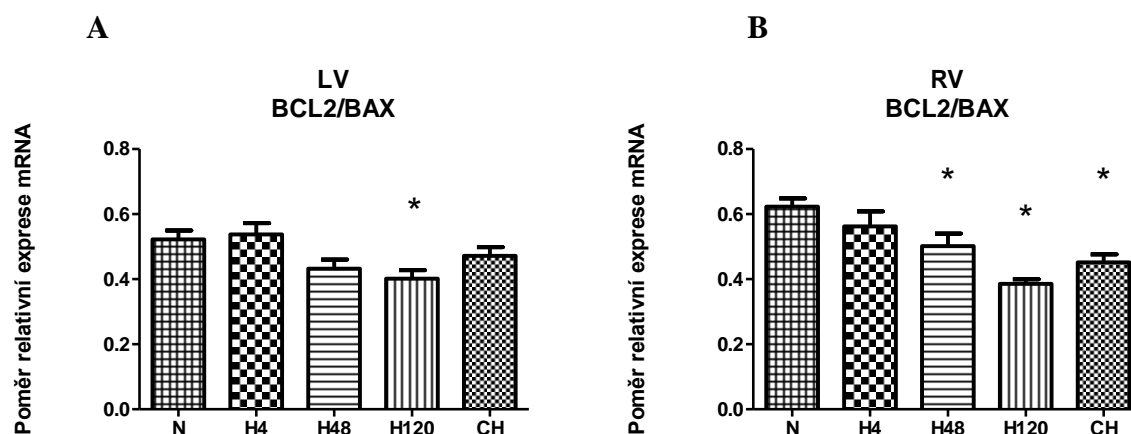


Relativní exprese mRNA transkriptu genu *BAX* (BCL2-asociovaného X protein) vztažená k referenčnímu genu *HPRT* (hypoxantin-guaninfosforibosyltransferáza) v levé komoře (LV) a v pravé komoře (RV) myokardu potkanů. N – kontrolní normoxická skupina; H – skupiny vystavené akutní normobarické hypoxii 4, 48 a 120 hodin; CH – chronická 21 denní normobarická hypoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SEM, * signifikantní rozdíl k N ($p < 0,05$)

Poměr exprese mRNA genů BCL2/BAX

Poměr exprese genů *BCL2/BAX* je využíván jako indikátor aktivace apoptotických signálních drah. Snížený poměr, který odráží proapoptotické tendence, lze pozorovat po 120 hodinové expozici CNH v LV a po 48 hodinové, 120 hodinové a 21 denní expozici hypoxii v RV myokardu.

Graf č. 5: Poměr exprese mRNA genů BCL2 a BAX



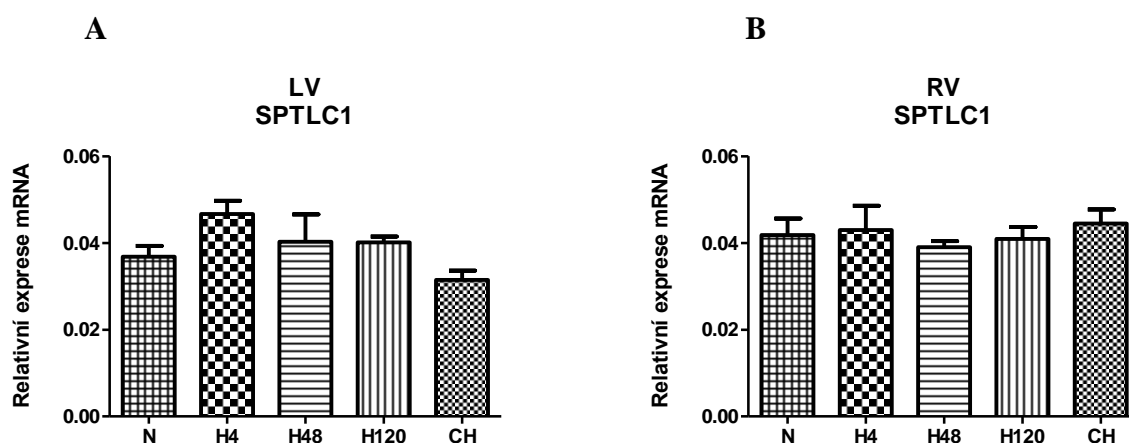
Poměr exprese mRNA transkriptů genů *BCL2* (B-Cell CLL/Lymphoma 2) a *BAX* (BCL2-asociovaného X protein) v levé komoře (LV) a v pravé komoře (RV) myokardu potkanů. N – kontrolní normoxická skupina; H – skupiny vystavené akutní normobarické hypoxii 4, 48 a 120 hodin; CH – chronická 21 denní normobarická hypoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SEM, * signifikantní rozdíl k N ($p < 0,05$)

6.3.2. Geny metabolismu sfingolipidů

Serinpalmitoyltransferáza, podjednotka1

Serinpalmitoyltransferáza je heterodimer podjednotek SPTLC1 a SPTLC2 (serine palmitoyltransferase, long chain base subunit). Tento enzym katalyzuje první reakci – jediný vstupní bod pro syntézu sfingolipidů *de novo*. Relativní exprese podjednotky *SPTLC1* se na úrovni mRNA signifikantně nemění v žádném sledovaném intervalu během adaptace na CNH.

Graf č. 6: Relativní exprese mRNA *SPTLC1* podjednotky serinpalmitoyltransferázy

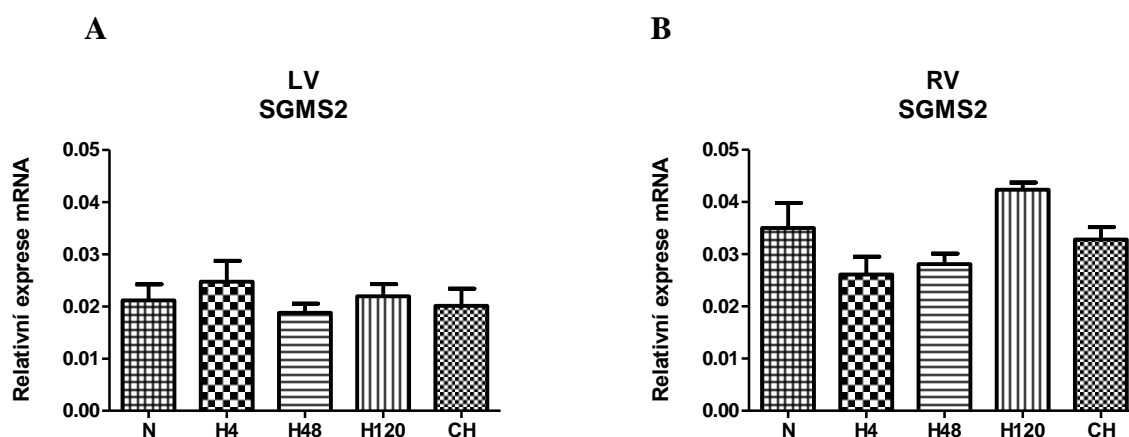


Relativní exprese mRNA transkriptu genu podjednotky *SPTLC1* serinpalmitoyltransferázy vztahovaná k referenčnímu genu *HPRT* (hypoxantin-guaninfosforibosyltransferáza) v levé komoře (LV) a v pravé komoře (RV) myokardu potkanů. N – kontrolní normoxická skupina; H – skupiny vystavené akutní normobarické hypoxii 4, 48 a 120 hodin; CH – chronická 21 denní normobarická hypoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SEM, rozdíl k N hodnocen na hladině významnosti ($p < 0,05$)

Sfingomyelinsyntáza 2

Sfingomyelinsyntáza 2 (SGMS2) je dalším enzymem syntetické dráhy sfingolipidů. Katalyzuje připojení fosfocholinu z fosfatidylcholinu na ceramid. Z ceramidu tak vzniká sfingomyelin a z fosfatidylcholinu diacylglycerol. V LV ani v RV nebyla zaznamenána žádná signifikantní změna relativní exprese *sfingomyelinsyntázy 2* (SGMS2) mezi potkany vystavenými CNH a kontrolní normoxickou skupinou.

Graf č. 7: Relativní exprese mRNA *sfingomyelinsyntázy 2*

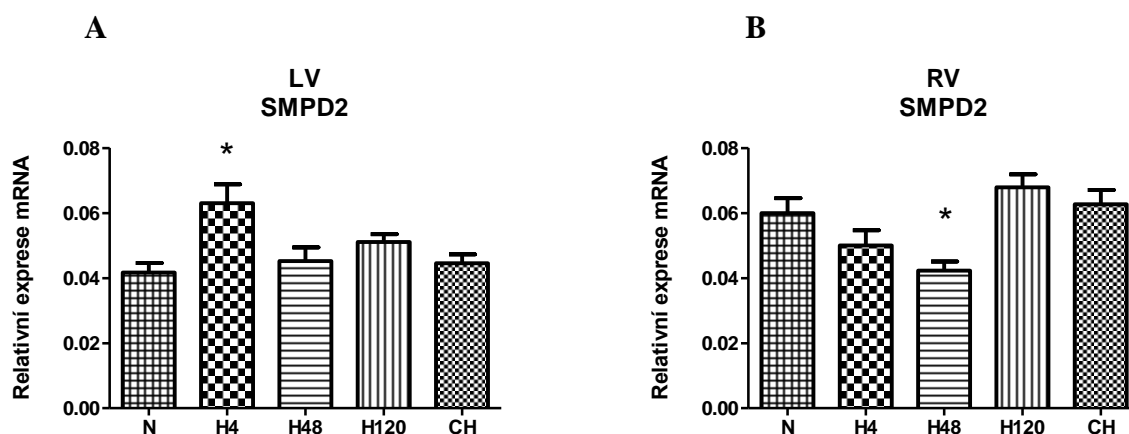


Relativní exprese mRNA transkriptu genu *SGMS2* (*sfingomyelinsyntáza 2*) vztahovaná k referenčnímu genu *HPRT* (*hypoxantin-guaninfosforibosyltransferáza*) v levé komoře (LV) a v pravé komoře (RV) myokardu potkanů. N – kontrolní normoxická skupina; H – skupiny vystavené akutní normobarické hypoxii 4, 48 a 120 hodin; CH – chronická 21 denní normobarická hypoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SEM, rozdíl k N hodnocen na hladině významnosti ($p < 0,05$)

Sfingomyelinfosfodiesteráza 2

Neutrální sfingomyelináza 1 kódovaná genem *SMPD2* (sfingomyelinfosfodiesteráza 2) katalyzuje přeměnu sfingomyelinu na ceramid, a tak se podílí se na mnohých fyziologických odpovědích buňky – zastavení růstu nebo buněčného cyklu, apoptóze, rozvoji zánětu. Na grafu č. 8 je patrné, že zatímco se v LV relativní exprese *SMPD2* na úrovni mRNA zvyšuje po 4 hodinové expozice hypoxii, v RV naopak klesá, a to po 48 hodinovém působení CNH.

Graf č. 8: Relativní exprese mRNA sfingomyelin fosfodiesterázy 2

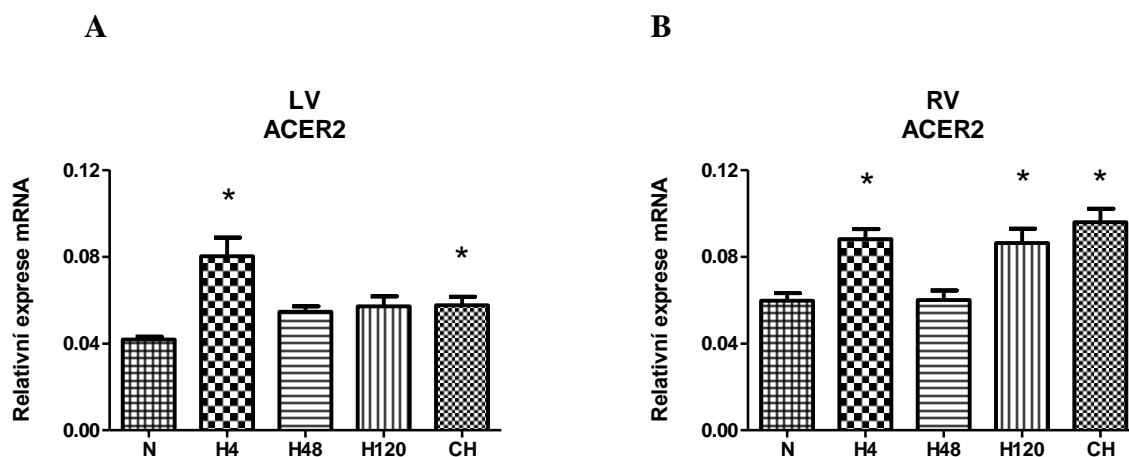


Relativní exprese mRNA transkriptu genu *SMPD2* (sfingomyelinfosfodiesteráza 2) vztahená k referenčnímu genu *HPRT* (hypoxantin-guaninfosforibosyltransferáza) v levé komoře (LV) a v pravé komoře (RV) myokardu potkanů. N – kontrolní normoxická skupina; H – skupiny vystavené akutní normobarické hypoxii 4, 48 a 120 hodin; CH – chronická 21 denní normobarická hypoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SEM, * signifikantní rozdíl k N ($p < 0,05$)

Alkalická ceramidáza 2

V savcích buňkách není sfingosin syntetizován *de novo*, ale vzniká pouze hydrolyzací ceramidu katalyzovanou ceramidázami. Sfingosin ve velkých koncentracích zastavuje buněčný růst a provokuje apoptózu. Mírně zvýšená aktivita ACER2 však může působit protektivně. V LV se relativní exprese mRNA genu *alkalické ceramidázy 2* (ACER2) zvedá po 4 hodinách hypoxie, při delší expozici znovu poklesne, ale jak je vidět na grafu č. 9A, nevrátí se zcela na normoxickou hladinu a znovu dosahuje signifikantního rozdílu po 21 dnech CNH. V RV byl zaznamenán signifikantní nárůst relativní exprese vůči kontrolní normoxické skupině po všech zkoumaných intervalech působení CNH s výjimkou 48 hodin (graf č. 9B).

Graf č. 9: Relativní exprese mRNA alkalické ceramidázy 2

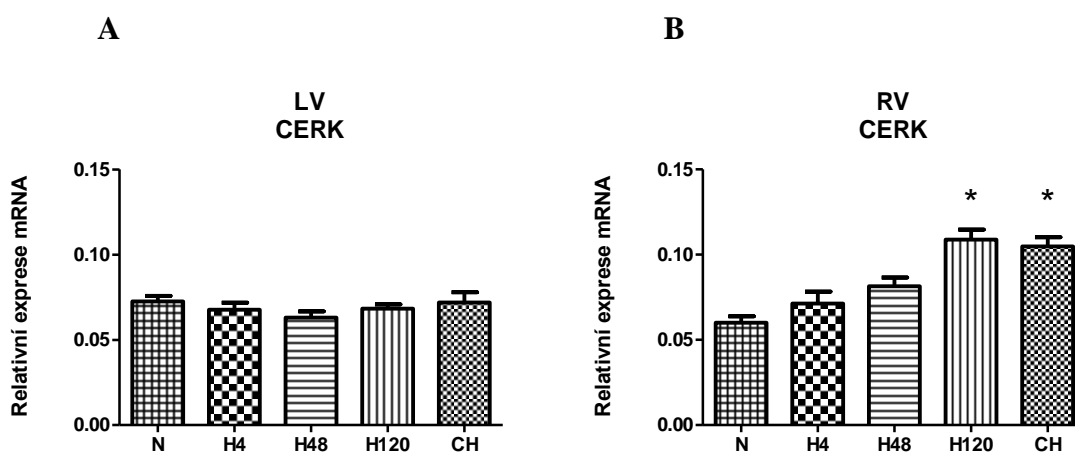


Relativní exprese mRNA transkriptu genu ACER (alkalickáceramidáza) vztažená k referenčnímu genu HPRT (hypoxantin-guaninfosforibosyltransferáza) v levé komoře (LV) a v pravé komoře (RV) myokardu potkanů. N – kontrolní normoxická skupina; H – skupiny vystavené akutní normobarické hypoxii 4, 48 a 120 hodin; CH – chronická21 denní normobarická hypoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SEM, * signifikantní rozdíl k N ($p < 0,05$)

Ceramidkináza

Ceramidkináza (CERK) působí proliferačně a brání buněčné smrti. Exprese tohoto enzymu na úrovni mRNA se zvyšuje po 120 hodinové a chronické 21 denní expozici IHH v RV (graf č. 10B).

Graf č. 10: Relativní exprese mRNA ceramidkinázy

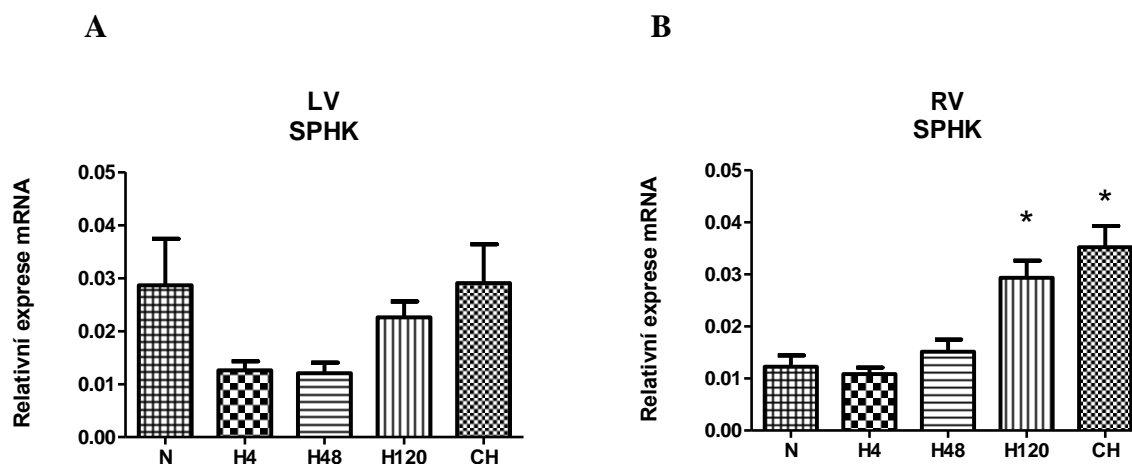


Relativní exprese mRNA transkriptu genu *CERK* (ceramidkináza) vztažená k referenčnímu genu *HPRT* (hypoxantin-guaninfosforibosyltransferáza) v levé komoře (LV) a v pravé komoře (RV) myokardu potkanů. N – kontrolní normoxická skupina; H – skupiny vystavené akutní normobarické hypoxii 4, 48 a 120 hodin; CH – chronická 21 denní normobarická hypoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SEM, * signifikantní rozdíl k N ($p < 0,05$)

Sfingosinkináza

Sledovali jsme expresi obou *sfingosinkináz* (*SPHK 1 a 2*) zároveň v oblasti se společnou sekvencí. Zvláště SPHK1 působí kardioprotektivně a antiapoptoticky. Role SPHK2 není zcela zřejmá. SPHK2 je spojována s vyvoláním apoptózy, ale její delece zvyšovala velikost infarktu při ischemii a reperfúzi myokardu. Také v tomto případě jsme pozorovali nárůst exprese *SPHK 1 a 2* po 120 hodinovém a 21 denním působení CNH. V LV nebyly zaznamenány signifikantní změny.

Graf č. 11: Relativní exprese mRNA *sfingosinkináz*



Relativní exprese úseku mRNA transkriptu společného oběma SPHK (*sfingosinkináza 1 a 2*) vztahená k referenčnímu genu *HPRT* (*hypoxantin-guaninfosforibosyltransferáza*) v levé komoře (LV) a v pravé komoře (RV) myokardu potkanů. N – kontrolní normoxická skupina; H – skupiny vystavené akutní normobarické hypoxii 4, 48 a 120 hodin; CH – chronická 21 denní normobarická hypoxie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SEM, * signifikantní rozdíl k N ($p < 0,05$)

6.3.3. Souhrn výsledků

Pro snadnější orientaci je zde vložena tabulka č. 5, která shrnuje prezentované výsledky exprese genů v kontinuální normobarické hypoxii.

Tabulka č. 5: Souhrnné znázornění relativní exprese mRNA sledovaných genů

| Zkratka | Levá komora | | | | Pravá komora | | | |
|----------|-----------------------------|-----|------|--------|-----------------------------|-----|------|--------|
| | Akutní normobarická hypoxie | | | CH | Akutní normobarická hypoxie | | | CH |
| | H4 | H48 | H120 | 21 DNÍ | H4 | H48 | H120 | 21 DNÍ |
| CASP3 | | | | | | | | |
| CASP8 | | | | | | | | |
| BCL2 | | | | | | | | |
| BAX | | | | | | | | |
| BCL2/BAX | | | | | | | | |
| SPTLC1 | | | | | | | | |
| SGMS2 | | | | | | | | |
| SMPD2 | | | | | | | | |
| ACER2 | | | | | | | | |
| CERK | | | | | | | | |
| SPHK | | | | | | | | |

Byla sledována exprese genů: CASP3 (kaspáza 3), CASP8 (kaspáza 8), BCL2 (B-cell CLL/lymphoma2), BAX (BCL2-associated X protein), SPTLC1 (podjednotka serinpalmitoyltransferázy), SGMS2 (sfingomyelinsyntáza 2), SMPD2 (sfingomyelinfosfodiesteráza 2), ACER2 (alkalická ceramidáza 2), CERK (ceramidkináza), SPHK (sfingsinkinázy).

Červená barva značí signifikatní zvýšení exprese daných genů vůči kontrole, modrá značí signifikantní pokles. N – kontrolní normoxická skupina; H – skupiny vystavené akutní normobarické hypoxii 4, 48 a 120 hodin; CH – chronická 21 denní normobarická hypoxie.

6.4. Exprese vybraných genů apoptotických drah a metabolismu sfingolipidů po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii

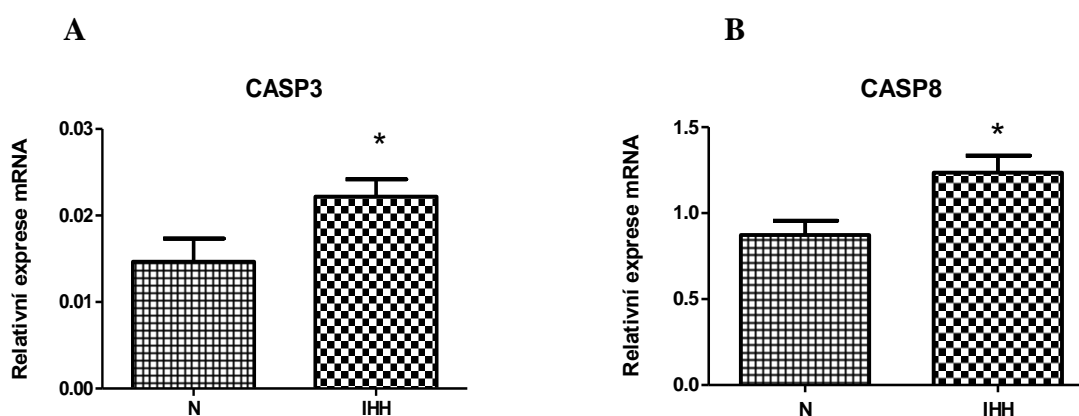
Byl hodnocen vliv intermitentní hypobarické hypoxie (IHH) na expresi vybraných genů zapojených v regulaci apoptózy a metabolismu sfingolipidů v LV myokardu potkana. Měření exprese na úrovni mRNA byla provedena čipovou analýzou systémem BioMark a v případě genů *CASP8*, *CERK* a *SPHK* byla provedena na systému LC Roche.

6.4.1. Geny apoptotických drah

Expresa na úrovni mRNA

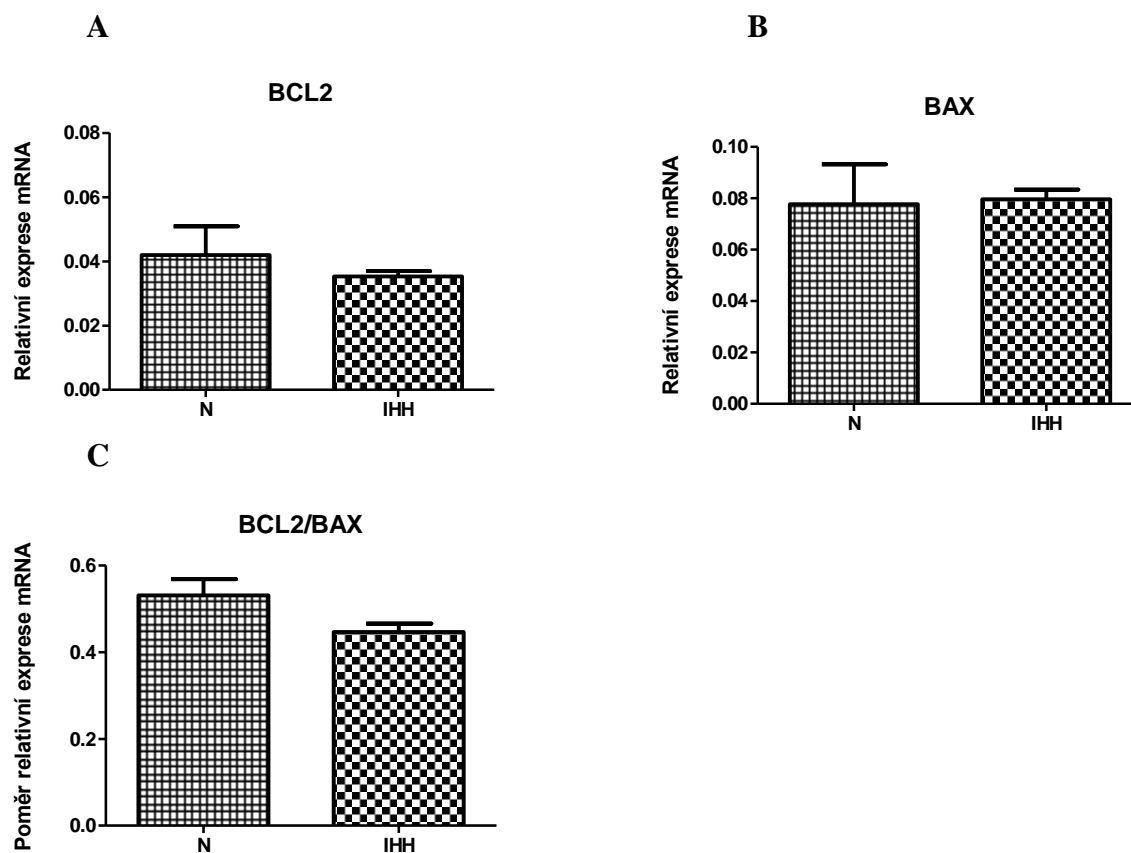
Ze zkoumaných proteinů apoptotické kaskády se signifikantně změnila pouze relativní exprese mRNA genů *kaspázy 3* a *kaspázy 8*. Kaspáza 8 je signální kaspáza vnější apoptotické dráhy. Kaspáza 3, jakožto efektorová kaspáza, může být aktivována vnější i vnitřní apoptotickou drahou. Na úrovni mRNA se exprese obou těchto kaspáz zvyšuje po adaptaci na IHH, což naznačuje aktivaci apoptotické dráhy. Relativní exprese antiapoptotického genu *BCL2* ani proapoptotického *Bax* po adaptaci na IHH nezměnily.

Grafy č. 12: Relativní exprese mRNA *kaspázy 3* a *kaspázy 8*



Relativní exprese mRNA transkriptu genů *CASP3* (*kaspáza 3*) (A) a *CASP8* (*kaspáza 8*) (B) vztažené k referenčnímu genu *HPRT* (*hypoxantin-guaninofosforibosyltransferáza*) v levé komoře myokardu potkanů. N – kontrolní normoxická skupina; IHH – skupina adaptovaná na intermitentní hypobarickou hypoxii. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SEM, * značí signifikantní rozdíl ($p < 0,05$)

Grafy č. 13: Relativní exprese mRNA *B-Cell CLL/Lymphoma 2* a *BCL2*-asociovaného *X* proteinu a jejich poměr

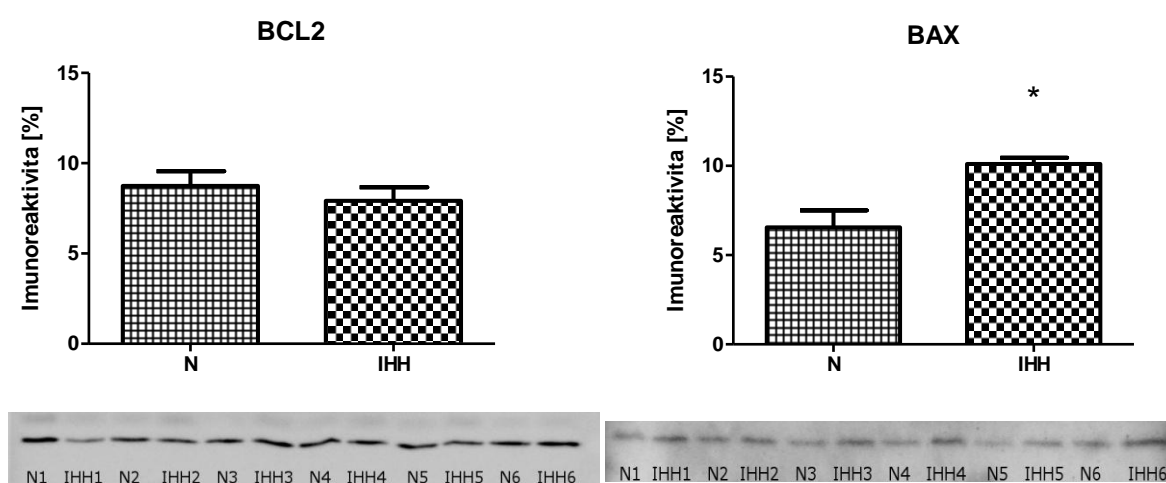


Relativní exprese mRNA transkriptu genu *BCL2* (*B-Cell CLL/Lymphoma 2*) (A), *BAX* (*BCL2*-asociovaného *X* protein) (B) vztážená k referenčnímu genu *HPRT* (*hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza*) v levé komoře myokardu potkanů. Poměr exprese mRNA transkriptů genů *BCL2* a *BAX* v levé komoře myokardu potkanů (C). N – kontrolní normoxická skupina; IHH – skupina adaptovaná na intermitentní hypobarickou hypoxii. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SEM, rozdíl k N hodnocen na hladině významnosti ($p < 0,05$)

Expresa na úrovni proteinu

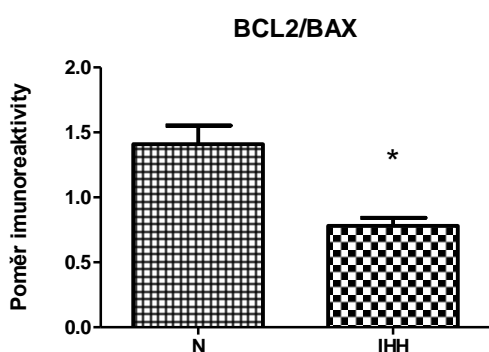
Pro BCL2 a BAX bylo kromě exprese na úrovni mRNA stanoveno i množství proteinu v homogenátu LV (graf č. 14). Ačkoliv se exprese mRNA BCL2 ani BAX významně neměnila, zaznamenali jsme zvýšení množství proapoptického proteinu BAX po adaptaci na IHH. Významné zvýšení proteinu BAX ovlivnilo i poměr proteinů BCL2/BAX, který významně poklesl, jak ilustruje graf č. 14.

Graf č. 14 Expresa proteinu B-Cell CLL/Lymphoma 2 (BCL2) a BCL2-asociovaného X proteinu (BAX)



Expresa proteinu BCL2 (B-Cell CLL/Lymphoma 2) a BAX (BCL2-asociovaného X protein) v levé komoře myokardu potkanů a ukázka signálu na membráně s označením jednotlivých vzorků v nanášce 21 μ g na jamku. N – kontrolní normoxická skupina; IHH – skupina adaptovaná na intermitentní hypobarickou hypoxii. Hodnoty grafu jsou vyjádřeny jako procenta z celkového chemiluminiscenčního signálu 12 vzorků na membráně. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SEM, * značí významný rozdíl ($p < 0,05$)

Graf č. 15 Poměr exprese proteinů BCL2 a BAX

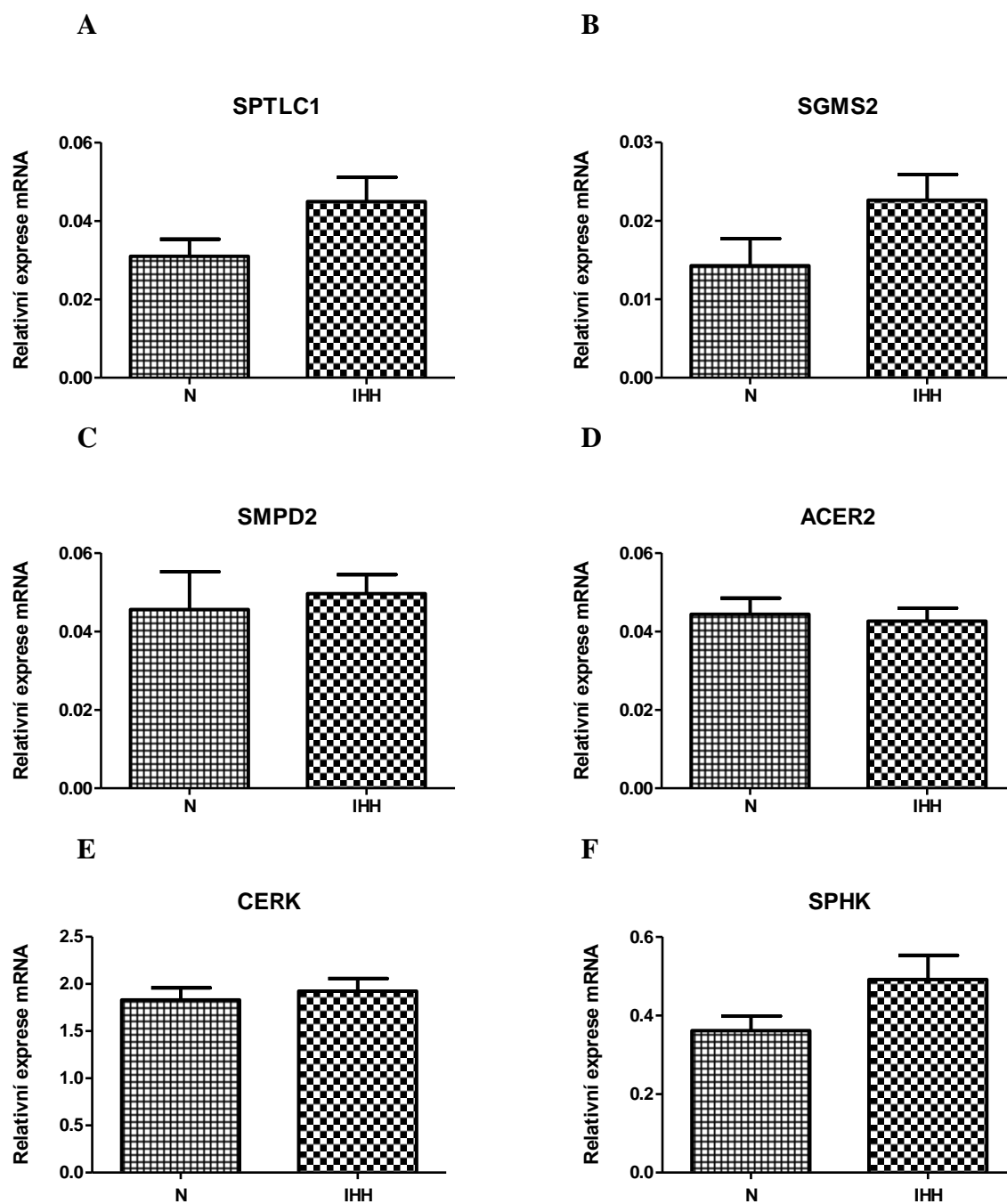


Poměr exprese proteinů BCL2 a BAX v levé komoře myokardu potkanů. N – kontrolní normoxická skupina; IHH – skupina adaptovaná na intermitentní hypobarickou hypoxii. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SEM, * značí významný rozdíl ($p < 0,05$)

6.4.2. Geny metabolismu sfingolipidů

Po adaptaci na IHH jsme v LV na úrovni mRNA nepozorovali signifikantní změnu exprese žádného sledovaného genu metabolismu sfingolipidů. Na grafu č. 16A a B si však lze povšimnout nesignifikantního nárůstu relativní exprese mRNA genů syntetických enzymů: *serinpalmitoyltransferázy*, která zprostředkovává první vstupní reakci při syntéze sfingolipidů, a *sfingomyelinsyntázy*. Za intermitentní hypobarické hypoxie jsme také zaznamenali trend ke zvýšení množství společného transkriptu obou *sfingosinkináz* (*SPHK1* a *SPHK2*).

Grafy č. 16: Relativní exprese mRNA genů metabolismu sfingolipidů



Relativní exprese mRNA transkriptu, vztažená k referenčnímu genu *HPRT* (hypoxantinguanosinofosforibosyltransferáza) v LV myokardu potkanů, pro geny syntetické dráhy sfingolipidů podjednotka *SPTLC1* serinpalmitoyltransferázy (A) a *SGMS2* (sfingomyelinsyntáza 2) (B); genů katabolické dráhy *SMPD2* (sfingomyelinofosphodiesteráza 2) (C) a *ACER2* (alkalické ceramidáza 2) (D); genů kináz *CERK* (ceramidkináza) (E) a *SPHK* (sfingosinkinázy 1 i 2) (F). N – kontrolní normoxická skupina; IHH – skupina adaptovaná na intermitentní hypobarickou hypoxii. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SEM, rozdíl k N hodnocen na hladině významnosti ($p < 0,05$)

7. DISKUZE

7.1. Ověření přesnosti čipové analýzy

V první části práce jsme se zaměřili na porovnání výsledků získaných z čipové analýzy exprese genů v systému BioMark HD, Fluidigm (dále jen BioMark) a výsledků získaných pomocí Real Time PCR systémem LightCycler 480, Roche Applied Science (dále jen LC Roche) na shodných vzorcích cDNA. V systému BioMark probíhá najednou 9216 reakcí, a může tak být stanovena exprese 96 genů v každém z 96 vzorků. Stejně množství reakcí odpovídá 24 destičkám s 384 jamkami, ve kterých by bylo nutné opakované měření referenčního genu, protože se nedá předpokládat, že by reakční podmínky byly na všech destičkách absolutně shodné. Systém BioMark tedy nabízí velkou časovou úsporu, ale i úsporu reagensů a vzorků. Nespornou výhodou čipové analýzy jsou též shodné podmínky pro všechny analyzované geny. I když premamplifikace předcházející čipové analýze by teoreticky mohla vnést do celého procesu jistou proměnlivost. Izolovaná RNA a použitá cDNA podléhá vysokým kvalitativním kritériím, která byla u analyzovaných vzorků ověřena a potvrzena pomocí Agilent Chip. Systém Biomark je pro stanovení genové exprese běžně využíván, pro publikaci je však někdy vyžadováno ověření výsledků čipové analýzy metodou Real time PCR (Korenková ústní sdělení). Nejsm si vědoma, že by existovala studie srovnávající výsledky čipové analýzy v systému BioMark s výsledky Real time PCR v systému LC Roche s použitím SYBR Green pro detekci obecně, ani ve vzorcích srdeční tkáně. Prvním cílem této práce proto bylo ověření přesnosti čipové analýzy BioMark pomocí Real time PCR v systému LC Roche. Statistické výsledky dat získaných z obou systémů byly nejprve porovnány v modelu CNH u 6 genů v LV a 5 genů v RV. V tomto modelu ukázaly statistické testy stejný výsledek u dat z obou systémů v 6 případech z 11. Ve 4 případech ukázala data ze systému LC Roche signifikantní rozdíly tam, kde data ze systému BioMark vykazovala pouze podobné trendy, ale nebylo dosaženo signifikantních změn. Ve zbývajícím jednom případě ukázal signifikantní změnu v expresi pouze systém BioMark. Dále jsme pomocí obou systémů vyhodnocovali změny exprese 14 genů v LV po adaptaci na IHH. Ve 12 případech jsme na základě dat z obou systémů dospěli ke shodným statistickým výsledkům. Ve dvou případech ukázal signifikantní změnu jen LC Roche, avšak data ze systému BioMark měla vždy stejné trendy.

Oběma systémy jsme tak ve více než dvou třetinách měření dospěli ke shodným výsledkům. Pokud se systémy lišily, byla většinou změna exprese zaznamenána systémem

LC Roche (celkem 6x). Pouze jednou ukázal signifikantní změnu systém BioMark tam, kde nebyla doložena pomocí LC Roche. Z mého pohledu je tedy čipová analýza BioMark přesná metoda pro stanovení velkého množství mRNA transkriptů. V případě změn na hranici signifikance, je ale vhodné ověřit výsledky pomocí jiného systému Real time PCR. Rozdíl v přesnosti mezi systémy může být dán teoreticky také tím, že měření v systému LC Roche probíhala v triplikátech, zatímco v systému BioMark byl každý vzorek měřen pouze jednou. Tato varianta ale není příliš pravděpodobná, protože přesnost BioMark systému je ověřena na technických triplikátech (Korenková ústní sdělení) a také při analýze našich vzorků bylo 12 cDNA měřeno v jednom opakování s vysokou přesností (data neuvedena). Je ale nutné zmínit, že z celkového množství 96 genů analyzovaných systémem BioMark bylo 14 vyloučeno z důvodu násobných produktů u křivek tání. A to i přes to, že každý pár primerů byl před čipovou analýzou testován v systému LC Roche a byly zvoleny pouze primery s jedním specifickým produktem a efektivitou blížící se hodnotě 1. Zdá se tedy, že nespecifické produkty v čipové analýze nutně nesouvisely pouze s primery, ale s jiným efektem této metody. Zvláště proto, že se nespecifické produkty objevovaly v některých případech pouze u několika vzorků z experimentální skupiny. Každá cDNA byla pro čipovou analýzu preamplifikována ve dvou krocích. V každém kroku bylo využito jiných 48 párů primerů. Otázkou je, zda byly tyto primery před analýzou dostatečně odstaněny násobným ředěním. V systému BioMark nebyly kvůli úspoře místa stanoveny kalibrační křivky. Pro výpočty jsme na základě předběžných měření na LC Roche použili jednotnou efektivitu pro všechny reakce $E=1$. Toto použití bylo oprávněné vzhledem k tomu, že jsme porovnávali míru exprese genu mezi experimentálními skupinami a neporovnávali jsme míru exprese mezi jednotlivými geny.

7.2. Vliv hypoxie na genovou expresi vybraných proteinů apoptotických drah a metabolismu sfingolipidů

Dále byla sledována exprese vybraných genů apoptotických drah a metabolismu bioaktivních sfingolipidů. Exprese byla stanovena během adaptace na kontinuální normobarickou hypoxii (CNH) v několika časových intervalech (4, 48, 120 hodin a 21 dní) v LV a RV myokardu potkana a po 21 denní adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii (IHH) pouze v LV.

Nejvýraznější změny exprese genů apoptotických drah jsme zaznamenali v RV po 120 hodinách a 21 dnech působení CNH, kdy se zvýšila exprese všech měřených proapoptotických genů: *CASP3*, *CASP8* a *BAX*. Tyto výsledky naznačují, že po 120 hodinách a 21 dnech CNH je v RV aktivovaná jak vnější apoptotická dráha, jejíž součástí je signální *CASP8* (Muzio et al., 1996; Medema et al., 1997), tak vnitřní mitochondriální apoptotická dráha zastoupená *BAX*, který je schopný tvořit pór ve vnější mitochondriální membráně, a tak umožnit uvolnění cytochromu c a dalších apoptogenních faktorů z mitochondrií (Wei et al., 2001; shrnuto v Crow et al., 2004). Efektorová kaspáza 3 je pak aktivovaná oběma apoptotickými drahami a podílí se na proteolytickém rozložení buňky, které doprovází apoptózu (Lakhani, 2006, Scaffidi et al., 1998). Exprese antiapoptotického genu *BCL2* (Oltval et al., 1993) se během adaptace na CNH v RV neměnila ani po jednom ze sledovaných časových intervalů (4, 48, 120 hodin a 21 dní). Množství a aktivita proapoptotických a antiapoptotických proteinů *BCL2* rodiny odráží citlivost buňky na apoptotické stimuly a snížený poměr *BCL2/BAX* vypovídá o proapoptotických tendencích v buňce (Condorelli et al., 1999; Jung et al., 2001; Dong et al., 2003). V RV byl poměr exprese *BCL2/BAX* na úrovni mRNA snížen již po 48 hodinách působení CNH a toto snížení přetrvávalo i po 21 dnech hypoxie. Snížení poměru exprese *BCL2/BAX* jsme zaznamenali také v LV, ale až po 120 hodinové expozici CNH. Žádná další změna exprese sledovaných genů apoptotických drah nebyla v levé komoře během adaptace na CNH pozorována.

Po adaptaci na IHH, která byla dalším sledovaným hypoxickým modelem, se v LV zvýšila exprese genů *CASP3* a *CASP8*. I když na úrovni mRNA nebyl zaznamenán nárůst exprese jiných genů apoptotických drah, na úrovni proteinu se zvyšovala exprese proapoptotického *BAX*, a tím i klesal poměr proteinů *BCL2/BAX*. Tyto výsledky vypovídají o aktivaci apoptotických drah i v LV za podmínek IHH, kdy je srdce déle vystaveno drastičtější hypoxii střídané s normoxií ve srovnání s CNH. Také v tomto případě jsou

zapojeny obě apoptotické dráhy, vnější (CASP8) a vnitřní (BAX). Zdá se proto, že IHH stimuluje v LV silněji proapoptotické dráhy, než je tomu v LV po adaptaci na CNH.

V této práci jsme z časových důvodů nesledovali vliv adaptace na IHH také v RV. Dají se zde ale očekávat výraznější změny exprese genů apoptotických drah než u LV, stejně jako tomu je v RV po adaptaci na CNH. RV je totiž ve srovnání s LV vystavena náročnějším stresovým podmínkám během hypoxie. Za hypoxie se výrazně zvyšuje odpor v plicním oběhu, protože zde pokles O_2 vyvolává vazokonstrikci a později zesílení hladké svaloviny v plicních artériích. Plicní hypertenze tak zvyšuje nároky na výkon RV, která hypertrofuje. Za námi studovaných podmínek dochází k hypertrofii RV při obou modelech hypoxie, IHH i CNH. Hypertrofie LV se rozvíjí až při drastičtějších hypoxických podmínkách při menším parciálním tlaku kyslíku nebo při delší expozici hypoxii (Widimský et al., 1973; Morel et al., 2006). Pokud CNH (10% O_2) působila 30 dní, nastala hypertrofie RV i LV (Neckář et al., 2013). V našem modelu, kdy CNH působila kratší dobu, jsme ovšem zaznamenaly hypertrofii pouze RV, a to po 120h a po 21 dnech. Stejně tak při IHH odpovídající 5000 m. n. m. (4h nebo 8 denně, 25 -30 expozic) byla zaznamenána hypertrofie pouze u RV, zatímco expozice hypoxii odpovídající 7000 m.n.m. vyvolala hypertrofii i u LV (Asemu et al., 2000; Neckář et al., 2002a). Tyto výsledky při hypoxii 7000 m.n.m jsme v naší práci potvrdili. Je známo, že patologická hypertrofie je spojena s aktivací apoptózy. Pokud byla hypertrofie RV navozená přímo podvazem hlavní plicní artérie, po 3 týdnech se zvýšilo množství proapoptotického proteinu BAX, protein BCL2 se neměnil, takže poměr BCL/BAX poklesl. Zároveň se zvýšilo množství aktivované CASP3 (Braun et al., 2003). Tyto změny na úrovni proteinů přesně odpovídají změnám exprese genů na úrovni mRNA, které jsme zaznamenaly v našem modelu CNH v RV. To podporuje náš předpoklad, že zvýšení exprese těchto genů apoptotických drah úzce souvislí s rozvojem plicní hypertenze a srdeční hypertrofií. Při patofyziologické hypertrofii dochází ke zvýšení počtu apoptotických buněk také v LV. Zároveň stoupá množství proteinu BAX, snižuje se exprese proteinu BCL2 a klesá poměr BCL2/BAX (Kong et al., 2005; Krishnan et al., 2009). K podobným výsledkům v LV jsme dospěli v této práci po adaptaci na IHH.

Naše výsledky jsou také v souladu s mnoha studiemi *in vitro*, které ukázaly, že hypoxie vede u kardiomyocytů k aktivaci apoptózy (Tatsumi et al., 2003; Adachi et al., 2001) a upozornily na roli vnitřní (Ekhterae et al., 1999; Moissac et al., 2000) i vnější (Tanaka et al., 1994) apoptotické cesty. Schopnost hypoxie navodit apoptózu byla prokázána také v *in vivo* modelech. Potkani vystavení CNH (10% O_2) po dva (Morel et al., 2006) a tři týdny (Jung et

al., 2001) měli v srdci signifikantně zvýšené množství apoptotických buněk (detekovaných metodou TUNEL). Nárůst apoptózy byl ale zaznamenán už po hodinové expozici hypoxii a přetrvával i po 23h. Po dvou týdnech v CNH však byla aktivace apoptózy sledovaná touto metodou mnohem výraznější (Morel et al., 2006). Po tří týdenní adaptaci byla navíc stanovena i exprese proteinů apoptotických drah. Zvýšené množství apoptotických buněk bylo doprovázeno vzrůstem proapoptického proteinu BAX a poklesem antiapoptického proteinu BCL2 (Jung et al., 2001). Vliv IHH na indukci apoptózy v srdci byl také studován. Potkani byli vystaveni hypoxii odpovídající 5500 m.n.m 8 h denně krátkodobě 1 a 4 dny nebo dlouhodobě po 1 a 2 týdny. Zatímco krátkodobá hypoxie byla provázena nárůstem exprese antiapoptického genu *BCL2* a poklesem exprese proapoptického *BNIP3*, při dlouhodobém působení hypoxie byla exprese *BNIP3* zvýšena a *BCL2* snížena a to ve všech případech jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinu. Aktivace apoptózy ale v tomto případě nebyla ověřena metodou TUNEL (Lee et al., 2006).

Zdá se tedy, že hypoxie vede k aktivaci apoptotických drah a zvyšuje množství apoptotických buněk v srdci. Přesto bylo prokázáno, že adaptace na oba druhy hypoxie CNH (10% O₂ - Neckár et al., 2013) i IHH (8h denně, 24-32 nebo 35 expozic, 7000 m.n.m (Neckár et al., 2002b; Neckár et al., 2004) působí kardioprotektivně tím, že snižuje velikost infarktu při ischemii. Na buněčné smrti při infarktu se podílí také apoptóza (Takashi and Ashraf, 2000; Kajstura et al., 1996). A adaptace na hypoxii může snižovat přímo množství apoptotických buněk při infarktu myokardu (Dong et al., 2003; Xu et al., 2011). Je tedy pravděpodobné, že za hypoxie jsou současně s apoptotickými dráhami aktivovány i protektivní mechanismy, které sice zcela nezabrání aktivaci apoptotických drah při hypoxii, ale projeví se během ischemie, kdy předchozí adaptace může zvyšovat odolnost buněk k apoptóze.

Tento princip je dobře popsán v případě reaktivních forem kyslíku. Za hypoxie stoupá tvorba ROS, které jsou schopné poškodit DNA, proteiny a lipidovou složku buněčných membrán, zároveň ale přispívají k aktivaci protektivních mechanismů a v reakci na ně také stoupá kapacita red/oxsystemu. V naší laboratoři jsme ukázali, že v srdci jsou ROS nezbytné pro aktivaci protektivní kinázy PKC- δ a zvýšení aktivity antioxidantního enzymu MnSOD během adaptace na IHH. Podávání antioxidantu během adaptace na IHH totiž snížilo protektivní účinek adaptace na velikost infarktu a zabránilo aktivaci PKC- δ i nárůstu aktivity MnSOD (Kolář et al., 2007; Balková et al., 2011).

V této práci jsme se dále zaměřili na sledování exprese vybraných enzymů metabolismu sfingolipidů. Sfingolipidy mají důležitou strukturní funkci v buněčných membránách, ale jsou to také bioaktivní molekuly, které mohou chránit buňku před apoptózou nebo naopak apoptózu aktivovat. Naše výsledky naznačují, že některé sfingolipidy by mohly být součástí protektivních mechanismů aktivovaných během hypoxie a mohly by působit jako proti váha proapoptotických signálů.

Expresi všech proapoptotických genů, které jsme měřili (*CASP3*, *CASP8* a *BAX*), je zvýšená v RV po 120h a 21 dnech působení CNH. Současně jsme ale v těchto expozicích zaznamenaly zvýšení exprese sfingosinkináz a ceramidkinázy. Tyto enzymy působí protektivně a brání apoptóze. V LV, kde se během CNH nezvyšuje exprese proapoptotických genů, jsme podobně nepozorovali změnu exprese žádné z těchto kináz, které produkují protektivní sfingolipidy. Sfingosinkinázy (SPHK1 a SPHK2) fosforylují sfingosin a vzniká sfingosin-1-fosfát (S1P). Role S1P při ochraně srdečních buněk za hypoxie i ischemie a reperfúze byla mnohokrát prokázána jak při *in vitro* studiích s cardiomyocyty (Karlner et al., 2001; Zhang et al., 2007; Vessey et al., 2009b), tak na izolovaných srdcích (Jin et al., 2007; Duan et al., 2007) S1P je uvolňován cardiomyocyty během conditioningu a stejně jako další látky, které zprostředkují účinek preconditioningu a postconditioningu, se váže na membránové receptory spřažené s G-proteiny. V srdci se nacházejí tři z celkových pěti specifických S1P receptorů, S1P₁, S1P₂ a S1P₃ (Mazurais et al., 2002). A bylo prokázáno, že blokace S1P₁ a S1P₃ snižuje kardioprotektivní účinky preconditioningu (Vessey et al., 2009b). Zatímco úloha při tvorbě S1P během conditioningu je připisována především SPHK1 (Jin et al., 2007; Duan et al., 2007), role SPHK2 v kardioprotekci zůstává kontroverzní. Na jednu stranu bylo ukázáno, že SPHK2 podporuje apoptózu, interaguje s antiapoptotickým BCL-xL, který zřejmě blokuje (Liu et al., 2003) a snížení exprese *SPHK2* zvyšuje odolnost buněk vůči apoptóze (Chipuk et al., 2012). Na druhou stranu myši bez *SPHK2* měly po ischemii a reperfúzi zasaženou větší oblast srdce infarktem a preconditioning u nich velikost infarktu nezmenšil (Vessey et al., 2011; Gomez et al., 2011). Také se liší údaje o tom, která ze sfingosinkináz je v srdci dominantní (Fukuda et al., 2003; Liu et al., 2000), což může být dané tím, že se jejich poměr mění s věkem (Vessey et al., 2009a). Z těchto důvodů jsme se rozhodli stanovit expresi obou sfingosinkináz najednou. Stanovili jsme množství transkriptu v oblasti, kde mají obě kinázy stejnou sekvenci. V budoucnu chceme sledovat expresi obou kináz odděleně, a určit tak jejich podíl na pozorované změně exprese v RV po 120 h a 21 dnech CNH.

Současně se sfingosinkinázami vzrostla exprese také ceramidkinázy, která z ceramidu tvoří ceramid-1-fosfát (C1P). Role C1P v srdci zatím není příliš studovaná, každopádně v jiných buněčných typech C1P stejně jako S1P brání apoptóze, stimuluje syntézu DNA a dělení buněk (Gomez-Muñoz et al., 1995; Gómez-Muñoz et al., 2004). Také aktivuje signální dráhu, v důsledku které se zvyšuje exprese antiapoptotického *BCL-xL* (Gómez-Muñoz et al., 2005).

Dalším enzymem, jehož exprese je také zvýšená v RV po 4h, 120h a 21 dnech působení CNH je ACER2. Exprese tohoto enzymu se zvyšuje i v LV a to po 4 h a 21 dnech CNH. ACER2 je alkalická ceramidáza štěpící ceramid na sfingosin. Snižuje tedy v buňce koncentraci ceramidu, který přispívá k aktivaci apoptózy (Esen et al., 2001; Grassmé et al., 2003; Siskind et al., 2006; Ganesan et al., 2010; Heinrich et al., 2004). Množství ceramidu se také zvyšuje během ischemie a reperfuze (Bielawska et al., 1997). Jeho úloha v buněčné smrti byla potvrzena prací, která ukázala, že snížení hladiny ceramidu mělo podobný efekt jako protektivní preconditioning (Argaud et al. 2004). Podobně proapoptoticky, ale ve vyšších koncentracích působí i sfingosin, který však v nízkých koncentracích působí protektivně (Vessey et al., 2008a; Vessey et al., 2008b; Vessey et al., 2009a). Bylo publikováno, že velký nárůst aktivity ACER2 (20x) vedl ke smrti HeLa buněk. Ovšem pokud aktivita vzrostla jen mírně (5x), zvýšilo se přežití buněk po stresu. ACER2 neovlivňovala jen hladinu sfingosinu, ale podstatně se zvýšilo i množství S1P (Xu et al., 2006). Protože sfingosin působí na rozdíl od ceramidu ve fyziologických koncentracích protektivně, a protože v našem případě zvýšení exprese ACER2 bylo mírné, můžeme předpokládat, že by ACER2 mohla pozitivně ovlivňovat přežívání buněk a být součástí protektivních mechanismů aktivovaných během adaptace na CNH.

V průběhu adaptace na CNH jsme zaznamenali změny exprese ještě dalšího enzymu – SMPD2. SMPD2 je jedna ze tří neutrálních sfingomyelináz (nSMase), které štěpí sfingomyelin na ceramid. Sfingomyelinázy tedy zvyšují množství proapoptotického ceramidu, a tak i citlivost buňky na apoptotické stimuly (Luberto et al., 2002; Chipuk et al., 2012). Aktivita nSMase stoupala, stejně jako hladiny ceramidu, v cardiomyocytech krátce po hypoxii a reoxygenaci (Hernandez et al., 2000; O'Brien et al., 2003). Zjistili jsme, že exprese *SMPD2* narostla v LV po 4h působení CNH a naopak klesla v RV po 48h CNH. Tyto změny exprese nelze v kontextu měřených genů jednoduše vysvětlit. V LV by *SMPD2* mohla vytvářet substrát pro další reakci katalyzovanou ACER2 (která také narůstá po 4h hypoxii), a přispívat ke zvýšení množství protektivních druhů sfingolipidů. To by ale odporovalo její roli při

aktivaci apoptózy Pokles SMPD2 je jediná změna v expresi, kterou jsme zaznamenali mezi všemi měřenými proteiny v obou komorách po 48h hypoxii. Je možné, že souvisí s expresí některých z proteinů metabolismu sfingolipidů nebo apoptotických drah, které jsme v této práci nesledovali. V indukci apoptózy hraje roli také kyselá sfingomyelináza (Charruyer et al., 2005; Grassmé et al., 2005; Esen et al., 2001; Grassmé et al., 2003), bylo by zajímavé porovnat její expresi s expresí SMPD2.

V RV ani LV jsme během adaptace na hypoxii nezaznamenali změnu dvou enzymů metabolismu sfingolipidů. Jedná se o SPTLC1 a SGMS2. Oba enzymy katalyzují syntetické reakce. SPTLC1 je jednou z podjednotek dimeru serinpalmitoyltransferázy, která katalyzuje první, rychlost limitující, reakci při syntéze sfingolipidů a ovlivňuje nárůst ceramidu a apoptózy (shrnuto v Hanada, 2003). Druhým enzymem je sfingomyelinsyntáza. Katalyzuje reakci ceramidu s fosfatidylcholinem, jejímiž produkty jsou sfingomyelin a diacylglycerol. Role sfingomyelinsyntázy v apoptóze není jednoznačná. Podle publikací může snížení její exprese snižovat (Ding et al., 2008) i zvyšovat (Separovic et al., 2008) apoptózu.

Přestože je po adaptaci na IHH v LV zvýšená exprese proapoptotických genů (*CASP3* a *CASP8* na úrovni mRNA, *BAX* na úrovni proteinu), neměnila se zde signifikantně exprese žádného ze sledovaných enzymů sfingolipidového metabolismu. Protektivní úlohu sfingolipidů v LV po adaptaci na IHH, ale nelze úplně vyloučit. Pozorovali jsme trend k nárůstu exprese *SPTLC1*, *SGMS2* a *SPHK*, což by mohlo svědčit o zvýšené syntéze sfingomyelinu, který by mohl být katabolizován až na kardioprotektivní S1P.

7.3. Souhrn

Čipovou analýzou exprese genů systémem BioMark HD, Fluidigm jsme dospěli k výsledkům srovnatelným s výsledky Real time PCR v systému systémem LightCycler 480, Roche Applied Science

V RV se během adaptace na CNH po 120h a 21 dnech zvýšila exprese CASP3, CASP8, BAX, CERK a SPHK. Exprese ACER2 byla zvýšená po 4h, 120h a 21 dnech. Poměr exprese BCL2/BAX se snížil po 48h, 120h a 21 dnech CNH. Exprese SMPD2 byla snížena po 48h působení CNH.

Během adaptace na CNH se v LV na úrovni mRNA zvýšila exprese SMPD2 a ACER2 po 4h, exprese ACER2 se zvýšila i po 21 dnech CNH. Po 120h CNH v LV se snížil poměr exprese BCL2/BAX.

Po adaptaci na IHH byla v LV zvýšená exprese CASP3 a CASP8 na úrovni mRNA a BAX na úrovni proteinu. Poměr proteinů BCL2/BAX se snížil.

8. ZÁVĚR

Naše výsledky ukazují, že v srdci adaptovaném na oba typy hypoxie, CNH a IHH, dochází k aktivaci apoptotických drah, což dokládá snížení poměru BCL2/BAX. Potvrdili jsme tedy, že za podmínek, kdy hypoxie indukuje v srdci protektivní dráhy, může být zvýšená exprese proapoptotických proteinů. Jako protiváha proapoptotických signálů by však mohly působit protektivní sfingolipidy, protože jsme ukázali, že se zvyšuje exprese enzymů, které je syntetizují. Jejich produkce záleží na typu hypoxie, na délce jejího trvání a také záleží, zda jde o RV, nebo LV. Objasnění přesné úlohy apoptózy a signálních molekul sfingolipidů v endogenní protekci myokardu však vyžaduje další výzkum.

9. LITERATURA

- Adachi, S., Ito, H., Tamamori-Adachi, M., Ono, Y., Nozato, T., Abe, S., Ikeda, M., Marumo, F., Hiroe, M., 2001. Cyclin A/cdk2 Activation Is Involved in Hypoxia-Induced Apoptosis in Cardiomyocytes. *Circ. Res.* 88, 408–414. doi:10.1161/01.RES.88.4.408
- Airola, M.V., Hannun, Y.A., 2013. Sphingolipid metabolism and neutral sphingomyelinases. *Handb. Exp. Pharmacol.* 57–76. doi:10.1007/978-3-7091-1368-4_3
- Aleman, R., van Koppen, C.J., Danneberg, K., Ter Braak, M., Meyer Zu Heringdorf, D., 2007. Regulation and functional roles of sphingosine kinases. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 374, 413–428. doi:10.1007/s00210-007-0132-3
- Allende, M.L., Sasaki, T., Kawai, H., Olivera, A., Mi, Y., van Echten-Deckert, G., Hajdu, R., Rosenbach, M., Keohane, C.A., Mandala, S., Spiegel, S., Proia, R.L., 2004. Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720. *J. Biol. Chem.* 279, 52487–52492. doi:10.1074/jbc.M406512200
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J., 1996. Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell* 87, 171. doi:10.1016/S0092-8674(00)81334-3
- Andersen, H.R., Falk, E., Nielsen, D., 1987. Right ventricular infarction: Frequency, size and topography in coronary heart disease: A prospective study comprising 107 consecutive autopsies from a coronary care unit. *J. Am. Coll. Cardiol.* 10, 1223–1232. doi:10.1016/S0735-1097(87)80122-5
- Asemu, G., Neckář, J., Szárszoi, O., Papousek, F., Ostádal, B., Kolar, F., 2000. Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 49, 597–606.
- Bajjalieh, S.M., Martin, T.F., Floor, E., 1989. Synaptic vesicle ceramide kinase. A calcium-stimulated lipid kinase that co-purifies with brain synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 264, 14354–14360.
- Baker, E.J., Boerboom, L.E., Olinger, G.N., Baker, J.E., 1995. Tolerance of the developing heart to ischemia: impact of hypoxemia from birth. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 268, H1165–H1173.
- Balková, P., Hlaváčková, M., Milerová, M., Neckář, J., Kolář, F., Novák, F., Nováková, O., 2011. N-acetylcysteine treatment prevents the up-regulation of MnSOD in chronically hypoxic rat hearts. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 60, 467–474.
- Bielawska, A.E., Shapiro, J.P., Jiang, L., Melkonyan, H.S., Piot, C., Wolfe, C.L., Tomei, L.D., Hannun, Y.A., Umansky, S.R., 1997. Ceramide is involved in triggering of cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia and reperfusion. *Am. J. Pathol.* 151, 1257–1263.
- Bishopric, N.H., Discher, D.J., Kaiser, S., Hernandez, O., Sato, B., Zang, J., Webster, K.A., 1999. Hypoxia-activated apoptosis of cardiac myocytes requires reoxygenation or a pH shift and is independent of p53. *J. Clin. Invest.* 104, 239–252. doi:10.1172/JCI5871
- Bohuslavová, R., Kolář, F., Kuthanová, L., Neckář, J., Tichopád, A., Pavlinkova, G., 2010. Gene expression profiling of sex differences in HIF1-dependent adaptive cardiac responses to chronic hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 109, 1195–1202. doi:10.1152/jappphysiol.00366.2010
- Braun, M.U., Szalai, P., Strasser, R.H., Borst, M.M., 2003. Right ventricular hypertrophy and apoptosis after pulmonary artery banding: regulation of PKC isozymes. *Cardiovasc. Res.* 59, 658–667.
- Buja, L.M., Vela, D., 2008. Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart. *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* 17, 349–374. doi:10.1016/j.carpath.2008.02.004
- Chalfant, C.E., Kishikawa, K., Mumby, M.C., Kamibayashi, C., Bielawska, A., Hannun, Y.A., 1999. Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* 274, 20313–20317.
- Charruyer, A., Grazide, S., Bezombes, C., Müller, S., Laurent, G., Jaffrézou, J.-P., 2005. UV-C light induces raft-associated acid sphingomyelinase and JNK activation and translocation

- independently on a nuclear signal. *J. Biol. Chem.* 280, 19196–19204.
doi:10.1074/jbc.M412867200
- Cheng, Y., Nilsson, A., Tömquist, E., Duan, R.-D., 2002. Purification, characterization, and expression of rat intestinal alkaline sphingomyelinase. *J. Lipid Res.* 43, 316–324.
- Chipuk, J.E., McStay, G.P., Bharti, A., Kuwana, T., Clarke, C.J., Siskind, L.J., Obeid, L.M., Green, D.R., 2012. Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell* 148, 988–1000. doi:10.1016/j.cell.2012.01.038
- Chun, J., Hla, T., Lynch, K.R., Spiegel, S., Moolenaar, W.H., 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid Receptor Nomenclature. *Pharmacol. Rev.* 62, 579–587. doi:10.1124/pr.110.003111
- Clarke, C.J., Guthrie, J.M., Hannun, Y.A., 2008. Regulation of neutral sphingomyelinase-2 (nSMase2) by tumor necrosis factor- α involves protein kinase C- δ in lung epithelial cells. *Mol. Pharmacol.* 74, 1022–1032. doi:10.1124/mol.108.046250
- Condorelli, G., Morisco, C., Stassi, G., Notte, A., Farina, F., Sgaramella, G., de Rienzo, A., Roncarati, R., Trimarco, B., Lembo, G., 1999. Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat. *Circulation* 99, 3071–3078.
- Crow, M.T., Mani, K., Nam, Y.-J., Kitsis, R.N., 2004. The Mitochondrial Death Pathway and Cardiac Myocyte Apoptosis. *Circ. Res.* 95, 957–970. doi:10.1161/01.RES.0000148632.35500.d9
- Cuvillier, O., Nava, V.E., Murthy, S.K., Edsall, L.C., Levade, T., Milstien, S., Spiegel, S., 2001. Sphingosine generation, cytochrome c release, and activation of caspase-7 in doxorubicin-induced apoptosis of MCF7 breast adenocarcinoma cells. *Cell Death Differ.* 8, 162–171. doi:10.1038/sj.cdd.4400793
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., Yuan, J., 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.* 1, 112–119. doi:10.1038/nchembio711
- Ding, T., Li, Z., Hailemariam, T., Mukherjee, S., Maxfield, F.R., Wu, M.-P., Jiang, X.-C., 2008. SMS overexpression and knockdown: impact on cellular sphingomyelin and diacylglycerol metabolism, and cell apoptosis. *J. Lipid Res.* 49, 376–385. doi:10.1194/jlr.M700401-JLR200
- Dong, J.W., Zhu, H.F., Zhu, W.Z., Ding, H.L., Ma, T.M., Zhou, Z.N., 2003. Intermittent hypoxia attenuates ischemia/reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating Bcl-2/Bax expression. *Cell Res.* 13, 385–391. doi:10.1038/sj.cr.7290184
- Duan, H.-F., Wang, H., Yi, J., Liu, H.-J., Zhang, Q.-W., Li, L.-B., Zhang, T., Lu, Y., Wu, C.-T., Wang, L.-S., 2007. Adenoviral Gene Transfer of Sphingosine Kinase 1 Protects Heart Against Ischemia/Reperfusion-Induced Injury and Attenuates Its Postischemic Failure. *Hum. Gene Ther.* 18, 1119–1128. doi:10.1089/hum.2007.036
- Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T.V., Vandenabeele, P., 2009. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect.*, Forum on mechanisms and roles of cell death during microbial infections 11, 1050–1062. doi:10.1016/j.micinf.2009.08.013
- Ekhterae, D., Lin, Z., Lundberg, M.S., Crow, M.T., Brosius, F.C., Núñez, G., 1999. ARC Inhibits Cytochrome c Release From Mitochondria and Protects Against Hypoxia-Induced Apoptosis in Heart-Derived H9c2 Cells. *Circ. Res.* 85, e70–e77. doi:10.1161/01.RES.85.12.e70
- Esen, M., Schreiner, B., Jendrossek, V., Lang, F., Fassbender, K., Grassmé, H., Gulbins, E., 2001. Mechanisms of Staphylococcus aureus induced apoptosis of human endothelial cells. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 6, 431–439.
- Essop, M.F., 2007. Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. *J. Physiol.* 584, 715–726. doi:10.1113/jphysiol.2007.143511
- Fliiss, H., Gattinger, D., 1996. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ. Res.* 79, 949–956.

- Fukuda, Y., Kihara, A., Igarashi, Y., 2003. Distribution of sphingosine kinase activity in mouse tissues: contribution of SPHK1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309, 155–160. doi:10.1016/S0006-291X(03)01551-1
- Ganesan, V., Perera, M.N., Colombini, D., Datskovskiy, D., Chadha, K., Colombini, M., 2010. Ceramide and activated Bax act synergistically to permeabilize the mitochondrial outer membrane. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 15, 553–562. doi:10.1007/s10495-009-0449-0
- Gault, C., Obeid, L., Hannun, Y., 2010. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv. Exp. Med. Biol.* 688, 1–23.
- Goldstein, J.A., 1998. Right heart ischemia: Pathophysiology, natural history, and clinical management. *Prog. Cardiovasc. Dis., The Right Heart: Physiology, Assessment, and Clinical Importance* 40, 325–341. doi:10.1016/S0033-0620(98)80051-0
- Gomez, L., Paillard, M., Price, M., Chen, Q., Teixeira, G., Spiegel, S., Lesnefsky, E.J., 2011. A novel role for mitochondrial sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase-2 in PTP-mediated cell survival during cardioprotection. *Basic Res. Cardiol.* 106, 1341–1353. doi:10.1007/s00395-011-0223-7
- Gomez-Muñoz, A., Duffy, P.A., Martin, A., O'Brien, L., Byun, H.S., Bittman, R., Brindley, D.N., 1995. Short-chain ceramide-1-phosphates are novel stimulators of DNA synthesis and cell division: antagonism by cell-permeable ceramides. *Mol. Pharmacol.* 47, 833–839.
- Gómez-Muñoz, A., Kong, J.Y., Parhar, K., Wang, S.W., Gangoiti, P., González, M., Eivemark, S., Salh, B., Duronio, V., Steinbrecher, U.P., 2005. Ceramide-1-phosphate promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *FEBS Lett.* 579, 3744–3750. doi:10.1016/j.febslet.2005.05.067
- Gómez-Muñoz, A., Kong, J.Y., Salh, B., Steinbrecher, U.P., 2004. Ceramide-1-phosphate blocks apoptosis through inhibition of acid sphingomyelinase in macrophages. *J. Lipid Res.* 45, 99–105. doi:10.1194/jlr.M300158-JLR200
- Grassmé, H., Jendrossek, V., Riehle, A., von Kürthy, G., Berger, J., Schwarz, H., Weller, M., Kolesnick, R., Gulbins, E., 2003. Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat. Med.* 9, 322–330. doi:10.1038/nm823
- Grassmé, H., Riehle, A., Wilker, B., Gulbins, E., 2005. Rhinoviruses infect human epithelial cells via ceramide-enriched membrane platforms. *J. Biol. Chem.* 280, 26256–26262. doi:10.1074/jbc.M500835200
- Grassmé, H., Riethmüller, J., Gulbins, E., 2007. Biological aspects of ceramide-enriched membrane domains. *Prog. Lipid Res.* 46, 161–170. doi:10.1016/j.plipres.2007.03.002
- Grassmé, H., Schwarz, H., Gulbins, E., 2001. Molecular mechanisms of ceramide-mediated CD95 clustering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 1016–1030. doi:10.1006/bbrc.2001.5045
- Grösch, S., Schiffmann, S., Geisslinger, G., 2012. Chain length-specific properties of ceramides. *Prog. Lipid Res.* 51, 50–62. doi:10.1016/j.plipres.2011.11.001
- Hait, N.C., Allegood, J., Maceyka, M., Strub, G.M., Harikumar, K.B., Singh, S.K., Luo, C., Marmorstein, R., Kordula, T., Milstien, S., Spiegel, S., 2009. Regulation of Histone Acetylation in the Nucleus by Sphingosine-1-Phosphate. *Science* 325, 1254–1257. doi:10.1126/science.1176709
- Hamaguchi, A., Suzuki, E., Murayama, K., Fujimura, T., Hikita, T., Iwabuchi, K., Handa, K., Withers, D.A., Masters, S.C., Fu, H., Hakomori, S., 2003. Sphingosine-dependent Protein Kinase-1, Directed to 14-3-3, Is Identified as the Kinase Domain of Protein Kinase Cδ. *J. Biol. Chem.* 278, 41557–41565. doi:10.1074/jbc.M305294200
- Hanada, K., 2003. Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1632, 16–30. doi:10.1016/S1388-1981(03)00059-3
- Hanada, K., 2010. Intracellular trafficking of ceramide by ceramide transfer protein. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 86, 426–437.
- Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 139–150. doi:10.1038/nrm2329
- Hearse, D.J., 1994. Myocardial ischaemia: can we agree on a definition for the 21st century? *Cardiovasc. Res.* 28, 1737–1744: discussion 1745–1746.

- Heath, D., 1977. Hypoxia and the pulmonary circulation. *J. Clin. Pathol. Suppl. (R. Coll. Pathol.)* 11, 21–29.
- Heinrich, M., Neumeyer, J., Jakob, M., Hallas, C., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Trauzold, A., Hethke, A., Schütze, S., 2004. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ.* 11, 550–563. doi:10.1038/sj.cdd.4401382
- Hernandez, O.M., Discher, D.J., Bishopric, N.H., Webster, K.A., 2000. Rapid activation of neutral sphingomyelinase by hypoxia-reoxygenation of cardiac myocytes. *Circ. Res.* 86, 198–204.
- Hinkovska-Galcheva, V., Boxer, L.A., Kindzelskii, A., Hiraoka, M., Abe, A., Goparju, S., Spiegel, S., Petty, H.R., Shayman, J.A., 2005. Ceramide 1-Phosphate, a Mediator of Phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 280, 26612–26621. doi:10.1074/jbc.M501359200
- Hojjati, M.R., Li, Z., Jiang, X.-C., 2005. Serine palmitoyl-CoA transferase (SPT) deficiency and sphingolipid levels in mice. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1737, 44–51. doi:10.1016/j.bbalip.2005.08.006
- Holthuis, J.C.M., Luberto, C., 2010. Tales and mysteries of the enigmatic sphingomyelin synthase family. *Adv. Exp. Med. Biol.* 688, 72–85.
- Huitema, K., van den Dikkenberg, J., Brouwers, J.F.H.M., Holthuis, J.C.M., 2004. Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J.* 23, 33–44. doi:10.1038/sj.emboj.7600034
- Hurtado, A., 1960. Some clinical aspects of life at high altitudes. *Ann. Intern. Med.* 53, 247–258.
- Ikeda, M., Kihara, A., Igarashi, Y., 2004. Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 338–343. doi:10.1016/j.bbrc.2004.10.036
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schröter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E., Tschopp, J., 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190–195.
- Javadov, S.A., Clarke, S., Das, M., Griffiths, E.J., Lim, K.H.H., Halestrap, A.P., 2003. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J. Physiol.* 549, 513–524. doi:10.1113/jphysiol.2003.034231
- Jin, Z.-Q., Zhang, J., Huang, Y., Hoover, H.E., Vessey, D.A., Karliner, J.S., 2007. A sphingosine kinase 1 mutation sensitizes the myocardium to ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 76, 41–50. doi:10.1016/j.cardiores.2007.05.029
- Jung, F., Weiland, U., Johns, R.A., Ihling, C., Dimmeler, S., 2001. Chronic Hypoxia Induces Apoptosis in Cardiac Myocytes: A Possible Role for Bcl-2-like Proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 419–425. doi:10.1006/bbrc.2001.5406
- Kågedal, K., Zhao, M., Svensson, I., Brunk, U.T., 2001. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem. J.* 359, 335–343.
- Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., Clark, W.A., Sonnenblick, E.H., Krajewski, S., Reed, J.C., Olivetti, G., Anversa, P., 1996. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 74, 86–107.
- Kang, P.M., Izumo, S., 2003. Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases. *Trends Mol. Med.* 9, 177–182. doi:10.1016/S1471-4914(03)00025-X
- Karliner, J.S., 2013. Sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate in the heart: a decade of progress. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 203–212. doi:10.1016/j.bbalip.2012.06.006
- Karliner, J.S., Honbo, N., Summers, K., Gray, M.O., Goetzl, E.J., 2001. The lysophospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid enhance survival during hypoxia in neonatal rat cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33, 1713–1717. doi:10.1006/jmcc.2001.1429
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.

- Kihara, A., Igarashi, Y., 2004. FVT-1 Is a Mammalian 3-Ketodihydrospingosine Reductase with an Active Site That Faces the Cytosolic Side of the Endoplasmic Reticulum Membrane. *J. Biol. Chem.* 279, 49243–49250. doi:10.1074/jbc.M405915200
- Kinch, J.W., Ryan, T.J., 1994. Right Ventricular Infarction. *N. Engl. J. Med.* 330, 1211–1217. doi:10.1056/NEJM199404283301707
- Kloner, R.A., Bolli, R., Marban, E., Reinlib, L., Braunwald, E., 1998. Medical and Cellular Implications of Stunning, Hibernation, and Preconditioning An NHLBI Workshop. *Circulation* 97, 1848–1867. doi:10.1161/01.CIR.97.18.1848
- Kolář, F., Ježková, J., Balková, P., Břeh, J., Neckář, J., Novák, F., Nováková, O., Tomášová, H., Srbová, M., Ošťádal, B., Wilhelm, J., Herget, J., 2007. Role of oxidative stress in PKC- δ upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 292, H224–H230. doi:10.1152/ajpheart.00689.2006
- Kolar, F., Nekar, J., Ostadal, B., Maslov, L.N., Stakheev, D.L., Tayurskaya, A.S., Lishmanov, Y.B., 2008. Role of ATP-sensitive K⁺-channels in antiarrhythmic and cardioprotective action of adaptation to intermittent hypobaric hypoxia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 145, 418–421. doi:10.1007/s10517-008-0106-6
- Kolár, F., Ostádal, B., 2004. Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 53 Suppl 1, S3–13.
- Kong, S.W., Bodyak, N., Yue, P., Liu, Z., Brown, J., Izumo, S., Kang, P.M., 2005. Genetic expression profiles during physiological and pathological cardiac hypertrophy and heart failure in rats. *Physiol. Genomics* 21, 34–42. doi:10.1152/physiolgenomics.00226.2004
- Koseki, T., Inohara, N., Chen, S., Nunez, G., 1998. ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5156–5160.
- Kreydiyyeh, S.I., Dakroub, Z., 2014. Ceramide and its metabolites modulate time-dependently the activity of the Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾ ATPase in HepG2 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 53C, 102–107. doi:10.1016/j.biocel.2014.04.027
- Krishnan, J., Suter, M., Windak, R., Krebs, T., Felley, A., Montessuit, C., Tokarska-Schlattner, M., Aasum, E., Bogdanova, A., Perriard, E., Perriard, J.-C., Larsen, T., Pedrazzini, T., Krek, W., 2009. Activation of a HIF1 α -PPAR γ Axis Underlies the Integration of Glycolytic and Lipid Anabolic Pathways in Pathologic Cardiac Hypertrophy. *Cell Metab.* 9, 512–524. doi:10.1016/j.cmet.2009.05.005
- Lakhani, S.A., 2006. Caspases 3 and 7: Key Mediators of Mitochondrial Events of Apoptosis. *Science* 311, 847–851. doi:10.1126/science.1115035
- Lee, M.J., Van Brocklyn, J.R., Thangada, S., Liu, C.H., Hand, A.R., Menzeleev, R., Spiegel, S., Hla, T., 1998. Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* 279, 1552–1555.
- Lee, P., Sata, M., Lefer, D.J., Factor, S.M., Walsh, K., Kitsis, R.N., 2003. Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 284, H456–H463. doi:10.1152/ajpheart.00777.2002
- Lee, S.-D., Kuo, W.-W., Wu, C.-H., Lin, Y.-M., Lin, J.A., Lu, M.-C., Yang, A.-L., Liu, J.-Y., Wang, S.-G.P., Liu, C.-J., Chen, L., Huang, C.-Y., 2006. Effects of short- and long-term hypobaric hypoxia on Bcl2 family in rat heart. *Int. J. Cardiol.* 108, 376–384. doi:10.1016/j.ijcard.2005.05.046
- Letout, A., Solares-Espinoza, M., Mateo, P., Koulmann, N., Bahi, L., Serrurier, B., Favier, R., Ventura-Clapier, R., Bigard, X., 2005. Adaptive changes in cardiac myosin heavy chain and creatine kinase isozymic profiles in rats native of altitude. *Acta Physiol. Scand.* 184, 95–104. doi:10.1111/j.1365-201X.2005.01435.x
- Li, X., Moody, M.R., Engel, D., Walker, S., Clubb, F.J., Sivasubramanian, N., Mann, D.L., Reid, M.B., 2000. Cardiac-Specific Overexpression of Tumor Necrosis Factor- α Causes Oxidative Stress and Contractile Dysfunction in Mouse Diaphragm. *Circulation* 102, 1690–1696. doi:10.1161/01.CIR.102.14.1690

- Liu, H., Sugiura, M., Nava, V.E., Edsall, L.C., Kono, K., Poulton, S., Milstien, S., Kohama, T., Spiegel, S., 2000. Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Mammalian Sphingosine Kinase Type 2 Isoform. *J. Biol. Chem.* 275, 19513–19520. doi:10.1074/jbc.M002759200
- Liu, H., Toman, R.E., Goparaju, S.K., Maceyka, M., Nava, V.E., Sankala, H., Payne, S.G., Bektas, M., Ishii, I., Chun, J., Milstien, S., Spiegel, S., 2003. Sphingosine Kinase Type 2 Is a Putative BH3-only Protein That Induces Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 40330–40336. doi:10.1074/jbc.M304455200
- Logue, S., Gustafsson, A., Samali, A., Gottlieb, R., 2005. Ischemia/reperfusion injury at the intersection with cell death. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38, 21–33. doi:10.1016/j.yjmcc.2004.11.009
- Long, X., Boluyt, M.O., Hipolito, M.L., Lundberg, M.S., Zheng, J.S., O'Neill, L., Cirielli, C., Lakatta, E.G., Crow, M.T., 1997. p53 and the hypoxia-induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J. Clin. Invest.* 99, 2635–2643.
- Luberto, C., Hassler, D.F., Signorelli, P., Okamoto, Y., Sawai, H., Boros, E., Hazen-Martin, D.J., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., Smith, G.K., 2002. Inhibition of Tumor Necrosis Factor-induced Cell Death in MCF7 by a Novel Inhibitor of Neutral Sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* 277, 41128–41139. doi:10.1074/jbc.M206747200
- Mazurais, D., Robert, P., Gout, B., Berrebi-Bertrand, I., Laville, M.P., Calmels, T., 2002. Cell type-specific localization of human cardiac S1P receptors. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 50, 661–670.
- McGrath, J.J., Procházka, J., Pelouch, V., Ostádal, B., 1973. Physiological responses of rats to intermittent high-altitude stress: effects of age. *J. Appl. Physiol.* 34, 289–293.
- Means, C.K., Xiao, C.-Y., Li, Z., Zhang, T., Omens, J.H., Ishii, I., Chun, J., Brown, J.H., 2007. Sphingosine 1-phosphate S1P2 and S1P3 receptor-mediated Akt activation protects against in vivo myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 292, H2944–H2951. doi:10.1152/ajpheart.01331.2006
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1997. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 16, 2794–2804. doi:10.1093/emboj/16.10.2794
- Megidish, T., Cooper, J., Zhang, L., Fu, H., Hakomori, S., 1998. A novel sphingosine-dependent protein kinase (SDK1) specifically phosphorylates certain isoforms of 14-3-3 protein. *J. Biol. Chem.* 273, 21834–21845.
- Megidish, T., White, T., Takio, K., Titani, K., Igarashi, Y., Hakomori, S., 1995. The signal modulator protein 14-3-3 is a target of sphingosine- or N,N-dimethylsphingosine-dependent kinase in 3T3(A31) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 739–747.
- Mendelson, K., Evans, T., Hla, T., 2014. Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development* 141, 5–9. doi:10.1242/dev.094805
- Michel, C., Echten-Deckert, G. van, Rother, J., Sandhoff, K., Wang, E., Merrill, A.H., 1997. Characterization of Ceramide Synthesis A DIHYDROCERAMIDE DESATURASE INTRODUCES THE 4,5-TRANS-DOUBLE BOND OF SPHINGOSINE AT THE LEVEL OF DIHYDROCERAMIDE. *J. Biol. Chem.* 272, 22432–22437. doi:10.1074/jbc.272.36.22432
- Milescu, M., Bosmans, F., Lee, S., Alabi, A.A., Kim, J.I., Swartz, K.J., 2009. Interactions between lipids and voltage sensor paddles detected with tarantula toxins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1080–1085. doi:10.1038/nsmb.1679
- Milhas, D., Clarke, C.J., Idkowiak-Baldys, J., Canals, D., Hannun, Y.A., 2010. Anterograde and retrograde transport of neutral sphingomyelinase-2 between the Golgi and the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 1361–1374. doi:10.1016/j.bbalip.2010.08.001
- Mizugishi, K., Yamashita, T., Olivera, A., Miller, G.F., Spiegel, S., Proia, R.L., 2005. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol. Cell. Biol.* 25, 11113–11121. doi:10.1128/MCB.25.24.11113-11121.2005
- Moissac, D. de, Gurevich, R.M., Zheng, H., Singal, P.K., Kirshenbaum, L.A., 2000. Caspase Activation and Mitochondrial Cytochrome C Release during Hypoxia-mediated Apoptosis of Adult Ventricular Myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32, 53–63. doi:10.1006/jmcc.1999.1057

- Morel, S., Milano, G., Ludunge, K.M., Corno, A.F., Samaja, M., Fleury, S., Bonny, C., Kappenberger, L., von Segesser, L.K., Vassalli, G., 2006. Brief reoxygenation episodes during chronic hypoxia enhance posthypoxic recovery of LV function: role of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Basic Res. Cardiol.* 101, 336–345.
- Murry, C.E., Jennings, R.B., Reimer, K.A., 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124–1136. doi:10.1161/01.CIR.74.5.1124
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., Dixit, V.M., 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817–827.
- Neckár, J., Borchert, G., Hlousková, P., Míková, P., Nováková, O., Novák, F., Hroch, M., Papousek, F., Ostádal, B., Kolár, F., 2013. Brief Daily Episode of Normoxia Inhibits Cardioprotection Conferred by Chronic Continuous Hypoxia. Role of Oxidative Stress and BK_{Ca} Channels. *Curr. Pharm. Des.* 19, 6880–6889. doi:10.2174/138161281939131127115154
- Neckár, J., Ostádal, B., Kolár, F., 2004. Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 53, 621–628.
- Neckár, J., Papousek, F., Nováková, O., Ostádal, B., Kolár, F., 2002b. Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Res. Cardiol.* 97, 161–167.
- Neckár, J., Szárszoi, O., Herget, J., Ostádal, B., Kolár, F., 2003. Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 52, 171–175.
- Neckář, J., Szárszoi, O., Kóten, L., Papoušek, F., Ošťádal, B., Grover, G.J., Kolář, F., 2002a. Effects of mitochondrial KATP modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc. Res.* 55, 567–575. doi:10.1016/S0008-6363(02)00456-X
- Nelson, D.P., Setser, E., Hall, D.G., Schwartz, S.M., Hewitt, T., Klevitsky, R., Osinska, H., Bellgrau, D., Duke, R.C., Robbins, J., 2000. Proinflammatory consequences of transgenic Fas ligand expression in the heart. *J. Clin. Invest.* 105, 1199–1208. doi:10.1172/JCI8212
- Neuss, M., Monticone, R., Lundberg, M.S., Chesley, A.T., Fleck, E., Crow, M.T., 2001. The Apoptotic Regulatory Protein ARC (Apoptosis Repressor with Caspase Recruitment Domain) Prevents Oxidant Stress-mediated Cell Death by Preserving Mitochondrial Function. *J. Biol. Chem.* 276, 33915–33922. doi:10.1074/jbc.M104080200
- O'Brien, N.W., Gellings, N.M., Guo, M., Barlow, S.B., Glembotski, C.C., Sabbadini, R.A., 2003. Factor associated with neutral sphingomyelinase activation and its role in cardiac cell death. *Circ. Res.* 92, 589–591. doi:10.1161/01.RES.0000066290.29715.67
- Obeid, L.M., Linaudic, C.M., Karolak, L.A., Hannun, Y.A., 1993. Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259, 1769.
- Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S., Spiegel, S., 1999. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J. Cell Biol.* 147, 545–558.
- Oltval, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609–619. doi:10.1016/0092-8674(93)90509-O
- Ošťádal, B., Kolář, F., 1999. Cardiac Ischemia: From Injury to Protection: From Injury to Protection. Springer Science & Business Media, pp. 1-10
- Ostadal, B., Ostadalova, I., Dhalla, N.S., 1999. Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physiol. Rev.* 79, 635–659.
- Ostádal, B., Urbanová, D., Ressler, J., Procházka, J., Pelouch, V., Widimský, J., 1981. Changes of the right and left ventricles in rats exposed to intermittent high altitude hypoxia. *Cor Vasa* 23, 111–120.

- Ott, M., Robertson, J.D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., 2002. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 1259–1263. doi:10.1073/pnas.241655498
- Pettus, B.J., Bielawska, A., Subramanian, P., Wijesinghe, D.S., Maceyka, M., Leslie, C.C., Evans, J.H., Freiberg, J., Roddy, P., Hannun, Y.A., Chalfant, C.E., 2004. Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 279, 11320–11326. doi:10.1074/jbc.M309262200
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR [WWW Document]. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC55695/> (accessed 5.18.14).
- Pissarek, M., Bigard, X., Mateo, P., Guezennec, C.Y., Hoerter, J.A., 1997. Adaptation of cardiac myosin and creatine kinase to chronic hypoxia: role of anorexia and hypertension. *Am. J. Physiol.* 272, H1690–1695.
- Pyne, S., Long, J.S., Ktistakis, N.T., Pyne, N.J., 2005. Lipid phosphate phosphatases and lipid phosphate signalling. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1370–1374. doi:10.1042/BST20051370
- Qu, X., Zou, Z., Sun, Q., Luby-Phelps, K., Cheng, P., Hogan, R.N., Gilpin, C., Levine, B., 2007. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* 128, 931–946. doi:10.1016/j.cell.2006.12.044
- Rasper, D.M., Vaillancourt, J.P., Hadano, S., Houtzager, V.M., Seiden, I., Keen, S.L., Tawa, P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D., Koop, B.F., Peterson, E.P., Thornberry, N.A., Huang, J., MacPherson, D.P., Black, S.C., Hornung, F., Lenardo, M.J., Hayden, M.R., Roy, S., Nicholson, D.W., 1998. Cell death attenuation by ‘Usurpin’, a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ.* 5, 271–288. doi:10.1038/sj.cdd.4400370
- Ruvolo, P.P., Deng, X., Ito, T., Carr, B.K., May, W.S., 1999. Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J. Biol. Chem.* 274, 20296–20300.
- Sakakura, C., Sweeney, E.A., Shirahama, T., Hakomori, S., Igarashi, Y., 1996. Suppression of bcl-2 gene expression by sphingosine in the apoptosis of human leukemic HL-60 cells during phorbol ester-induced terminal differentiation. *FEBS Lett.* 379, 177–180.
- Sawai, H., Domae, N., Nagan, N., Hannun, Y.A., 1999. Function of the cloned putative neutral sphingomyelinase as lyso-platelet activating factor-phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 274, 38131–38139.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675–1687. doi:10.1093/emboj/17.6.1675
- Scarlatti, F., Granata, R., Meijer, A.J., Codogno, P., 2009. Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell Death Differ.* 16, 12–20. doi:10.1038/cdd.2008.101
- Schiffmann, S., Birod, K., Männich, J., Eberle, M., Wegner, M.-S., Wanger, R., Hartmann, D., Ferreiros, N., Geisslinger, G., Grösch, S., 2013. Ceramide metabolism in mouse tissue. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 1886–1894. doi:10.1016/j.biocel.2013.06.004
- Separovic, D., Semaan, L., Tarca, A.L., Awad Maitah, M.Y., Hanada, K., Bielawski, J., Villani, M., Luberto, C., 2008. Suppression of sphingomyelin synthase 1 by small interference RNA is associated with enhanced ceramide production and apoptosis after photodamage. *Exp. Cell Res.* 314, 1860–1868. doi:10.1016/j.yexcr.2008.02.008
- Serra, M., Saba, J.D., 2010. Sphingosine 1-phosphate lyase, a key regulator of sphingosine 1-phosphate signaling and function. *Adv. Enzyme Regul.* 50, 349–362. doi:10.1016/j.advenzreg.2009.10.024
- Shirahama, T., Sakakura, C., Sweeney, E.A., Ozawa, M., Takemoto, M., Nishiyama, K., Ohi, Y., Igarashi, Y., 1997. Sphingosine induces apoptosis in androgen-independent human prostatic carcinoma DU-145 cells by suppression of bcl-X(L) gene expression. *FEBS Lett.* 407, 97–100.
- Siskind, L.J., Feinstein, L., Yu, T., Davis, J.S., Jones, D., Choi, J., Zuckerman, J.E., Tan, W., Hill, R.B., Hardwick, J.M., Colombini, M., 2008. Anti-apoptotic Bcl-2 Family Proteins Disassemble Ceramide Channels. *J. Biol. Chem.* 283, 6622–6630. doi:10.1074/jbc.M706115200

- Siskind, L.J., Kolesnick, R.N., Colombini, M., 2002. Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 26796–26803. doi:10.1074/jbc.M200754200
- Siskind, L.J., Kolesnick, R.N., Colombini, M., 2006. Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion* 6, 118–125. doi:10.1016/j.mito.2006.03.002
- Sugiura, M., Kono, K., Liu, H., Shimizugawa, T., Minekura, H., Spiegel, S., Kohama, T., 2002. Ceramide Kinase, a Novel Lipid Kinase MOLECULAR CLONING AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION. *J. Biol. Chem.* 277, 23294–23300. doi:10.1074/jbc.M201535200
- Suleiman, M.-S., Singh, R.J.R., Stewart, C.E.H., 2007. Apoptosis and the cardiac action of insulin-like growth factor I. *Pharmacol. Ther.* 114, 278–294. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.03.001
- Takashi, E., Ashraf, M., 2000. Pathologic assessment of myocardial cell necrosis and apoptosis after ischemia and reperfusion with molecular and morphological markers. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32, 209–224. doi:10.1006/jmcc.1999.1067
- Tanaka, M., Ito, H., Adachi, S., Akimoto, H., Nishikawa, T., Kasajima, T., Marumo, F., Hiroe, M., 1994. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ. Res.* 75, 426–433.
- Ternes, P., Brouwers, J.F.H.M., van den Dikkenberg, J., Holthuis, J.C.M., 2009. Sphingomyelin synthase SMS2 displays dual activity as ceramide phosphoethanolamine synthase. *J. Lipid Res.* 50, 2270–2277. doi:10.1194/jlr.M900230-JLR200
- Tidhar, R., Futerman, A.H., 2013. The complexity of sphingolipid biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Functional and structural diversity of the endoplasmic reticulum* 1833, 2511–2518. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.04.010
- Tomiuk, S., Hofmann, K., Nix, M., Zumbansen, M., Stoffel, W., 1998. Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3638–3643.
- Törnquist, K., Blom, T., Shariatmadari, R., Pasternack, M., 2004. Ceramide 1-phosphate enhances calcium entry through voltage-operated calcium channels by a protein kinase C-dependent mechanism in GH4C1 rat pituitary cells. *Biochem. J.* 380, 661–668. doi:10.1042/BJ20031637
- Vacaru, A.M., Tafesse, F.G., Ternes, P., Kondylis, V., Hermansson, M., Brouwers, J.F.H.M., Somerharju, P., Rabouille, C., Holthuis, J.C.M., 2009. Sphingomyelin synthase-related protein SMSr controls ceramide homeostasis in the ER. *J. Cell Biol.* 185, 1013–1027. doi:10.1083/jcb.200903152
- Vessey, D.A., Kelley, M., Li, L., Huang, Y., 2009a. Sphingosine protects aging hearts from ischemia/reperfusion injury: Superiority to sphingosine 1-phosphate and ischemic pre- and post-conditioning. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2, 146–151.
- Vessey, D.A., Li, L., Honbo, N., Karliner, J.S., 2009b. Sphingosine 1-phosphate is an important endogenous cardioprotectant released by ischemic pre- and postconditioning. *AJP Heart Circ. Physiol.* 297, H1429–H1435. doi:10.1152/ajpheart.00358.2009
- Vessey, D.A., Li, L., Jin, Z.-Q., Kelley, M., Honbo, N., Zhang, J., Karliner, J.S., 2011. A Sphingosine Kinase Form 2 Knockout Sensitizes Mouse Myocardium to Ischemia/Reoxygenation Injury and Diminishes Responsiveness to Ischemic Preconditioning. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2011, e961059. doi:10.1155/2011/961059
- Vessey, D.A., Li, L., Kelley, M., Karliner, J.S., 2008a. Combined sphingosine, S1P and ischemic postconditioning rescue the heart after protracted ischemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 425–429. doi:10.1016/j.bbrc.2008.08.022
- Vessey, D.A., Li, L., Kelley, M., Zhang, J., Karliner, J.S., 2008b. Sphingosine can pre- and post-condition heart and utilizes a different mechanism from sphingosine 1-phosphate. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 22, 113–118. doi:10.1002/jbt.20227
- Viganò, A., Vasso, M., Caretti, A., Bravatà, V., Terraneo, L., Fania, C., Capitanio, D., Samaja, M., Gelfi, C., 2011. Protein modulation in mouse heart under acute and chronic hypoxia. *PROTEOMICS* 11, 4202–4217. doi:10.1002/pmic.201000804

- Vovc, E., 1998. The antiarrhythmic effect of adaptation to intermittent hypoxia. *Folia Med. (Plovdiv)* 40, 51–54.
- Vymetalkova, V.P., Slyskova, J., Korenkova, V., Bielik, L., Langerova, L., Prochazka, P., Rejhova, A., Schwarzova, L., Pardini, B., Naccarati, A., Vodicka, P., 2014. Molecular characteristics of mismatch repair genes in sporadic colorectal tumors in Czech patients. *BMC Med. Genet.* 15, 17. doi:10.1186/1471-2350-15-17
- Walensky, L.D., Gavathiotis, E., 2011. BAX unleashed: the biochemical transformation of an inactive cytosolic monomer into a toxic mitochondrial pore. *Trends Biochem. Sci.* 36, 642–652. doi:10.1016/j.tibs.2011.08.009
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J., 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727–730. doi:10.1126/science.1059108
- Widimský, J., Urbanová, D., Ressler, J., Ošťádal, B., Pelouch, V., Procházka, J., 1973. Effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in the rat. *Cardiovasc. Res.* 7, 798–808. doi:10.1093/cvr/7.6.798
- Wong, W.W.-L., Puthalakath, H., 2008. Bcl-2 family proteins: The sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway. *IUBMB Life* 60, 390–397. doi:10.1002/iub.51
- Wu, B.X., Rajagopalan, V., Roddy, P.L., Clarke, C.J., Hannun, Y.A., 2010. Identification and characterization of murine mitochondria-associated neutral sphingomyelinase (MA-nSMase), the mammalian sphingomyelin phosphodiesterase 5. *J. Biol. Chem.* 285, 17993–18002. doi:10.1074/jbc.M110.102988
- Xin, M., Deng, X., 2006. Protein phosphatase 2A enhances the proapoptotic function of Bax through dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* 281, 18859–18867. doi:10.1074/jbc.M512543200
- Xu, R., Jin, J., Hu, W., Sun, W., Bielawski, J., Szulc, Z., Taha, T., Obeid, L.M., Mao, C., 2006. Golgi alkaline ceramidase regulates cell proliferation and survival by controlling levels of sphingosine and S1P. *FASEB J.* 20, 1813–1825. doi:10.1096/fj.05-5689com
- Xu, W.-Q., Yu, Z., Xie, Y., Huang, G.-Q., Shu, X.-H., Zhu, Y., Zhou, Z.-N., Yang, H.-T., 2011. Therapeutic effect of intermittent hypobaric hypoxia on myocardial infarction in rats. *Basic Res. Cardiol.* 106, 329–342. doi:10.1007/s00395-011-0159-y
- Yang, X., Cohen, M.V., Downey, J.M., 2010. Mechanism of Cardioprotection by Early Ischemic Preconditioning. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 24, 225–234. doi:10.1007/s10557-010-6236-x
- Young, M.M., Kester, M., Wang, H.-G., 2013. Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. *J. Lipid Res.* 54, 5–19. doi:10.1194/jlr.R031278
- Yu, L., Wan, F., Dutta, S., Welsh, S., Liu, Z., Freundt, E., Baehrecke, E.H., Lenardo, M., 2006. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4952–4957. doi:10.1073/pnas.0511288103
- Zeidan, Y.H., Hannun, Y.A., 2010. The acid sphingomyelinase/ceramide pathway: biomedical significance and mechanisms of regulation. *Curr. Mol. Med.* 10, 454–466.
- Zhang, J., Honbo, N., Goetzl, E.J., Chatterjee, K., Karliner, J.S., Gray, M.O., 2007a. Signals from type 1 sphingosine 1-phosphate receptors enhance adult mouse cardiac myocyte survival during hypoxia. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 293, H3150–H3158. doi:10.1152/ajpheart.00587.2006
- Zhao, Z.-Q., Corvera, J.S., Halkos, M.E., Kerendi, F., Wang, N.-P., Guyton, R.A., Vinten-Johansen, J., 2003. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285, H579–588. doi:10.1152/ajpheart.01064.2002

- Zhou, H., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., Pittman, R.N., 1998. Inhibition of Akt Kinase by Cell-permeable Ceramide and Its Implications for Ceramide-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 16568–16575. doi:10.1074/jbc.273.26.16568
- Žurmanová, Půta, Stopková, Soukup, 2008. Real time RT-PCR with a newly designed set of primers confirmed the presence of 2b and 2x/d myosin heavy chain mRNAs in the rat slow soleus muscle [WWW Document]. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=%C5%BEurmanov%C3%A1+stopkov%C3%A1> (accessed 5.18.14).

PŘÍLOHOVÁ ČÁST 1

Roztoky a chemikálie pro proteinové analýzy

HOMOGENIZACE

- **Homogenizační médium HM1**

| | |
|---|--|
| TRIS | 16,04mg |
| EGTA | 9,52 mg |
| EDTA | 2,92 mg |
| sacharosa | 0,86 g |
| Inhibitory proteáz (phos STOP inhibitors) | 1 tableta |
| Complete inhibitors | 400µl (1 tableta na 2 ml mQH ₂ O) |

- DTT (čerstvě dodané) 7,71 mg
- **Homogenizační médium HM2 pH 7,4**

| | |
|-----------------------------------|--------|
| močovina | 3,0 g |
| thiomočovina | 1,55 g |
| Tetrasodium pyrofosfát dekahydrát | 45 mg |
| 2- merkaptoethanol | |

doplněno do 10 ml mQH₂O

SDS-PAGE

- **TRIS pH 8,8**

| | |
|------|-------|
| Tris | 9,1 g |
|------|-------|

rozmícháno v cca 95 ml mQH₂O, pH upraveno pomocí HCl (36%), doplněno do 100 ml mQH₂O
uchováno při 4 °C
- **Bis-TRIS pH 6,8**

| | |
|----------|-------|
| Bis-Tris | 5,2 g |
|----------|-------|

rozmícháno v cca 95 ml mQH₂O, pH upraveno pomocí HCl (36%), doplněno do 100 ml mQH₂O
uchováno při 4 °C
- **APS**

| | |
|-------------------------------------|--|
| 1 g APS na 10 ml mQH ₂ O | |
|-------------------------------------|--|
- **SDS**

| | |
|---------------------------------------|--|
| 10 g SDS na 100 ml mQH ₂ O | |
|---------------------------------------|--|
- **Separační gel (12%)**

| | |
|------------------------------|--------|
| objem dostatečný na dva gely | |
| mQH ₂ O | 3,4 ml |
| 30% akrylamid/bis-akrylamid | 4,0 ml |
| TRIS pH 8,8 | 2,5 ml |
| SDS (10%) | 100 µl |

těsně před nalitím gelu přidáno

| | |
|-----------|-------|
| APS (10%) | 25 µl |
| TEMED | 5 µl |

- **Zaostřovací gel (5%)**
objem dostatečný na dva gely

| | |
|-----------------------------|---------|
| mQH ₂ O | 2,85 ml |
| 30% akrylamid/bis-akrylamid | 0,85 ml |
| TRIS pH 6,8 | 1,25 ml |
| SDS (10%) | 50 µl |

těsně před nalitím gelu přidáno

| | |
|-----------|-------|
| APS (10%) | 25 µl |
| TEMED | 5 µl |
- **elektrodotový pufr 10 x koncentrovaný**

| | |
|--------|--------|
| TRIS | 30,3 g |
| glycin | 14,4 g |
| SDS | 10 g |
- **elektrodotový pufr**
100 ml 10 x koncentrovaného pufru doplněno do objemu 1 l mQH₂O

WESTERN BLOT

- **transferový pufr Towbin**

| | |
|---------------------------------------|--------|
| 10x Tris/Glycine Buffer, 10x, Bio-Rad | 20 ml |
| mQ H ₂ O | 140 ml |
| metanol | 40ml |

10x koncentrovaný tris/glycinový Bio-Rad pufr obsahuje: 25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3

BLOKOVÁNÍ NESPECIFICKÝCH INTERAKCÍ

- **Ponceau S**

| | |
|-----------------|-------|
| Ponceau | 1 g |
| kyselina octová | 50 ml |

doplněno do 1 l mQH₂O
- **TBS**

| | |
|------|---------|
| TRIS | 12,1 g |
| NaCl | 146,2 g |

rozpuštěno v 4 l mQH₂O, pH upraveno pomocí HCl (36%) na 7,5, doplněno do 5 l mQH₂O
- **TTBS**

| | |
|----------|--------|
| TBS | 1 l |
| Tween 20 | 500 µl |

PŘÍLOHOVÁ ČÁST 2

Hodnoty genové exprese

Tabulky s hodnotami exprese vztažené k HPRT (hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza) pro geny za kontinuální normobarické hypoxie v levé (LV) a pravé komoře (RV)

| CASP3 | | | | | | | | | | |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | LV | | | | | RV | | | | |
| skupina | N | H4 | H48 | H120 | CH | N | H4 | H48 | H120 | CH |
| | 0,0207 | 0,0182 | 0,0227 | 0,0189 | 0,0228 | 0,0301 | 0,0104 | 0,0190 | 0,0511 | 0,0386 |
| | 0,0234 | 0,0195 | 0,0192 | 0,0197 | 0,0205 | 0,0239 | 0,0200 | 0,0192 | 0,0386 | 0,0313 |
| | 0,0172 | 0,0222 | 0,0200 | 0,0227 | 0,0209 | 0,0234 | 0,0193 | 0,0288 | 0,0454 | 0,0278 |
| | 0,0171 | 0,0170 | 0,0109 | 0,0251 | 0,0262 | 0,0198 | 0,0182 | 0,0211 | 0,0687 | 0,0506 |
| | 0,0162 | 0,0249 | 0,0154 | 0,0307 | 0,0177 | 0,0238 | 0,0233 | 0,0154 | 0,0426 | 0,0451 |
| | 0,0176 | 0,0285 | 0,0179 | 0,0200 | 0,0217 | 0,0195 | 0,0195 | 0,0167 | | 0,0388 |
| průměr | 0,0187 | 0,0217 | 0,0177 | 0,0228 | 0,0216 | 0,0234 | 0,0185 | 0,0200 | 0,0493 | 0,0387 |
| SEM | 0,0011 | 0,0018 | 0,0017 | 0,0018 | 0,0012 | 0,0016 | 0,0018 | 0,0019 | 0,0053 | 0,0035 |

| CASP8 | | | | | | | | | | |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | LV | | | | | RV | | | | |
| skupina | N | H4 | H48 | H120 | CH | N | H4 | H48 | H120 | CH |
| | 0,0265 | 0,0224 | 0,0237 | 0,0232 | 0,0208 | 0,0353 | 0,0172 | 0,0504 | 0,0658 | 0,0500 |
| | 0,0227 | 0,0322 | 0,0201 | 0,0216 | 0,0199 | 0,0288 | 0,0258 | 0,0380 | 0,0695 | 0,0495 |
| | 0,0223 | 0,0247 | 0,0237 | 0,0205 | 0,0307 | 0,0280 | 0,0324 | 0,0497 | 0,0501 | 0,0728 |
| | 0,0265 | 0,0208 | 0,0220 | 0,0243 | 0,0233 | 0,0308 | 0,0303 | 0,0370 | 0,0793 | 0,0550 |
| | 0,0250 | 0,0275 | 0,0206 | 0,0200 | 0,0266 | 0,0330 | 0,0354 | 0,0313 | | 0,0614 |
| | 0,0204 | 0,0255 | 0,0227 | 0,0177 | 0,0214 | 0,0376 | 0,0333 | 0,0303 | 0,0485 | 0,0572 |
| průměr | 0,0239 | 0,0255 | 0,0222 | 0,0212 | 0,0238 | 0,0322 | 0,0291 | 0,0394 | 0,0626 | 0,0576 |
| SEM | 0,0010 | 0,0016 | 0,0006 | 0,0010 | 0,0017 | 0,0015 | 0,0027 | 0,0036 | 0,0059 | 0,0035 |

| BCL2 | | | | | | | | | | |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | LV | | | | | RV | | | | |
| skupina | N | H4 | H48 | H120 | CH | N | H4 | H48 | H120 | CH |
| | 0,0464 | 0,0357 | 0,0364 | 0,0296 | 0,0380 | 0,0599 | 0,0302 | 0,0432 | 0,0591 | 0,0664 |
| | 0,0427 | 0,0461 | 0,0470 | 0,0282 | 0,0314 | 0,0537 | 0,0583 | 0,0424 | 0,0549 | 0,0479 |
| | 0,0293 | 0,0517 | 0,0325 | 0,0419 | 0,0329 | 0,0430 | 0,0481 | 0,0461 | 0,0603 | 0,0364 |
| | 0,0320 | 0,0349 | 0,0221 | 0,0300 | 0,0486 | 0,0448 | 0,0308 | 0,0438 | 0,0649 | 0,0727 |
| | 0,0437 | 0,0711 | 0,0268 | 0,0352 | 0,0397 | 0,0553 | 0,0697 | 0,0302 | 0,0512 | 0,0571 |
| | 0,0405 | 0,0551 | 0,0303 | 0,0459 | 0,0497 | 0,0420 | 0,0441 | 0,0451 | | 0,0614 |
| průměr | 0,0391 | 0,0491 | 0,0325 | 0,0351 | 0,0401 | 0,0498 | 0,0469 | 0,0418 | 0,0581 | 0,0570 |
| SEM | 0,0028 | 0,0055 | 0,0035 | 0,0030 | 0,0031 | 0,0031 | 0,0063 | 0,0024 | 0,0023 | 0,0054 |

N – kontrolní normoxická skupina; H – skupiny vystavené akutní normobarické hypoxii 4, 48 a 120 hodin; CH – chronická 21 denní normobarická hypoxie. CASP3 (kaspáza 3), CASP8 (kaspáza 8), BCL2 (B-cell CLL/lymphoma2).

Tabulky s hodnotami exprese vztažené k HPRT (hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza) pro geny za kontinuální normobarické hypoxie v levé (LV) a pravé komoře (RV)

| BAX | | | | | | | | | | |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | LV | | | | | RV | | | | |
| skupina | N | H4 | H48 | H120 | CH | N | H4 | H48 | H120 | CH |
| | 0,0835 | 0,0814 | 0,0998 | 0,0805 | 0,0854 | 0,0931 | 0,0565 | 0,0886 | 0,1517 | 0,1251 |
| | 0,0888 | 0,0797 | 0,0870 | 0,0838 | 0,0780 | 0,0870 | 0,0875 | 0,0776 | 0,1366 | 0,1142 |
| | 0,0631 | 0,0851 | 0,0827 | 0,0847 | 0,0825 | 0,0705 | 0,0962 | 0,1142 | 0,1430 | 0,0960 |
| | 0,0701 | 0,0708 | 0,0457 | 0,0756 | 0,0914 | 0,0721 | 0,0724 | 0,0982 | 0,1734 | 0,1616 |
| | 0,0698 | 0,1094 | 0,0623 | 0,1005 | 0,0788 | 0,0767 | 0,0960 | 0,0661 | 0,1502 | 0,1388 |
| | 0,0733 | 0,1202 | 0,0789 | 0,0990 | 0,0909 | 0,0799 | 0,0846 | 0,0675 | | 0,1185 |
| průměr | 0,0748 | 0,0911 | 0,0761 | 0,0873 | 0,0845 | 0,0799 | 0,0822 | 0,0853 | 0,1510 | 0,1257 |
| SEM | 0,0039 | 0,0079 | 0,0078 | 0,0041 | 0,0024 | 0,0036 | 0,0063 | 0,0077 | 0,0062 | 0,0092 |

| SPTLC1 | | | | | | | | | | |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | LV | | | | | RV | | | | |
| skupina | N | H4 | H48 | H120 | CH | N | H4 | H48 | H120 | CH |
| | 0,0418 | | 0,0506 | 0,0375 | 0,0336 | 0,0543 | 0,0263 | 0,0378 | | 0,0415 |
| | 0,0433 | 0,0448 | | | | 0,0469 | 0,0467 | | 0,0437 | 0,0383 |
| | 0,0356 | 0,0467 | 0,0413 | 0,0420 | | 0,0352 | 0,0488 | 0,0400 | | |
| | | 0,0364 | | | | | | 0,0432 | | |
| | 0,0302 | 0,0515 | 0,0289 | | 0,0293 | 0,0382 | 0,0501 | 0,0346 | 0,0382 | 0,0533 |
| | 0,0331 | 0,0540 | | 0,0409 | | 0,0345 | | 0,0395 | | 0,0448 |
| průměr | 0,0368 | 0,0467 | 0,0403 | 0,0401 | 0,0315 | 0,0418 | 0,0430 | 0,0390 | 0,0409 | 0,0445 |
| SEM | 0,0025 | 0,0030 | 0,0063 | 0,0014 | 0,0022 | 0,0038 | 0,0056 | 0,0014 | 0,0027 | 0,0032 |

| SGMS2 | | | | | | | | | | |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | LV | | | | | RV | | | | |
| skupina | N | H4 | H48 | H120 | CH | N | H4 | H48 | H120 | CH |
| | 0,0286 | 0,0198 | 0,0205 | 0,0225 | 0,0233 | 0,0518 | 0,0217 | 0,0283 | 0,0431 | 0,0332 |
| | 0,0289 | 0,0408 | 0,0215 | 0,0232 | 0,0301 | 0,0418 | 0,0394 | 0,0251 | 0,0387 | 0,0387 |
| | 0,0238 | 0,0330 | 0,0226 | 0,0233 | 0,0215 | 0,0367 | 0,0309 | 0,0324 | 0,0472 | 0,0337 |
| | 0,0104 | 0,0181 | 0,0105 | 0,0274 | 0,0210 | 0,0187 | 0,0157 | 0,0270 | 0,0417 | 0,0354 |
| | 0,0143 | 0,0163 | 0,0183 | 0,0132 | 0,0054 | 0,0254 | 0,0217 | 0,0211 | 0,0411 | 0,0216 |
| | 0,0208 | 0,0205 | 0,0192 | | 0,0194 | 0,0359 | 0,0274 | 0,0346 | | 0,0342 |
| průměr | 0,0212 | 0,0247 | 0,0188 | 0,0219 | 0,0201 | 0,0350 | 0,0261 | 0,0281 | 0,0423 | 0,0328 |
| SEM | 0,0031 | 0,0040 | 0,0018 | 0,0024 | 0,0033 | 0,0048 | 0,0034 | 0,0020 | 0,0014 | 0,0024 |

N – kontrolní normoxická skupina; H – skupiny vystavené akutní normobarické hypoxii 4, 48 a 120 hodin; CH – chronická 21 denní normobarická hypoxie. BAX (BCL2-associated X protein), SPTLC1 (podjednotka serinpalmitoyltransferázy), SGMS2 (sfingomyelinsyntáza 2).

Tabulky s hodnotami exprese vztažené k HPRT (hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza) pro geny za kontinuální normobarické hypoxie v levé (LV) a pravé komoře (RV)

| SMPD2 | | | | | | | | | | |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | LV | | | | | RV | | | | |
| skupina | N | H4 | H48 | H120 | CH | N | H4 | H48 | H120 | CH |
| | 0,0471 | 0,0555 | 0,0576 | 0,0531 | 0,0482 | 0,0760 | 0,0303 | 0,0364 | 0,0626 | 0,0623 |
| | 0,0531 | 0,0594 | 0,0500 | 0,0500 | 0,0514 | 0,0726 | 0,0486 | 0,0371 | 0,0717 | 0,0589 |
| | 0,0357 | 0,0580 | 0,0461 | 0,0563 | 0,0417 | 0,0500 | 0,0545 | 0,0385 | 0,0773 | 0,0441 |
| | 0,0361 | 0,0484 | 0,0282 | 0,0418 | 0,0424 | 0,0527 | 0,0457 | 0,0483 | 0,0728 | 0,0666 |
| | 0,0357 | 0,0682 | 0,0398 | 0,0579 | 0,0333 | 0,0564 | 0,0624 | 0,0399 | 0,0552 | 0,0764 |
| | 0,0425 | 0,0889 | 0,0499 | 0,0475 | 0,0502 | 0,0519 | 0,0586 | 0,0535 | | 0,0679 |
| průměr | 0,0417 | 0,0631 | 0,0453 | 0,0511 | 0,0445 | 0,0599 | 0,0500 | 0,0423 | 0,0679 | 0,0627 |
| SEM | 0,0030 | 0,0058 | 0,0042 | 0,0024 | 0,0028 | 0,0046 | 0,0047 | 0,0028 | 0,0040 | 0,0044 |

| ACER2 | | | | | | | | | | |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | LV | | | | | RV | | | | |
| skupina | N | H4 | H48 | H120 | CH | N | H4 | H48 | H120 | CH |
| | 0,0465 | 0,0905 | 0,0615 | 0,0485 | 0,0569 | 0,0735 | 0,0792 | 0,0640 | 0,0820 | 0,0949 |
| | 0,0418 | 0,0914 | 0,0584 | 0,0530 | 0,0512 | 0,0605 | 0,1001 | 0,0522 | 0,0668 | 0,0709 |
| | 0,0413 | 0,0968 | 0,0592 | 0,0518 | 0,0669 | 0,0513 | 0,0853 | 0,0526 | 0,0936 | 0,0994 |
| | 0,0393 | 0,0399 | 0,0530 | 0,0795 | 0,0716 | 0,0563 | 0,0728 | 0,0470 | 0,1067 | 0,1159 |
| | 0,0442 | 0,0750 | 0,0471 | 0,0538 | 0,0492 | 0,0653 | 0,0914 | 0,0738 | 0,0826 | 0,1052 |
| | 0,0381 | 0,0880 | 0,0490 | 0,0566 | 0,0499 | 0,0518 | 0,1003 | 0,0705 | | 0,0895 |
| průměr | 0,0419 | 0,0803 | 0,0547 | 0,0572 | 0,0576 | 0,0598 | 0,0882 | 0,0600 | 0,0864 | 0,0960 |
| SEM | 0,0013 | 0,0086 | 0,0024 | 0,0046 | 0,0039 | 0,0035 | 0,0046 | 0,0045 | 0,0066 | 0,0062 |

| CERK | | | | | | | | | | |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | LV | | | | | RV | | | | |
| skupina | N | H4 | H48 | H120 | CH | N | H4 | H48 | H120 | CH |
| | 0,0763 | 0,0591 | 0,0755 | 0,0736 | 0,0666 | 0,0745 | 0,0480 | 0,0771 | 0,0986 | 0,1101 |
| | 0,0789 | 0,0698 | 0,0582 | 0,0692 | 0,0639 | 0,0635 | 0,0655 | 0,0720 | 0,0942 | 0,0873 |
| | 0,0814 | 0,0802 | 0,0559 | 0,0624 | 0,0902 | 0,0567 | 0,0714 | 0,1033 | 0,1098 | 0,1145 |
| | 0,0708 | 0,0553 | 0,0715 | 0,0767 | 0,0902 | 0,0634 | 0,0994 | 0,0846 | 0,1277 | 0,1131 |
| | 0,0595 | 0,0778 | 0,0537 | 0,0670 | 0,0648 | 0,0535 | 0,0789 | 0,0684 | | 0,1150 |
| | 0,0683 | 0,0638 | 0,0635 | 0,0611 | 0,0561 | 0,0490 | 0,0644 | 0,0834 | 0,1137 | 0,0892 |
| průměr | 0,0725 | 0,0677 | 0,0631 | 0,0683 | 0,0720 | 0,0601 | 0,0713 | 0,0815 | 0,1088 | 0,1049 |
| SEM | 0,0033 | 0,0041 | 0,0036 | 0,0025 | 0,0059 | 0,0037 | 0,0070 | 0,0051 | 0,0059 | 0,0053 |

N – kontrolní normoxická skupina; H – skupiny vystavené akutní normobarické hypoxii 4, 48 a 120 hodin; CH – chronická 21 denní normobarická hypoxie. SMPD2 (sfingomyelinfosfodiesteráza 2), ACER2 (alkalická ceramidáza 2), CERK (ceramidkináza).

Tabulky s hodnotami exprese vztažené k HPRT (hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza) prospolečný transkript genů sfingosinkináza 1 a sfingosinkináza 2 za kontinuální normobarické hypoxie v levé (LV) a pravé komoře (RV)

| SPHK | | | | | | | | | | |
|----------------|-----------|-----------|------------|-------------|-----------|-----------|-----------|------------|-------------|-----------|
| | LV | | | | | RV | | | | |
| skupina | N | H4 | H48 | H120 | CH | N | H4 | H48 | H120 | CH |
| | 0,0179 | 0,0072 | 0,0169 | 0,0364 | 0,0214 | 0,0133 | 0,0088 | 0,0199 | 0,0329 | 0,0394 |
| | 0,0640 | 0,0154 | 0,0077 | 0,0233 | 0,0292 | 0,0222 | 0,0083 | 0,0088 | 0,0347 | 0,0240 |
| | 0,0464 | 0,0087 | 0,0112 | 0,0146 | 0,0638 | 0,0117 | 0,0085 | 0,0203 | 0,0219 | 0,0528 |
| | 0,0109 | 0,0121 | 0,0070 | 0,0209 | 0,0264 | 0,0102 | 0,0107 | 0,0180 | 0,0364 | 0,0350 |
| | 0,0121 | 0,0185 | 0,0104 | 0,0186 | 0,0205 | 0,0066 | 0,0158 | 0,0073 | | 0,0304 |
| | 0,0204 | 0,0137 | 0,0191 | 0,0218 | 0,0131 | 0,0096 | 0,0131 | 0,0166 | 0,0209 | 0,0297 |
| průměr | 0,0286 | 0,0126 | 0,0121 | 0,0226 | 0,0291 | 0,0123 | 0,0109 | 0,0152 | 0,0294 | 0,0352 |
| SEM | 0,0088 | 0,0017 | 0,0020 | 0,0030 | 0,0073 | 0,0022 | 0,0012 | 0,0023 | 0,0033 | 0,0041 |

N – kontrolní normoxická skupina; H – skupiny vystavené akutní normobarické hypoxii 4, 48 a 120 hodin; CH – chronická 21 denní normobarická hypoxie. SPHK (sfingosinkináza 1 a 2).

Tabulky s hodnotami exprese vztažené k HPRT (hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza) pro geny po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii v levé komoře.

| CASP3 | | |
|---------|--------|--------|
| skupina | N | IHH |
| | 0,0131 | 0,0173 |
| | 0,0098 | 0,0199 |
| | 0,0153 | 0,0179 |
| | 0,0128 | 0,0214 |
| | 0,0152 | 0,0270 |
| | 0,0293 | 0,0176 |
| | 0,0072 | 0,0336 |
| | | 0,0228 |
| průměr | 0,0147 | 0,0222 |
| SEM | 0,0027 | 0,0020 |

| CASP8 | | |
|---------|--------|--------|
| skupina | N | IHH |
| | 1,3300 | 0,5600 |
| | 1,1000 | 0,7800 |
| | 0,9500 | 1,3100 |
| | 1,7000 | 0,9000 |
| | 1,1900 | 0,9600 |
| | 1,1400 | 1,0400 |
| | 1,5600 | 0,7000 |
| | 0,9100 | 0,7300 |
| průměr | 1,235 | 0,8725 |
| SEM | 0,0988 | 0,0828 |

| BCL2 | | |
|---------|--------|--------|
| skupina | N | IHH |
| | 0,0436 | 0,0307 |
| | 0,0226 | 0,0320 |
| | 0,0385 | 0,0364 |
| | 0,0320 | 0,0364 |
| | 0,0527 | 0,0364 |
| | 0,0878 | 0,0288 |
| | 0,0167 | 0,0435 |
| | | 0,0384 |
| průměr | 0,0420 | 0,0353 |
| SEM | 0,0089 | 0,0017 |

| BAX | | |
|---------|--------|--------|
| skupina | N | IHH |
| | 0,0751 | 0,0789 |
| | 0,0516 | 0,0749 |
| | 0,0810 | 0,0719 |
| | 0,0585 | 0,0692 |
| | 0,0737 | 0,0963 |
| | 0,1648 | 0,0679 |
| | 0,0392 | 0,0894 |
| | | 0,0884 |
| průměr | 0,0777 | 0,0796 |
| SEM | 0,0155 | 0,0037 |

| SPTLC1 | | |
|---------|--------|--------|
| skupina | N | IHH |
| | 0,0393 | |
| | 0,0223 | |
| | 0,0376 | 0,0362 |
| | 0,0371 | 0,0416 |
| | | |
| | | |
| | 0,0187 | 0,0569 |
| | | |
| průměr | 0,0310 | 0,0449 |
| SEM | 0,0043 | 0,0062 |

| SGMS2 | | |
|---------|--------|--------|
| skupina | N | IHH |
| | 0,0134 | 0,0300 |
| | 0,0161 | 0,0281 |
| | 0,0031 | 0,0118 |
| | 0,0169 | 0,0148 |
| | 0,0299 | 0,0092 |
| | 0,0170 | 0,0302 |
| | 0,0036 | 0,0249 |
| | | 0,0321 |
| průměr | 0,0143 | 0,0226 |
| SEM | 0,0035 | 0,0033 |

| SMPD2 | | |
|---------|--------|--------|
| skupina | N | IHH |
| | 0,0410 | 0,0405 |
| | 0,0215 | 0,0452 |
| | 0,0433 | 0,0352 |
| | 0,0441 | 0,0387 |
| | 0,0459 | 0,0565 |
| | 0,0990 | 0,0426 |
| | 0,0242 | 0,0665 |
| | | 0,0718 |
| průměr | 0,0456 | 0,0496 |
| SEM | 0,0097 | 0,0048 |

| ACER2 | | |
|---------|--------|--------|
| skupina | N | IHH |
| | 0,0525 | 0,0344 |
| | | 0,0395 |
| | 0,0273 | 0,0289 |
| | 0,0531 | 0,0445 |
| | 0,0430 | 0,0456 |
| | 0,0394 | 0,0428 |
| | 0,0509 | 0,0447 |
| | | 0,0608 |
| průměr | 0,0444 | 0,0426 |
| SEM | 0,0041 | 0,0033 |

| CERK | | |
|---------|--------|--------|
| skupina | N | IHH |
| | 1,9700 | 1,8700 |
| | 2,1300 | 1,8400 |
| | 1,3200 | 2,0400 |
| | 2,4500 | 1,8100 |
| | 2,1700 | 2,4700 |
| | 1,4700 | 1,9100 |
| | 2,0700 | 1,3100 |
| | 1,8100 | 1,3900 |
| průměr | 1,9240 | 1,8300 |
| SEM | 0,1328 | 0,1286 |

N – kontrolní normoxická skupina; IHH – skupina adaptovaná na intermitentní hypobarickou hypoxii. CASP3 (kaspáza 3), CASP8 (kaspáza 8), BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2), BAX (BCL2-associated X protein), SPTLC1 (podjednotka serinpalmitoyltransferázy), SGMS2 (sfingomyelinsyntáza 2), SMPD2 (sfingomyelinofosfodiesteráza 2), ACER2 (alkalická ceramidáza 2), CERK (ceramidkináza).

Tabulky s hodnotami exprese vztažené k HPRT (hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza) pro společný transkript SPHK1 a SPHK2 (sfingosinkináza 1 a 2) po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii v levé komoře.

| SPHK | | |
|-------------|----------|------------|
| skupina | N | IHH |
| | 0,4000 | 0,3300 |
| | 0,4200 | 0,2800 |
| | 0,2900 | 0,5300 |
| | 0,6400 | 0,3900 |
| | 0,4900 | |
| | 0,3800 | 0,4400 |
| | 0,8400 | 0,2900 |
| | 0,4700 | 0,2700 |
| průměr | 0,4913 | 0,3614 |
| SEM | 0,0613 | 0,0367 |

N – kontrolní normoxická skupina; IHH – skupina adaptovaná na intermitentní hypobarickou hypoxii.

Tabulka s hodnotami exprese genů na úrovni proteinu za intermitentní hypobarické hypoxie

| BCL2 | | |
|-------------|----------|------------|
| skupina | N | IHH |
| | 11,7220 | 5,0328 |
| | 8,7890 | 6,4783 |
| | 5,6091 | 8,4736 |
| | 7,9056 | 9,9963 |
| | 9,1208 | 8,8341 |
| | 9,3179 | 8,7207 |
| průměr | 8,7440 | 7,9230 |
| SEM | 0,8139 | 0,7418 |

| BAX | | |
|------------|----------|------------|
| skupina | N | IHH |
| | 6,1459 | 9,5865 |
| | 7,2856 | 8,8472 |
| | 3,6417 | 10,1006 |
| | 5,7737 | 10,1288 |
| | 5,8653 | 11,3090 |
| | 10,6313 | 10,6845 |
| průměr | 6,5570 | 10,1100 |
| SEM | 0,9468 | 0,3482 |

Tabulka ukazuje průměrné hodnoty ze čtyř měření. Hodnoty jsou vyjádřené jako procenta z celkového signálu na membráně. N – kontrolní normoxická skupina; IHH – skupina adaptovaná na intermitentní hypobarickou hypoxii. BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2), BAX (BCL2-associated X protein)

PŘÍLOHOVÁ ČÁST 3

Výsledky statistických testů

Tabulka: Shrnutí výsledků statistických testů exprese na úrovni mRNA v CNH

| Gen | | Levá komora | | | | | Pravá komora | | | | |
|----------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|--------|--------|--------|-----------------------------------|-----------------------------|--------|--------|--------|
| | | N | Akutní normobarická hypoxie | | | CH | N | Akutní normobarická hypoxie | | | CH |
| | | | H4 | H48 | H120 | | | H4 | H48 | H120 | |
| CASP3 | Normální | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| | Test | ANOVA p-hodnota = 0,1199 | | | | | ANOVA p-hodnota = 2,20E-07 | | | | |
| | p-hodnota post testu | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | <0,01 | <0,01 | <0,01 |
| CASP8 | Normální | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| | Test | ANOVA p-hodnota = 0,1646 | | | | | ANOVA p-hodnota < 0,0001 | | | | |
| | p-hodnota post testu | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | <0,01 | <0,01 | <0,01 |
| BCL2 | Normální | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ne | ano | ano |
| | Test | ANOVA p-hodnota = 0,0434 | | | | | Kruskal Wallis p-hodnota = 0,0643 | | | | |
| | p-hodnota post testu | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 |
| BAX | Normální | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| | Test | ANOVA p-hodnota = 0,2138 | | | | | ANOVA p-hodnota = 2,20E-07 | | | | |
| | p-hodnota post testu | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | <0,01 | <0,01 | <0,01 |
| BCL2/BAX | Normální | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| | Test | ANOVA p-hodnota = 0,9638 | | | | | ANOVA p-hodnota = 0,1576 | | | | |
| | p-hodnota post testu | >=0,05 | >=0,05 | <0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | <0,05 | <0,01 | <0,01 |
| SPTLC1 | Normální | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ne | ano | ano | ano |
| | Test | ANOVA p-hodnota = 0,1042 | | | | | Kruskal Wallis p-hodnota = 0,6516 | | | | |
| | p-hodnota post testu | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 |
| SGMS2 | Normální | ano | ne | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ne |
| | Test | Kruskal Wallis p-hodnota = 0,7981 | | | | | Kruskal Wallis p-hodnota = 0,0159 | | | | |
| | p-hodnota post testu | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 |
| SMPD2 | Normální | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| | Test | ANOVA p-hodnota = 0,0045 | | | | | ANOVA p-hodnota = 0,0018 | | | | |
| | p-hodnota post testu | <0,01 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | <0,05 | >=0,05 | >=0,05 |
| ACER2 | Normální | ano | ano | ano | ne | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| | Test | Kruskal Wallis p-hodnota = 0,0040 | | | | | ANOVA p-hodnota = 2,72E-05 | | | | |
| | p-hodnota post testu | <0,01 | >=0,05 | >=0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,01 | >=0,05 | <0,01 | <0,01 | <0,01 |
| CERK | Normální | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ne |
| | Test | ANOVA p-hodnota = 0,4854 | | | | | Kruskal Wallis p-hodnota = 0,0005 | | | | |
| | p-hodnota post testu | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 |
| SPHK | Normální | ano | ano | ano | ano | ne | ano | ano | ano | ano | ano |
| | Test | Kruskal Wallis p-hodnota = 0,0105 | | | | | ANOVA p-hodnota < 0,0001 | | | | |
| | p-hodnota post testu | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | >=0,05 | <0,05 | <0,01 | <0,01 |

Tabulka shrnuje výsledky statistických testů relativní exprese vybraných genů na úrovni mRNA. Kolmogorov-Smirnovým testem bylo testováno, zda data mají normální rozložení. Na základě těchto výsledků byl zvolen statistický test – ANOVA při normálním rozložení dat nebo Kruskal-Wallisův test. Rozdíly mezi kontrolní skupinou v normoxii a skupinami vystavenými normobarické hypoxii byly porovnávány následným posttestem: Dunnettovým parametrickým testem nebo Dunnovým neparametrickým testem. Červená barva znázorňuje signifikantní zvýšení exprese oproti normoxii modrá signifikantní snížení. N – kontrolní normoxická skupina; H – skupiny vystavené akutní normobarické hypoxii 4, 48 a 120 hodin; CH – chronická 21 denní normobarická hypoxie. Byla sledována exprese genů: *CASP3* (kaspáza 3), *CASP8* (kaspáza 8), *BCL2* (*B-cell CLL/lymphoma 2*), *BAX* (*BCL2-associated X protein*), *SPTLC1* (podjednotka serinpalmitoyltransferázy), *SGMS2* (*sfingomyelinsyntáza 2*), *SMPD2* (*sfingomyelinfosfodiesteráza 2*), *ACER2* (*alkalická ceramidáza 2*), *CERK* (*ceramidkináza*), *SPHK* (*sfingosinkináza*)

Tabulka: Shrnutí výsledků statistických testů exprese na úrovni mRNA po adaptaci na IHH

| Gen | CASP3 | | CASP8 | | BCL2 | | BAX | |
|----------------------|--------------------|-----|--------------------|-----|--------------------|-----|--------------------|-----|
| Skupina | N | IHH | N | IHH | N | IHH | N | IHH |
| Normální rozložení | ne | ano | ano | ano | ano | ano | ne | ano |
| Test | Mann Whitney | | T-test | | T-test | | Mann Whitney | |
| p-hodnota post testu | p-hodnota = 0,0140 | | p-hodnota = 0,0139 | | p-hodnota = 0,4472 | | p-hodnota = 0,3969 | |

| Gen | BCL2/BAX | | SPTLC1 | | SGMS2 | | SMPD2 | |
|----------------------|--------------------|-----|--------------------|-----|--------------------|-----|--------------------|-----|
| Skupina | N | IHH | N | IHH | N | IHH | N | IHH |
| Normální rozložení | ano | ano | ano | ano | ano | ano | ne | ano |
| Test | T-test | | T-test | | T-test | | Mann Whitney | |
| p-hodnota post testu | p-hodnota = 0,0580 | | p-hodnota = 0,1068 | | p-hodnota = 0,1024 | | p-hodnota = 0,6943 | |

| Gen | ACER2 | | CERK | | SPHK | |
|----------------------|--------------------|-----|--------------------|-----|--------------------|-----|
| Skupina | N | IHH | N | IHH | N | IHH |
| Normální rozložení | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| Test | T-test | | T-test | | T-test | |
| p-hodnota post testu | p-hodnota = 0,7546 | | p-hodnota = 0,6199 | | p-hodnota = 0,1036 | |

Tabulka shrnuje výsledky statistických testů relativní exprese vybraných genů na úrovni mRNA. Pro statistické testy (T- test pro data s normálním rozložením a Mann Whitney test pro data s nenormálním rozložením) byly použity na základě výsledků Kolmogorov-Smirnovova testu normality. Červená barva znázorňuje signifikantní zvýšení exprese oproti normoxii. N – kontrolní normoxická skupina; H – skupina vystavená hypobarické hypoxii. Byla sledována exprese genů: *CASP3* (*kaspáza 3*), *CASP8* (*kaspáza 8*), *BCL2* (*B-cell CLL/lymphoma 2*), *BAX* (*BCL2-associated X protein*), *SPTLC1* (podjednotka *serinpalmitoyltransferázy*), *SGMS2* (*sfingomyelinsyntáza 2*), *SMPD2* (*sfingomyelinfosfodiesteráza 2*), *ACER2* (*alkalická ceramidáza 2*), *CERK* (*ceramidkináza*), *SPHK* (*sfingosinkináza*)

Tabulka č. 4: Shrnutí výsledků statistických testů exprese na úrovni proteinu po adaptaci na IHH

| Gen | BCL2 | | BAX | | BCL2/BAX | |
|----------------------|--------------------|-----|--------------------|-----|--------------------|-----|
| Skupina | N | IHH | N | IHH | N | IHH |
| Normální rozložení | ano | ano | ano | ano | ano | ano |
| Test | T-test | | T-test | | T-test | |
| p-hodnota post testu | p-hodnota = 0,4729 | | p-hodnota = 0,0055 | | p-hodnota = 0,0024 | |

Tabulka shrnuje výsledky statistických testů relativní exprese vybraných genů na úrovni proteinu. Pro statistické testy (T- test pro data s normálním rozložením a Mann Whitney test pro data s nenormálním rozložením) byly použity na základě výsledků Kolmogorov-Smirnovova testu normality. Červená barva znázorňuje signifikantní zvýšení exprese oproti normoxii. N – kontrolní normoxická skupina; H – skupina vystavená hypobarické hypoxii. *BCL2* (*B-cell CLL/lymphoma 2*), *BAX* (*BCL2-associated X protein*)