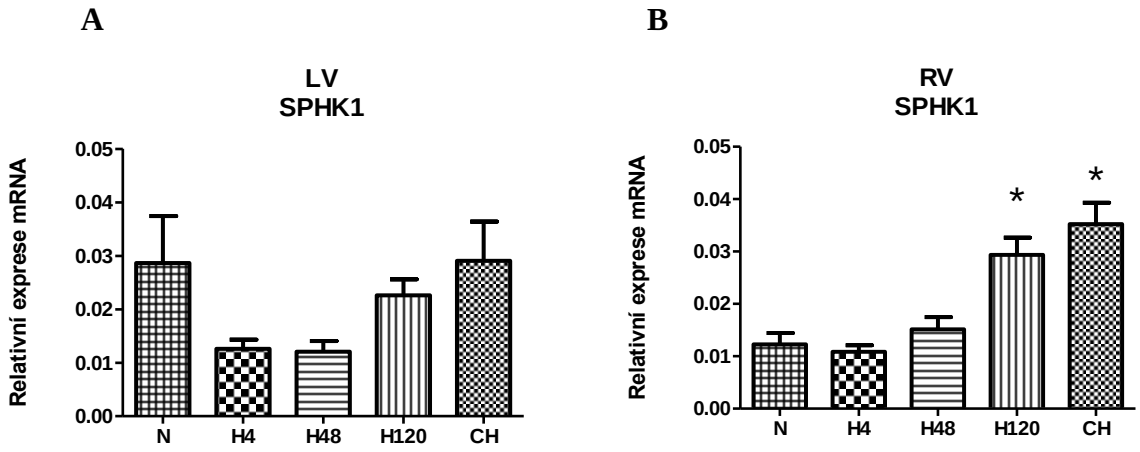
ERRATA

V této práci nebyla určena exprese úseku mRNA transkriptu společného oběma sfingosinkinázám (SPHK1 a SPHK2), ale pouze exprese sfingosinkinázy 1 (SPHK1) na úrovni mRNA.

Sfingosinkináza 1

SPHK1 působí kardioprotektivně a antiapoptoticky. Také v tomto případě jsme pozorovali nárůst exprese *SPHK 1* po 120 hodinovém a 21 denním působení CNH. V LV nebyly zaznamenány signifikantní změny.

Graf č. 11: Relativní exprese mRNA *sfingosinkinázy 1*



*Relativní exprese mRNA transkriptu genu SPHK 1 (sfingosinkináza 1) 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 ±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.

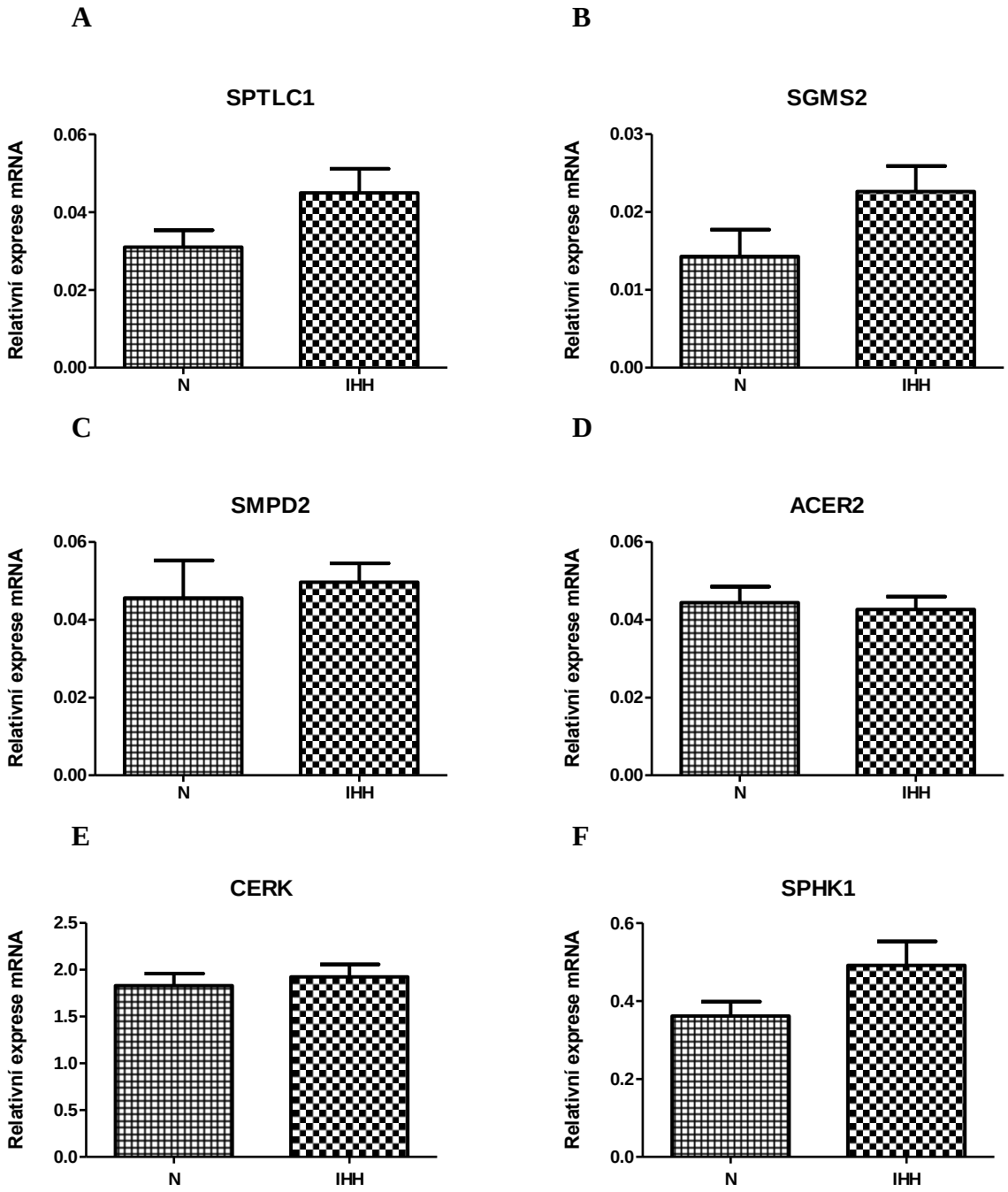
Tabulka č. 5: Souhrnné znázornění relativní exprese mRNA sledovaných genů

	Levá komora				**Pravá komora**			
	Akutní normobarická hypoxie			CH	Akutní normobarická hypoxie			CH
Zkratka	H4	H48	H120	21 DNÍ	H4	H48	H120	21 DNÍ
CASP3								
CASP8								
BCL2								
BAX								
BCL2/BAX								
SPTLC1								
SGMS2								
SMPD2								
ACER2								
CERK								
SPHK1								

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), SPHK1 (sfingsinkináza1).

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.

Grafy č. 16: Relativní exprese mRNA genů metanolismu sfingolipidů



Relativní exprese mRNA transkriptu, vztažená k referenčnímu genu HPRT (hypoxantin-guaninfosforibosyltransferáza) v LV myokardu potkanů, pro geny syntetické dráhy sfingolipidů podjednotka STLC1 serinpalmitoyltransferázy (A) a SGMS2 (sfingomyelinsyntáza 2) (B); genů katabolické dráhy SMPD2 (sfingomyelinfosphodiesteráza 2) (C) a ACER2 (alkalické ceramidáza 2) (D); genů kináz CERK (ceramidkináza) (E) a SPHK1 (sfingosinkináza 1) (F). N – kontrolní normoxická skupina; IHH – skupina adaptovaná na intermitentní hypobarickou hypoxii. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry ±SEM, rozdíl k N hodnocen na hladině významnosti ($p<0,05$)

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.

Exprese všech proapototických 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 sfingosinkinázy 1 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. Sfingosinkináza 1 (SPHK1) fosforyluje sfingosin a vzniká sfingosin-1-fosfát (S1P). Role S1P při ochraně srdečních buněk za hypoxie i ischemie a repefúze byla mnohokrát prokázána jak při *in vitro* studiích s cardiomyocyty (Karliner 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, $S1P_1$, $S1P_2$ a $S1P_3$ (Mazurais et al., 2002). A bylo prokázáno, že blokace $S1P_1$ a $S1P_3$ snižuje kardioprotektivní účinky preconditionigu (Vessey et al., 2009b). Současně se sfingosinkinázou vzrostla také exprese ceramidkinázy, která z ceramidu tvoří ceramid-1-fosfát (C1P). Role C1P v srdci zatím není příliš studovaná, v jiných buněčných typech však 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).

PŘÍLOHOVÁ ČÁST 2
Hodnoty genové exprese

Tabulka s hodnotami exprese SPHK1 (sfingosinkináza 1) vztažené k HPRT (hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza) za kontinuální normobarické hypoxie v levé (LV) a pravé komoře (RV)

SPHK1										
	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.

Tabulka s hodnotami exprese SPHK1 (sfingosinkináza 1) vztažené k HPRT (hypoxantin-guaninfosforibosyltransferáza) po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii v levé komoře.

SPHK1		
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

		Levá komora					Pravá komora				
			Akutní normobarická hypoxie			CH		Akutní normobarická hypoxie			CH
Gen		N	H4	H48	H120	21 DNÍ	N	H4	H48	H120	21 DNÍ
CASP3	**Normální rozložení**	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	**<0,01**	**<0,01**
CASP8	**Normální rozložení**	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	**<0,01**	**<0,01**
BCL2	**Normální rozložení**	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
BAX	**Normální rozložení**	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	**<0,01**	**<0,01**
BCL2/BAX	**Normální rozložení**	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**	**<0,01**	**<0,01**
SPTLC1	**Normální rozložení**	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
SGMS2	**Normální rozložení**	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
SMPD2	**Normální rozložení**	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
ACER2	**Normální rozložení**	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**		**<0,01**	>=0,05	**<0,01**	**<0,01**
CERK	**Normální rozložení**	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**
SPHK1	**Normální rozložení**	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**	**<0,01**

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*), *SPHK1* (*sfingosinkináza 1*)

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

Gen	CASP3		CASP8		BCL2		BAX	
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	
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		SPHK1	
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*), *SPHK1* (*sfingosinkináza 1*)

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)